

Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Ligand-Rezeptor-Systems der retinotectalen Projektion

D i s s e r t a t i o n

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt

von

Lutz Alexander Deitinghoff
aus Frankfurt am Main

2003

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2003

Dekan: Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter: PD Dr. B. K. Müller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. J. Schmidt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Das retinotectale System des Hühnerembryos	6
1.2 Axonale Lenkungsmoleküle	11
Semaphorine	13
CAM	14
Netrine	15
RPTP	18
Ephrine	18
RGM	21
1.3 Signaltransduktion	22
2. Aufgabenstellung	25
3. Ergebnisse	27
3.1 Northern Blot Analyse der RGM Expression im Tectum des Hühnerembryos und im Hippocampus der Ratte	27
3.2 <i>In situ</i> Hybridisierung und Immunfärbung von RGM mRNA und Protein im Hühnertectum	28
3.3 Herstellung und Charakterisierung von RGM-AP Konstrukten inkl. N-terminaler Sequenzierung	31
3.4 RAP- (<i>receptor-affinity-probe</i>) Färbung	36
3.5 Biochemischer Ansatz zur Isolierung RGM-bindender Proteine	37
3.6 Screening der cDNA Bibliotheken	39
3.7 Herstellung von Neogenin Konstrukten und deren Expression	42
3.8 Stärke und Spezifität der RGM-Neogenin Bindung	44
3.9 Streifentest	51
4. Diskussion	55
4.1 Expression von RGM	57
4.2 Optimierung der RGM-AP Expression und Nachweis von RGM-bindenden Proteinen im retinotectalen System	59
4.3 Isolierung RGM-bindender Proteine	63
4.3.1 Biochemischer Ansatz	63
4.3.2 Molekularbiologischer Ansatz	65
4.4 Neogenin als potentieller RGM Rezeptor	66
4.4.1 Neogenin Expression und Vergleich mit RAP Färbungen	66
4.4.2 Spezifität und Stärke der RGM Neogenin Interaktion	69
4.4.3 Untersuchungen zur funktionellen Aktivität von Neogenin	72
4.5 Zusammenfassung	75
5. Material und Methoden	77
5.1 Material	77
5.1.1 Chemikalien	77
5.1.2 Zellkulturreagenzien:	79
5.1.3 Kits	80
5.1.4 Enzyme	80
5.1.5 Antikörper	80
5.1.6 Plasmide, Vektoren und Bibliotheken	80
5.1.7 Oligonukleotide (Primer)	81
5.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien	81
5.1.9 Tiere	82
5.1.10 Bakterien	82
5.1.11 Vertebratenzellen	82

Inhaltsverzeichnis

5.1.12 Puffer und Lösungen	82
5.2 Methoden.....	89
5.2.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren aus Gewebe	89
5.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA	89
5.2.3 Herstellung von Sonden	89
5.2.4 Northern Blot.....	89
5.2.5 <i>In situ</i> Hybridisierung.....	90
5.2.6 Reverse Transkription	90
5.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	90
5.2.8 Restriktionsverdau.....	91
5.2.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	92
5.2.10 Ligation	92
5.2.11 Klonierungen	92
5.2.12 Transformation	93
5.2.13 Minipräparation von Plasmid-DNA	93
5.2.14 Maxipräparation von Plasmid-DNA	94
5.2.15 Konzentrationsbestimmung von DNA	94
5.2.16 Transfektion und Genexpression.....	94
5.2.17 Zellulärer Bindungstest/ Screening cDNA Bank	94
5.2.18 AP-Test.....	95
5.2.19 Affinitätschromatographie	95
5.2.20 Bradford-Assay	95
5.2.21 Biochemischer Bindungstest	95
5.2.22 Gewebeisolierung.....	96
5.2.23 Differentielle Zentrifugation	96
5.2.24 Herstellung von Membranextrakten.....	96
5.2.25 Immunpräzipitation	96
5.2.26 Crosslinking	96
5.2.27 SDS-PAGE.....	97
5.2.28 Comassie-Färbung.....	97
5.2.29 Silberfärbung	97
5.2.30 Gelrocknung.....	98
5.2.31 Western-Blot	98
5.2.32 Ponceau Färbung.....	98
5.2.33 AP-Blot.....	98
5.2.34 Dot-Blot-AP-Färbung.....	98
5.2.35 Gewebsschnitte.....	98
5.2.36 Immunfärbungen	99
5.2.37 <i>In situ</i> Färbungen mit AP-Fusionsproteinen (<i>receptor affinity probe</i> , RAP).....	99
5.2.38 Streifentest.....	99
6. Literatur	101
Anhang	115
Verzeichnis der Abkürzungen	115

1. Einleitung

Während der Entwicklung des Nervensystems werden Milliarden von Neuronen mit ihren Zielzellen durch Axone verbunden. Je komplexer ein Organismus aufgebaut ist, desto anspruchsvoller ist die genaue Verknüpfung der jeweils zusammengehörigen Zellen. Den „Plan“, nach dem diese Art der Verschaltung stattfindet, nennt man eine topographische Karte (engl. *map*). Das Verschalten selbst wird dabei als *mapping* bezeichnet. Ein Merkmal dieser Karten ist, dass benachbarte Zellen des Ausgangsgebiets auf benachbarte Zellen im Zielgebiet projizieren.

Dabei wachsen in frühen Entwicklungsstadien jeweils zuerst Pionieraxone entlang vorgegebener Bahnen, denen daraufhin die weiteren Axone folgen. Im Zielgebiet werden die zu Nervenfasern gebündelten (faszikulierten) Axone dann wieder aufgefächert und verknüpfen sich mit den jeweiligen Zielzellen.

Die Genauigkeit der Projektion wird durch sogenannte Lenkungsmoleküle vermittelt. Diese können attraktiv oder repulsiv wirken, das heißt die Axone werden entweder von diesen angezogen (Attraktion) oder abgestoßen (Repulsion). Man unterscheidet grundsätzlich zwei verschiedene Klassen, die Chemo- und die kontaktvermittelte Attraktion beziehungsweise Repulsion.

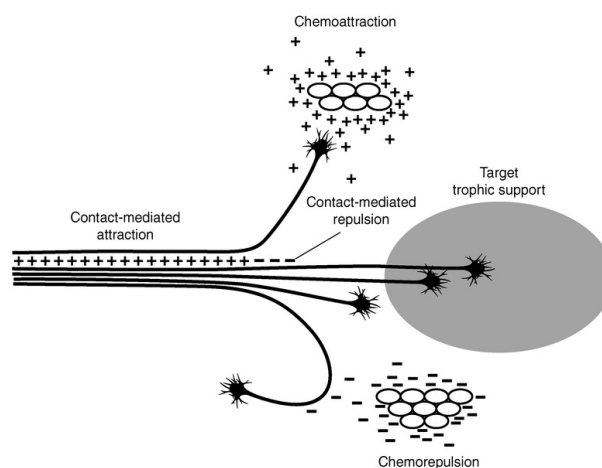


Abbildung 1.1: Axonlenkungsmechanismen. Lenkungsmoleküle werden in attraktive und repulsive Moleküle eingeteilt, wobei beide Klassen sowohl über entfernte (Chemoattraktion/ -repulsion) als auch kurze Distanzen (kontaktvermittelte Attraktion/ Repulsion) wirken können. Diese Unterscheidung ist für den Wachstumskegel oft nicht von Bedeutung, da dieser für lösliche als auch verankerte Moleküle die gleichen Rezeptoren verwendet (aus Huber *et al.*, 2003)

Die Abbildung 1.1 zeigt das Verhalten der Axone entsprechend den vier aufgeführten Lenkungsmechanismen. Kontaktvermittelt bedeutet dabei, dass die Signalmoleküle in der Zellmembran oder der extrazellulären Matrix verankert beziehungsweise an diese gebunden

1. Einleitung

sind. Chemoattraktion/ -repulsion bezeichnet diffusible Signalmoleküle, die von den sie produzierenden Zellen an die Umgebung in löslicher Form abgegeben werden. Schließlich ist ein weiterer Mechanismus die sogenannte trophische Unterstützung am Zielort. Dies bedeutet, es gibt Signalmoleküle im Zielgebiet, die die Axone mit den entsprechenden Rezeptoren am Leben erhalten. Sind die benötigten Signale nicht vorhanden, ziehen sich die Axone zurück und degenerieren.

Die Signale der Lenkungsmoleküle werden von Rezeptoren auf den Wachstumskegeln (englisch *growth cones*, als Spitze der auswachsenden Neuriten) ins Zellinnere übermittelt, wo die Botschaft durch einen sehr schnellen Umbau des Zytoskeletts entsprechend umgesetzt wird. Reaktionen des Wachstumskegels und des direkt dahinter liegenden Axonschafts können ein Hin- oder Abwenden zum/ vom Lenkungsmolekül oder auch ein Kollaps des Wachstumskegels sein. Bestimmt wird die Stärke der Reaktion durch die jeweilige Ligand- und/ oder Rezeptorkonzentration. Hier kommt auch die Gradiententheorie (Sperry, 1963, Gierer, 1981, Bonhoeffer und Gierer, 1984) zum tragen. Demnach wird die Ausbildung der topographischen Karten durch gegenläufige Ligand-Rezeptor-Gradienten ermöglicht. Axone mit hoher Rezeptordichte benötigen dabei ein schwächeres Signal (entspricht einer geringeren lokalen Ligandenkonzentration), um ihre richtige Position im Zielgebiet zu erreichen. Je geringer die Rezeptorkonzentration wird, desto größer muss die entsprechende Ligandenkonzentration werden, damit das jeweilige Signal seine Wirkung entfalten kann. Eine genauere Beschreibung erfolgt am Beispiel der Ephrine in Abschnitt 1.2.

1.1 Das retinotectale System des Hühnerembryos

Besonders intensiv wurde in den vergangenen Jahrzehnten die Entwicklung des retinotectalen Systems des Huhns untersucht. Die beteiligten Gewebe sind dabei gut charakterisiert und lassen sich einfach isolieren und zum Teil auch kultivieren. Zudem wurde meist eine hohe Homologie der beteiligten Moleküle im Vergleich zu anderen Spezies, wie etwa Maus, Ratte und Mensch, sowie häufig eine stark konservierte Funktion festgestellt.

Die Ausbildung der retinotectalen Verknüpfung beginnt mit dem Auswachsen der retinalen Ganglienzell- (englisch *retinal ganglion cell*, RGC) Axone zur optischen Fissur, an der die Nervenfaserbündel das Auge verlassen. Dieser Vorgang, welcher als erste von drei Lenkungsphasen bezeichnet wird, fängt an den Tagen 2/3 (E2/ E3) der Embryonalentwicklung an. Anschließend wachsen die Fasern durch den optischen Trakt, kreuzen sich am Chiasma, durchwachsen den optischen Nerv, um schließlich am anterioren Pol des optischen Tectums im Stadium E6 anzukommen (Lenkungsphase 2). In der dritten Lenkungsphase fächern sich

die Axone auf und verteilen sich auf der Oberfläche des Tectums in Richtung ihres jeweiligen Zielorts. Wenn die richtige Position erreicht ist, erfolgt ein Eintauchen der Axone in das Tectum, wo sie sich mit den Zielzellen in den Schichten c-f des *Stratum griseum et superficiale* (SGFS) verknüpfen. Abbildung 1.2 veranschaulicht sowohl die contralaterale Projektion wie auch die drei Lenkungsphasen während der Ausbildung des retinotectalen Systems.

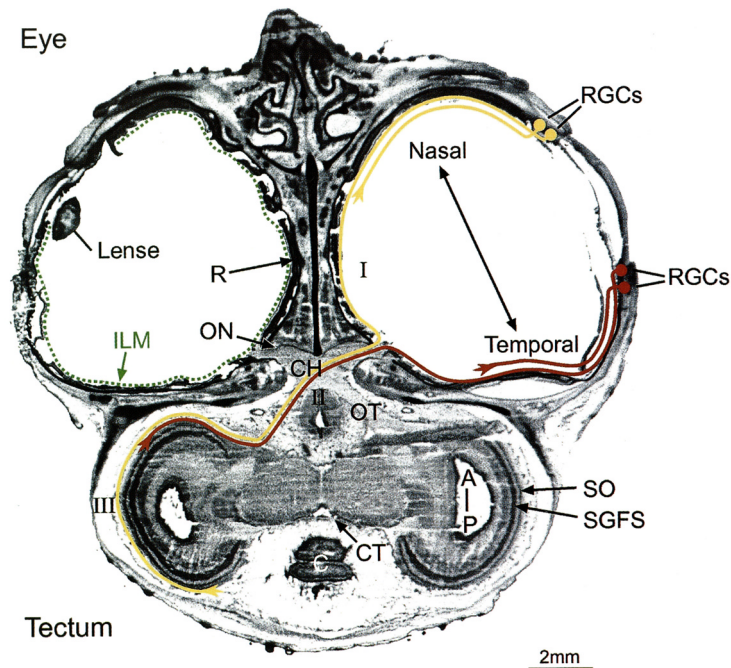


Abbildung 1.2: Die retinotectale Projektion beim Huhn. Nissel-gefärbter horizontaler Schnitt eines E11 Hühnerkopfs. Die Zellkörper der retinalen Ganglienzellen (RGCs) senden Axone mit Wachstumskegeln an der Spitze aus, die intraretinal bis zur Fissur wachsen (Phase I), um dort durch den optischen Nerv (ON), das Chiasma (CH) und den optischen Trakt (OT) bis zum anterioren Pol des optischen Tectums zu wachsen (Phase II). In Phase III werden die RGC Axone innerhalb des Tectums zum jeweiligen Zielneuron gelenkt und bilden so die topographische Karte aus; dabei enden temporale retinale Axone (rot) im anterioren (A) Tectum und nasale Axone (gelb) im posterioren (P) Tectum. ILM: Basalmembran, R: Retina, CH: Chiasma, SO: *Stratum opticum*, SGFS: *Stratum griseum et fibrosum superficiale*, CT: *Commissura tectalis*, C: *Cerebellum* (aus Mueller *et al.*, 2000)

Contralaterale Verknüpfung bedeutet dabei, dass die RGC Axone des rechten Auges zum linken Tectum wachsen und die des linken Auges entsprechend zum Rechten. In der Retina dorsal liegende Zellen haben ihre Zielzelle im ventralen Tectum und ventrale RGC im dorsalen. Schließlich projizieren nasale RGC Axone ins anteriore Tectum und temporale ins posteriore. Den Sinn dieser Verknüpfung verdeutlicht die Abbildung 1.3 für zwei von drei Dimensionen (dorso-ventral und naso-temporal beziehungsweise anterior-posterior). Durch die Lichtbrechung an der Linse entsteht auf der Retina das inverse Bild eines Objekts, das im Gehirn entsprechend dem Objekt als korrektes Abbild vorliegt. Durch die contralaterale Verknüpfung werden die drei Dimensionen jeweils wieder umgedreht, so dass letztendlich ein korrektes Abbild des Objekts dem Gehirn zur Verfügung steht.

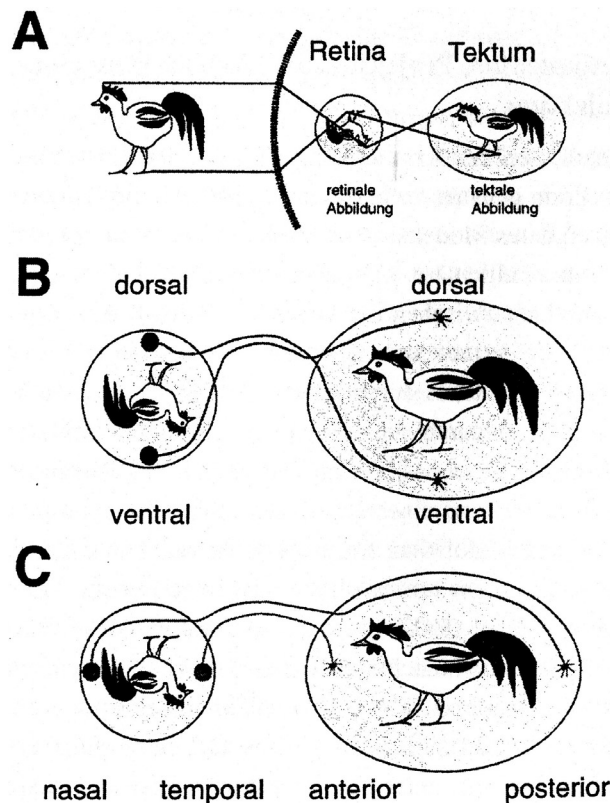


Abbildung 1.3: Diagramm der retinotectalen Projektion. Das Objekt ergibt aufgrund der Lichtbrechung ein inverses Bild auf der Retina, welches im Tectum wieder richtig herum erscheint (A). Die zweite Invertierung erfolgt durch die contralaterale Projektion von der Retina zum Tectum in allen drei Dimensionen, hier gezeigt anhand der dorso-ventralen Achse (B) und der naso-posterioren sowie temporal-anterioren Projektion (C) (aus Hornberger, 1999).

Das Auge selbst besteht aus verschiedenen Komponenten mit dem Glaskörper im Mittelpunkt. Die Basalmembran grenzt als innerste Schicht die Retina gegenüber dem Glaskörper ab. Auf die Basallamina folgt die optische Faserschicht, die von den Axonen der retinalen Ganglienzellen (RGC) gebildet wird. Die Ganglienzellschicht liegt dementsprechend direkt über der Faserschicht. Es folgen die innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*, IPL), in der sich RGC Dendriten sowie Neuriten von amakrinen und bipolaren Zellen befinden, die innere Körnerschicht (*inner nuclear layer*, INL), die äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*, OPL) mit den Neuriten von bipolaren und horizontalen Zellen und die äußere nukleäre Schicht (*outer nuclear layer*, ONL).

Die plexiformen Schichten sind in der Regel zellarme, mit Fasern durchzogene komplexe Schichten, während die nukleären Schichten mit Zellen dicht gepackt sind. Im ONL finden sich auch die Photorezeptoren. Das Pigmentepithel schließt die Retina nach außen hin ab. Einen Ausschnitt aus der Retina aus dem Stadium E8 zeigt die Abbildung 1.4.

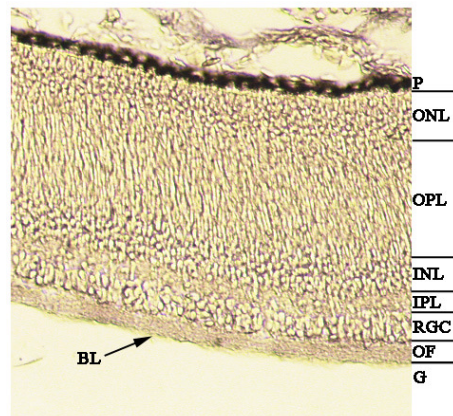


Abbildung 1.4: Ausschnitt aus der Retina im Stadium E8. P: Pigmentepithel, ONL: *outer nuclear layer*, OPL: *outer plexiform layer*, INL: *inner nuclear layer*, IPL: *inner plexiform layer*, RGC: *retinal ganglion cell layer*, OF: optische Faserschicht, BL: Basallamina, G: Glaskörper

Das *Tectum opticum*, welches eine bohnenförmige Gestalt besitzt, wird nach außen von einer Epithelschicht abgegrenzt. Beim erwachsenen Huhn besteht das Tectum aus sechs übergeordneten Schichten (*Stratae*), die ihrerseits zum Teil aus mehreren Unterschichten (*Laminae*) aufgebaut sind.

Die äußerste Schicht ist das *Stratum opticum* (SO), das aus den myelinisierten Fasern und den dazugehörigen Gliazellen gebildet wird. Die optischen Nervenfasern wachsen am anterior-ventralen Pol in das Tectum ein und breiten sich dann lateral auf der Oberfläche des Tectums zum posterior-medialen Pol aus. Wenn sie ihren vorgegebenen Ort erreichen, machen sie einen scharfen Knick und dringen in das *Stratum griseum et fibrosum superficiale* (SGFS) ein, wo sie dann in einer bestimmten *Lamina* (Unterschicht) enden. Durch diese Gegebenheiten variiert während der Embryonalentwicklung die Gestalt und Dicke der SO-Schicht, je nachdem an welcher Stelle und in welcher Orientierung diese angeschnitten werden.

Das bereits erwähnte *Stratum griseum et fibrosum superficiale* bildet die nächste Schicht und wird aus zehn *Laminae* aufgebaut. Diese Unterschichten werden nach LaVail und Cowan, 1971a, von außen nach innen mit a bis j bezeichnet. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Schichten würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, zumal die Ausdifferenzierung dieser *Laminae* erst im Anschluss an das untersuchte Zeitfenster stattfindet. Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass die Form und Gestalt dieser *Laminae* äußerst komplex und verschiedenartig ausfällt, von sehr breiten bis zu ganz schmalen Schichten, die zum Teil mit Zellen vollgepackt sind (zelluläre Schichten), zum Teil nur einzelne verstreute Zellen enthalten, oder einfach nur Dendriten und Axone (plexiforme Schichten). *Lamina j* ist die breiteste Schicht des SGFS und es finden sich nur wenige Zellen in dieser. Außerdem ist sie kaum abgegrenzt von *Lamina i* und dem darunterliegenden *Stratum griseum centrale* (SGC).

1. Einleitung

Die Dendriten der Zellen dieser Schicht und tieferer *Stratae* zeigen in Silberpräparationen ein bemerkenswertes radial-gestreiftes Aussehen, so dass man von der radialen Faserzone spricht (englisch *radial fiber zone*). Auf die Lamina j folgt das SGC, welches die ausgeprägteste Schicht des Tectums bildet. Die Abbildung 1.5 zeigt den Aufbau des ausdifferenzierten Tectums.

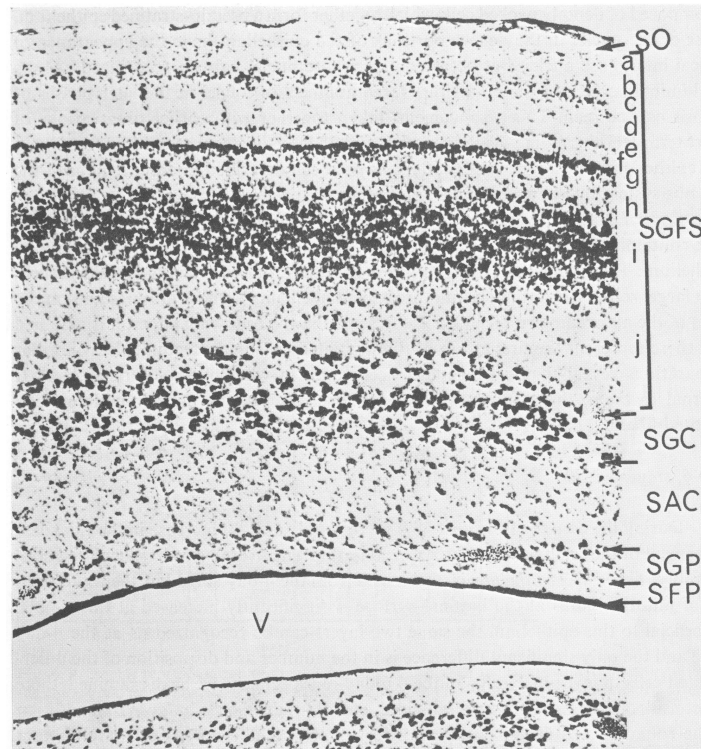


Abbildung 1.5: Bild eines Querschnitts durch das Tectum eines sechs Tage alten Huhns zur generellen Darstellung der zyto-architektonischen Organisation. Die sechs *Stratae* sind folgendermaßen beschriftet: SO: *stratum opticum*, SGFS: *stratum griseum et fibrosum superficiale*, SGC: *stratum griseum centrale*, SAC: *stratum album centrale*, SGP: *stratum griseum periventriculare*, SFP: *stratum fibrosum periventriculare*. Zudem sind die zehn *Laminae* (a-j) des SGFS bezeichnet. Das Ependym grenzt den Ventrikel (V) von den Zellschichten ab (aus LaVail und Cowan, 1971a).

Während der Entwicklung des Embryos bilden sich die einzelnen Strukturen erst nach und nach aus. Am vierten Entwicklungstag (E4) hat das Tectum die Form eines dünnwandigen Vesikels auf dem Rücken des Mittelhirns. Zu diesem Zeitpunkt besteht es aus drei Zonen, einem neuralen Epithel, einer engen zellulären Zone und einer relativ zellfreien Schicht direkt unter der *Pia mater*. Die zelluläre Zone kann man dabei in zwei Schichten einteilen (I und II). Am sechsten Tag der Entwicklung (E6) kann man nur eine geringe Zunahme der Dicke beobachten, aber die Gesamtgröße nimmt beträchtlich zu. Bis zum achten Tag (E8) nimmt dann die Wanddicke aufgrund starker Zellproliferation bis zum doppelten der Dicke an E6 zu und es können nunmehr vier verschiedene Schichten zusätzlich zum neuralen Epithel unterschieden werden. Die Unterscheidung der vier Schichten erfolgt hauptsächlich aufgrund der Zell-

dichte, so sind die Schichten I, III und IV eher zellarme Schichten, in denen vor allen neurale Fortsätze (Dendriten und Axone) zu finden sind, während Schicht II und das neurale Epithel sehr dicht mit Zellen gepackt sind. Die Schichten III und IV sind zudem nur im posterioren Bereich deutlich unterscheidbar. In der Schicht IV finden sich auch die optischen Nervenfasern, sie entspricht somit dem späteren *Stratum opticum*. Zudem erkennt man eine Verlagerung des Tectums nach hinten unter gleichzeitiger Rotation der Hemisphären am anterioren Pol. Am zehnten Tag (E10) ist die Dicke auf bis zu 800 µm angewachsen und es können nicht weniger als zehn verschiedene Schichten unterschieden werden, beispielsweise das SFP (*stratum fibrosum periventriculare*, Schicht I), das SGP (*stratum griseum periventriculare*, Schicht II) und das SO (Schicht X). Zu diesem Zeitpunkt bedecken die eingewachsenen optischen Nervenfasern die gesamte ventrale und zwei Drittel der lateralen Oberfläche des Tectums. Am zwölften Tag (E12) beträgt die Dicke der Tectenwand bereits einen Millimeter und es lassen sich zwölf Schichten (ohne Ependym) unterscheiden. In den darauffolgenden Entwicklungsstadien schließt sich letztendlich die Ausdifferenzierung der einzelnen Schichten und ein damit einhergehendes Größenwachstum an, was natürlich auch mit dem Wachstum des gesamten Organismus zusammenhängt.

Einen ausführlichen Überblick über den Aufbau und die Entwicklung des optischen Tectums beim Hühnerembryo geben die Übersichtsartikel von LaVail und Cowan, 1971 (a und b), Fujiwara *et al.*, 2000, Mey und Thanos, 2000 sowie Thanos und Mey, 2001 aus denen die hier aufgeführte Beschreibung zusammengefasst wurde.

1.2 Axonale Lenkungsmoleküle

Während der Ausdifferenzierung der Neurone wachsen die Axone von ihrem Zellkörper ausgehend entlang vorgegebener Pfade ins Zielgebiet, wo sie sich mit ihrer jeweiligen Zielzelle verschalten. Die Wegfindung und Signalintegration wird über Rezeptoren, die sich auf einer spezifischen Struktur an der Spitze des auswachsenden Axons befinden, dem sogenannten Wachstumskegel, vermittelt. Der Wachstumskegel (Abbildung 1.6), der auf dem Axonschaft sitzt, besitzt eine hand-ähnliche Struktur, bei der zwischen den spitzen fingerartigen Fortsätzen (Filopodien) breite Membranlappen aufgespannt sind, die sogenannten Lamellipodien. Im Bereich der Filo- und Lamellipodien besteht das Zytoskelett hauptsächlich aus Aktinfasern, das auf einen äußeren Reiz sehr flexibel umgebaut werden kann. Dies geschieht durch rasche Polymerisation und Depolymerisation an den entsprechenden Enden. Dies kann so weit gehen, dass bei einem sehr starken repulsiven Signal sich der Wachstumskegel ganz zurückzieht und nur eine einzige fingerartige Struktur übrigbleibt, die jedoch noch an das

1. Einleitung

Substrat angeheftet bleibt. Man spricht von einem Kollaps. Bei Verlust der Adhäsion kann sich zusätzlich das komplette Axon zurückziehen oder ablösen (Mueller, 1999, Müller *et al.*, 1990).

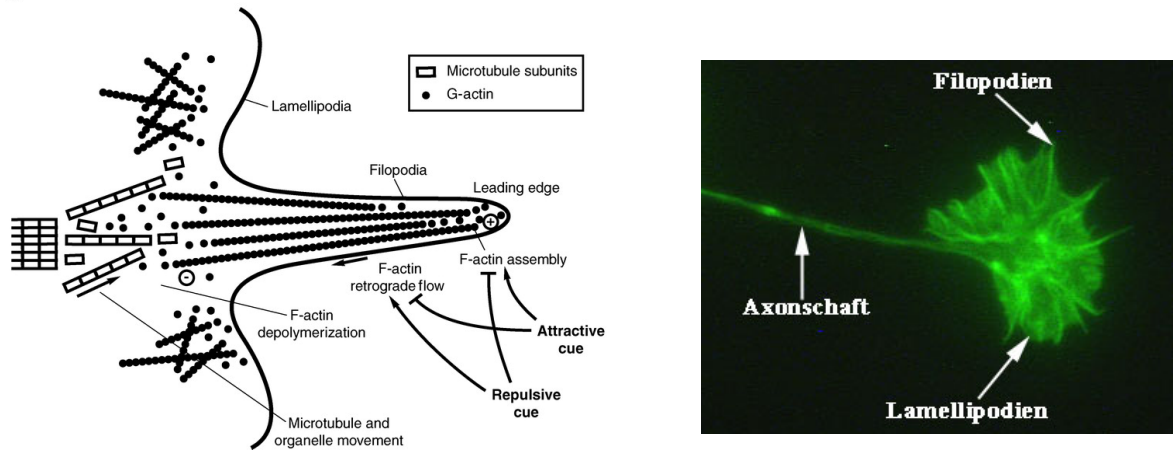


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung und Abbildung eines Wachstumskegels. Im Schema, das einen kleinen Ausschnitt eines Wachstumskegels zeigt, sind die Zytoskelettkomponenten (Mikrotubuli und F-/ G-Aktin) sowie der jeweilige Einfluss von attraktiven und repulsiven Faktoren (*cues*) auf deren Polymerisation beziehungsweise Depolymerisation dargestellt (aus Huber *et al.*, 2003). Das rechte Bild zeigt den Wachstumskegel eines auswachsenden Axons. Das Aktinzytoskelett wurde mit Alexa Phalloidin gefärbt. Filopodien, Lamellipodien und Axonschaft wurden entsprechend beschriftet.

In den letzten Jahren wurden die unterschiedlichsten Familien von Lenkungsmolekülen identifiziert und charakterisiert. Wurde anfangs noch zwischen repulsiven und attraktiven Lenkungsmolekülen unterschieden, so zeigt sich immer mehr, dass die meisten sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken können. Dies ist unter anderem davon abhängig, in welchen Konzentrationen bestimmte Moleküle, wie zum Beispiel sogenannte zyklische Nukleotide, im Inneren des Wachstumskegels vorliegen. Die hier zugrunde liegenden Mechanismen werden in Abschnitt 1.3 genauer erläutert. Dennoch unterscheiden sich die verschiedenen Lenkungsfaktoren auch anhand ihrer Wirkung. Das reicht von einer stark anziehenden Wirkung auf Axone (Hinwendung des Wachstumskegels), über ein bevorzugtes Wachsen entlang dieses Moleküls aufgrund einer abstoßenden sonstigen Umgebung (Wachstum auf permissivem Substrat), über die Abstoßung von Axonen durch eine „feindliche Umgebung“ (Wegdrehen des Kegels) bis hin zu einer echten Barrierenfunktion, bei der der Wachstumskegel dann kollabiert oder zumindest stoppt.

Die unterschiedlichen Lenkungsmechanismen wurden bereits in einem früheren Abschnitt behandelt. Zu erwähnen ist hier noch, dass die *in vivo* Situation durch eng gepackte, dicht aneinander anliegende Zellschichten, Organe etc. charakterisiert ist und eine richtige

Diffusion in den extrazellulären Bereich, der immer mit Flüssigkeit gefüllt ist, nicht ohne weiteres oder nur gerichtet möglich ist. Im folgenden sollen nun einige wichtige Familien von Lenkungsmolekülen etwas genauer betrachtet werden.

Semaphorine

Die Semaphorine gehören zu einer großen Familie phylogenetisch konservierter, sowohl sekretierter als auch membran-assoziiierter Proteine, die sowohl repulsiv als auch attraktiv wirken können. (Raper, 2000, Chen *et al.*, 1997). Dennoch bleibt ihre biologische Funktion nicht auf das Nervensystem beschränkt, da weitere Rollen im Immunsystem und bei der Entwicklung des Herzkreislaufsystems (Behar *et al.*, 1996, Feiner *et al.*, 2001, Tordjman *et al.*, 2002, Watanabe *et al.*, 2001) beschrieben wurden. Die mehr als dreißig bekannten Semaphorine besitzen alle eine konservierte N-terminale Semadomäne und können in acht Subfamilien, je nach deren strukturellen Ähnlichkeiten und Speziesherkunft (*Semaphorin Nomenclature Committee*, 1999) eingeteilt werden. Abbildung 1.7 gibt einen Überblick über die strukturellen Merkmale der verschiedenen Klassen.

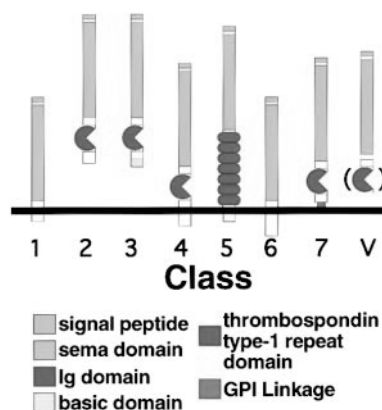


Abbildung 1.7: Die Semaphorin Familie. 1/ 2: Invertebraten Semaphorine; 3-7: Semaphorine aus Vertebraten; V: virale Semaphorine (SEMA VA ohne, SEMA VB mit IG-Domäne (in Klammern)); 1, 4, 5 und 6 sind transmembran-verankert, 2, 3 und V werden sekretiert, 7 besitzt einen GPI-Anker (aus *Semaphorin Nomenclature Committee*, 1999).

Die Semaphorine werden durch eine charakteristische sogenannte Semadomäne am N-Terminus definiert. Diese besteht aus circa 500 Aminosäuren mit 17 hoch konservierten Cysteinen. Die Einteilung der Semaphorine in acht Klassen erfolgte, wie in Abbildung 1.7 dargestellt, aufgrund der Anordnung von weiteren Domänen. Klasse 1 und 2 Semaphorine werden in Invertebraten gefunden, die Klassen 3 bis 7 in Vertebraten sowie eine weitere Klasse in Viren. In Vertebraten sind die Semaphorine der Klassen 4 bis 6 transmembran-verankert, bei den

1. Einleitung

Semaphorinen der Klasse 3 handelt es sich um sekretierte Proteine, und die Klasse 7 Semaphorine ähneln denen der Klasse 3, sind jedoch an die Zelloberfläche über einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker gebunden.

Aufgrund der strukturellen Konservierung der Semadomäne wird diese als funktionell aktive Komponente der Semaphorine betrachtet. Durch Untersuchungen anhand ausgesuchter Klasse 3 Semaphorine konnte dies direkt gezeigt werden. Dabei wurde bei verkürzten Formen, die nur die Semadomäne enthielten, eine biologische Aktivität beobachtet, sofern sie als Dimer vorlagen (Klostermann *et al.*, 1998, Koppel und Raper, 1998). Zusätzlich scheint deren biologische Spezifität auf einen relativ kurzen Bereich von Aminosäuren innerhalb der Semadomäne beschränkt zu sein. (Koppel *et al.*, 1997). Eine Verstärkung der Bindung der Klasse 3 Semaphorine an ihren Rezeptor wird über eine C-terminale Region mit basischen Aminosäuren sowie einer sich anschließenden Ig-Domäne erreicht.

Vermutlich sind alle Vertebraten Semaphorine in der Nähe der produzierenden Zellen lokalisiert. Sei es durch die Verankerung über die Transmembrandomäne oder eine Bindung der Klasse 3 Semaphorine über ihren basischen C-Terminus an Zelloberflächen oder die extrazelluläre Matrix. Dies legt eine hochspezifische kontaktvermittelte Aktivität nahe.

Seit ihrer Entdeckung wurden die Semaphorine mit der Axonlenkung in Verbindung gebracht. Dabei konnte in Antikörper Blockierungsversuchen gegen das zuerst im Grasshüpfer entdeckte Sema I (Fasciclin IV) eine Störung der Bahnen sensorischer Ti-Pionieraxone beobachtet werden. Sema I, das transmembran-verankert ist, liegt dabei benachbart zu den Axonbahnen in Streifen in der Epidermis vor (Kolodkin *et al.*, 1992). Der genaue Lenkungsmechanismus bezüglich dieser Axone ist allerdings immer noch nicht hinreichend geklärt. Sema I könnte entweder als attraktive Substanz wirken, die aufgrund ihrer Verteilung die Ti-Axone auf einem engen Streifen des Epitheliums hält. Es könnte auch im Gegensatz dazu ein repulsives Molekül sein, das bei Blockierung den Axonen eine Defaszikulierung und abnormale Ausbreitung erlaubt (Wong, 1997, Isbister, 1999). Als Rezeptoren wurden zum einen die Neuropiline (Sema 3 bindet mit hoher Affinität an Neuropilin 1 (NPN-1), Sema E und 4 an NPN-2) als auch kürzlich die Plexine (für Sema 1 und 5), welche Transmembranproteine sind, identifiziert (Rohm *et al.*, 2000).

CAM

Zelladhäsionsmoleküle (englisch *cell adhesion molecules*, CAM) der Immunglobulin (Ig) Superfamilie, wie NCAM, L1 und TAG1 sind ebenfalls an der Axonlenkung beteiligt. Sie besitzen fünf (NCAM) beziehungsweise sechs (L1, TAG1) Ig-Domänen sowie mehrere (2-5)

Fibronectin Typ III (FNIII) Domänen. Die L1 Subfamilie (L1, CHL1, Neurofascin, NrCAM, Neuroglian und Tractin) ist durch eine Transmembrandomäne in der Membran verankert und besitzt intrazellulär eine hoch konservierte Sequenz mit einer Ankyrin-Bindestelle, so dass diese Moleküle mit dem Zytoskelett verknüpft werden. Es kommen sowohl homo- (cis) wie auch heterophile (trans) Wechselwirkungen für die Aktivierung vor (Hortsch, 1996, Sonderegger, 1997). Vor allem an der korrekten Ausbildung des corticospinalen Traktes ist L1 beteiligt (Dahme *et al.*, 1997, Cohen *et al.*, 1998, Kenwrick und Doherty, 1998).

NCAM ist an Faszikulierungs-/ Defaszikulierungsvorgängen, Axonwachstum und Axonlenkung beteiligt (Doherty *et al.*, 1989, 1991a, b). Es trägt unterschiedlich lange Ketten von α 2-8 verknüpften Sialinsäuremolekülen (englisch *polysialic acid*, PSA). PSA wird auf wachsenden Axonen und migrierenden Zellen nur während der Entwicklung exprimiert und ist später nur noch in Zonen zu finden, in denen NCAM vermutlich bei der synaptischen Plastizität eine Rolle spielt. Eine Entfernung von PSA führt zu einer Erhöhung der adhäsiven Funktion von NCAM, und zu einer Inhibition der wachstumsstimulierenden Fähigkeit von NCAM (Rutishauser *et al.*, 1988). Die Glykosylierung von NCAM scheint durch die negativen sich abstoßenden Sialinsäurereste bei der Faszikulation/ Defaszikulation eine Rolle zu spielen, da bei der Faszikulation die Expression von PSA lokal niedrig ist, während sie bei der Defaszikulation hoch ist (Rutishauser, 1998).

Netrine

Eine weitere Familie von Lenkungsmolekülen sind die Netrine. Sie sind ebenfalls in Invertebraten und Vertebraten vorhanden und haben sowohl repulsive als auch attraktive Eigenschaften. Die biochemische Isolierung der Vertebraten Netrine-1 und -2 beruhte auf deren attraktiver Lenkung von commissuralen Axonen, die dadurch zur *Floor plate* hin wuchsen (Tessier-Lavigne *et al.*, 1988, Placzek *et al.*, 1990, Kennedy *et al.*, 1994, Serafini *et al.*, 1994). Sie besitzen ein Molekulargewicht von 80 kDa und sind untereinander zu 78% homolog. Gleichzeitig wurde aufgrund von Sequenzvergleichen festgestellt, dass diese eine Homologie zu dem Protein UNC-6 aus *Caenorhabditis elegans* aufwiesen. Letzteres wurde in einem Mutantenscreen identifiziert, in dem nach Genen gesucht wurde, die nach Mutation ein unkoordiniertes (engl. *uncoordinated* \Rightarrow *unc*) Zell- und Axonmigrationsverhalten verursachten. Bei Mutation des *unc-6* Gens wurde sowohl die Axonlenkung als auch die mesodermale Zellmigration gestört. Außerdem scheint die Expression von UNC-6 durch Pionieraxone eine lenkende Wirkung auf nachfolgende Axone zu haben (Ishii *et al.*, 1992, Kennedy *et al.*, 1994, Serafini *et al.*, 1994, Wadsworth *et al.*, 1996). Neben den Vertebraten Netrinen und UNC-6

1. Einleitung

aus *C. elegans* besteht die Netrin Familie unter anderem aus den *Drosophila* Netrinen A und B sowie einem einzelnen Zebrafisch Netrin. Sie weisen eine Sequenzhomologie mit Laminin auf, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, welches das Axonwachstum sehr stark stimuliert (Martin und Timpl, 1987, Tashiro *et al.*, 1991). Laminin besteht aus drei verschiedenen Ketten (α , β , γ), die kreuzförmig ein Heterotrimer bilden. Mit jeder der drei Ketten teilen die Netrine zwei Domänen, V und VI, im N-Terminus. Die Netrine sind aufgrund einer fehlenden Transmembrandomäne sekretierte Moleküle, die jedoch mit der basischen C-terminalen Domäne vermutlich an Heparin, Heparansulfat-Proteoglycane und Glykolipide der Zellmembranen und extrazellulären Matrix binden (Serafini *et al.*, 1994, MacLennan *et al.*, 1997). Ein weiteres Strukturmerkmal, das zwischen der N-terminalen Typ-IV Laminin Domäne (Domäne VI) und dem positiv geladenen C-Terminus (Domäne C, Heparin-Bindedomäne) zu finden ist, sind drei Cystein-reiche epidermale Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) Module (Domänen V1, V2 und V3). Abbildung 1.8 verdeutlicht den strukturellen Aufbau des Netrins, sowie seiner im folgenden beschriebenen Rezeptoren. Die Netrine werden von Glia- und neuronalen Zellen entlang der ventralen Mittellinie exprimiert. In Vertebraten sind die Netrine außer an der Lenkung von verschiedenen Axonpopulationen an der ventralen Mittellinie, auch an der Lenkung von corticofugalen Axonen sowie von retinalen Axonen an der optischen Scheibe (*optic disc*) beteiligt.

Im gleichen Mutantenscreen, in dem das *unc-6* Gen gefunden wurde, konnten auch zwei Rezeptoren für UNC-6 aufgrund fehlerhaften oder gestörten Axon- und Zellmigrationsverhaltens entdeckt werden: *unc-5* und *unc-40*. Besonders Mutationen im *unc-5* Gen führten zu einer Störung der dorsalen Axon- und Zellmigration, während ventrales und longitudinales Axonwachstum und Zellmigration nicht betroffen waren. Im Gegensatz dazu führten Mutationen im *unc-40* Gen zu Defekten sowohl bei dorsaler als auch ventraler Axonlenkung und Zellmigration (Hedgecock *et al.*, 1987, 1990). Bei *unc-40* handelt es sich um ein Mitglied der Ig-Superfamilie, welches ein Homologes zum humanen DCC (*deleted in colorectal cancer*) ist. Weitere Orthologe wurden in Maus, Hühnchen, *Drosophila* (*frazzled*) und *Xenopus* identifiziert (Harris *et al.*, 1996, Mitchell *et al.*, 1996, Lauderdale *et al.*, 1997, Livesey und Hunt, 1997), die alle jeweils eine starke Expression im zentralen Nervensystem, aber auch in der basalen Zellschicht vieler Epithelien, wie etwa Darm, Haut, Lunge und Blase, aufwiesen.

DCC ist ebenfalls ein Transmembranprotein mit einem extrazellulären Bereich, der aus vier Immunglobulin (Ig) Domänen und sechs Typ III Fibronectindomänen (FNIII-Domänen) besteht, sowie einer zytoplasmatischen Domäne ohne Homologie zu anderen Proteinen. Der Aufbau ist in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt.

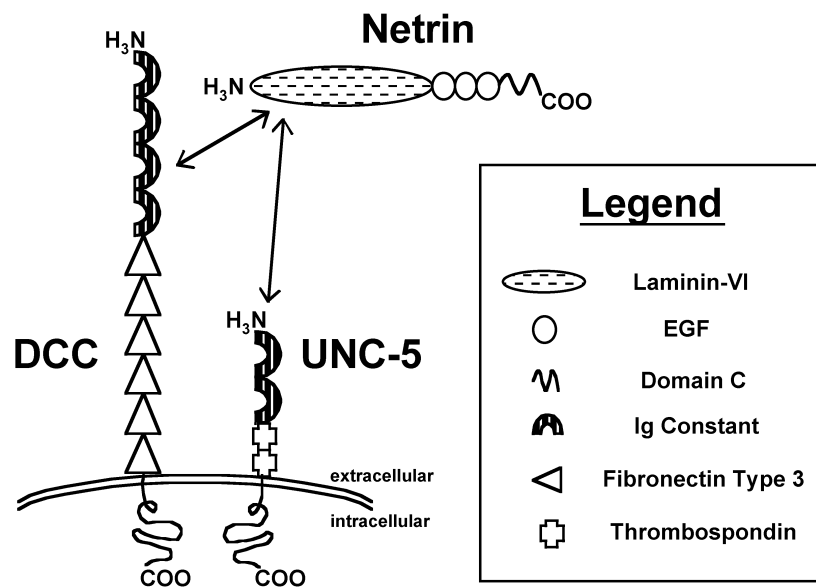


Abbildung 1.8: Struktureller Aufbau von DCC, UNC-5 und Netrin. DCC besteht aus vier Ig-Domänen und sechs FNIII-Domänen, die zusammen den extrazellulären Teil bilden. Es folgen ein einzelner Transmembrandurchgang sowie eine zyttoplasmatische Domäne. Der strukturelle Aufbau von Neogenin entspricht dem des DCC. UNC-5 besitzt extrazellulär zwei Ig-Domänen, gefolgt von zwei Thrombospondin-Domänen. Es schließen sich wiederum ein einzelner Transmembrandurchgang sowie die zyttoplasmatische Domäne an. Netrin ist ein sekretiertes, lösliches Protein mit einer N-terminalen Laminin-VI Domäne, drei aufeinanderfolgenden EGF-Domänen sowie der C-terminalen Heparin-Bindestelle (Domain C) (aus Geisbrecht *et al.*, 2003).

Zusätzlich existiert noch ein verwandtes Protein (50% Homologie zu DCC) mit gleicher Domänenstruktur, Neogenin genannt, das im Nervensystem des Hühnchens gefunden wurde (Vielmetter *et al.*, 1994), und das aufgrund seiner Bindung von Netrin-1 ebenfalls für einen Rezeptor gehalten wird (Keino-Masu *et al.*, 1996). Die sowohl attraktive als auch repulsive Lenkung durch Netrine wird im wesentlichen durch die Rezeptorzusammensetzung bestimmt; so wurde für commissurale Axone eine Attraktion aufgrund der DCC/ UNC-40 Signaltransduktion nachgewiesen (Keino-Masu *et al.*, 1996, Stein *et al.*, 2001). Andere Populationen werden durch einen Rezeptorkomplex aus DCC und UNC-5 abgestoßen. Dies wurde zum Beispiel durch *gain of function* Experimente nachgewiesen, bei denen eine Coexpression von UNC-5 in *Xenopus* Rückenmarksneuronen, die dieses Molekül normalerweise nicht exprimieren, zu einer Repulsion durch Netrin-1 führte, statt wie gewohnt zu einer Attraktion (Hong *et al.*, 1999). UNC-5 ist ebenfalls ein Transmembranprotein, das im extrazellulären Teil aus zwei Ig-Domänen sowie zwei sich anschließenden Thrombospondindomänen besteht. Es folgen entsprechend der Darstellung in Abbildung 1.8 ein einzelner Membrandurchgang sowie eine zyttoplasmatische Domäne. Weitere Rezeptoren der Netrine schließen in Vertebraten die Homologen UNC-5H1, -5H2, -5H3/ RCM und -H4 (Engelkamp, 2002, Leonardo *et al.*, 1997,

1. Einleitung

Przyborski *et al.*, 1998), beziehungsweise in *C. elegans* UNC-40 und UNC-5, sowie in *Drosophila* Frazzled ein. Strittig ist die Funktion des Adenosin A2b Rezeptors als Netrin-Rezeptor (Corset *et al.*, 2000, Stein *et al.*, 2001). Ebenso konnte für Neogenin bisher keine Signaltransduktion aufgrund der Netrin-Bindung nachgewiesen werden. Es wurde lediglich außerhalb des Nervensystems von einer Stabilisierung multipotenter Vorläufer-Drüsenzellen während der Brustdrüsenmorphogenese aufgrund der Netrin-1/ Neogenin Interaktion berichtet (Srinivasan *et al.*, 2003).

RPTP

Ebenfalls zur Ig Superfamilie gehören Rezeptoren, die eine Phosphatase-Aktivität (Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatasen, RPTP) besitzen. Diese haben eine Wirkung auf die Axonlenkung, dadurch dass sie die phosphorylierten Substrate dephosphorylieren und somit den Spiegel an phosphorylierten Substraten sehr niedrig halten (Walsh und Doherty, 1997). Dies bewirkt eine Erhöhung der Sensitivität für ein Phosphorylierungssignal, zum Beispiel bei Stimulation der Rezeptor Tyrosin Kinasen.

Ephrine

Ein Beispiel für die Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK) sind die Eph Rezeptoren, die zugleich mit 15 Mitgliedern die größte Familie der RTK darstellen (Drescher, 1997, Drescher *et al.*, 1997, *Eph Nomenclature Committee*, 1997, Gale und Yancopoulos, 1997). Man unterscheidet dabei zwischen EphA und EphB Rezeptoren, die im extrazellulären Teil durch eine Ig-ähnliche Domäne, eine hoch konservierte Cystein-reiche Region und zwei FNIII-Domänen und in der zytosolischen Region durch eine einzelne katalytische Tyrosin Kinase Domäne charakterisiert werden (Gale und Yancopoulos, 1997, Pandey *et al.*, 1996). Die Liganden der Eph Rezeptoren sind die Ephrine, wobei die EphA Rezeptoren bevorzugt mit den GPI-verankerten Ephrinen (Ephrin-A1 bis -A6 (Menzel *et al.*, 2001)) interagieren und die EphB Rezeptoren mit den B Ephrinen (Ephrin-B1 bis -B3), die membranverankert sind und eine circa 100 Aminosäuren große, zytoplasmatische Domäne besitzen (Frisen und Barbacid, 1997). Die Aktivierung der Rezeptoren unterscheidet sich von der anderer RTK und scheint wesentlich langsamer zu verlaufen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass dafür erst Multirezeptoraggregate gebildet werden müssen. Die Ephrine sind in monomerer Form inaktiv und benötigen eine Membranverankerung oder eine künstliche Clusterbildung, um aktiv zu sein (Davis *et al.*, 1994). Die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung ist in beiden Klassen nicht eindeutig durch genau charakterisierte Ligand-Rezeptor Paare gekennzeichnet. Man spricht vielmehr von einem promiskuitiven Verhalten, das heißt alle B-Ephrine binden an alle EphB-Rezeptoren

und alle A-Ephrine an alle EphA-Rezeptoren jedoch mit jeweils unterschiedlicher Bindungsstärke. Die Bindung erfolgt über die N-terminale globuläre Domäne und die Stabilisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes über die Cystein-reiche Domäne (Labrador *et al.* 1997).

Die Ephrine und Eph Rezeptoren sind an einer Vielzahl von Prozessen in der Entwicklung von Vertebratenembryonen beteiligt, vor allem bei der Ausbildung topographischer Karten (Cheng *et al.*, 1995, Drescher *et al.*, 1995, Nakamoto *et al.*, 1996, Brennan *et al.*, 1997, Monschau *et al.*, 1997, Frisen *et al.*, 1998), bei der Ausbildung von Vorder- und Hinterhirn (Xu *et al.*, 1995, 1996), sowie bei der Bildung von verschiedenen Kommissuren (Henkemeyer *et al.*, 1996, Orioli *et al.*, 1996, Park *et al.*, 1997). Auf zellulärer Ebene wirken die Ephrine als kontaktvermittelte repulsive Faktoren für retinale, motorische und corticale Axone sowie Neuralleistenzellen (Drescher *et al.*, 1997).

Im retinotectalen System besonders gut untersucht sind die Ephrine-A2 und -A5 (Cheng *et al.*, 1995, Drescher *et al.*, 1995, Nakamoto *et al.*, 1996, Monschau *et al.*, 1997), die während der Ausbildung dieses Systems als Gradienten im Tectum vorliegen. Dabei ist die höchste Konzentration im posterioren Tectum zu finden. Der zugehörige EphA3-Rezeptor wird auf den retinalen Ganglienzellen exprimiert und entsprechend der contralateralen Projektion in Form eines Gradienten mit hoher temporaler und niedriger nasaler Konzentration (Cheng *et al.*, 1995). Zwar sind auch noch zwei weitere Eph Rezeptoren auf den RGC zu finden, allerdings nicht mit einer gradierten Expression. Die Expression des Ephrin-A2 zieht sich etwas mehr zum anterioren Pol des Tectums hin im Gegensatz zum Ephrin-A5, welches eher auf den posterioren Bereich beschränkt ist. Bezüglich der Rezeptoraffinität bindet Ephrin-A5 circa 10-mal stärker als Ephrin-A2 (Monschau *et al.*, 1997).

Anhand dieser Daten wurde ein Modell entworfen, nach dem die temporalen Axone mit hoher Rezeptorkonzentration schon bei niedrigen Ligandkonzentrationen (anteriores Tectum) abgestoßen werden und somit nicht weiter zum posterioren Pol wachsen. Nasale Axone mit einer niedrigen Rezeptorkonzentration sind gegenüber den niedrigen Ligandkonzentrationen im anterioren Tectum nicht sensitiv genug und wachsen somit bis zum posterioren Pol (Drescher *et al.*, 1997). Bei einer Knockout-Studie in Mäusen mit Ephrin-A5 (Frisen *et al.*, 1998) konnte dies zum Teil gezeigt werden, da ein Teil der temporalen Fasern zu falschen Orten des posterioren Tectums (*superior colliculus*) projizierte und einige sogar das Tectum verließen und im *inferior colliculus* endeten, der normalerweise hohe Konzentrationen an Ephrin-A5 exprimiert (Nakamoto, 2000, Feldheim *et al.*, 2000, Frisen *et al.*, 1998). Dennoch wurden auch bei Ephrin-A2 und -A5 Doppelknockout-Mäusen immer noch temporale Fasern mit korrekter Projektion beschrieben, was auf das Vorliegen weiterer Lenkungsmoleküle deutet.

1. Einleitung

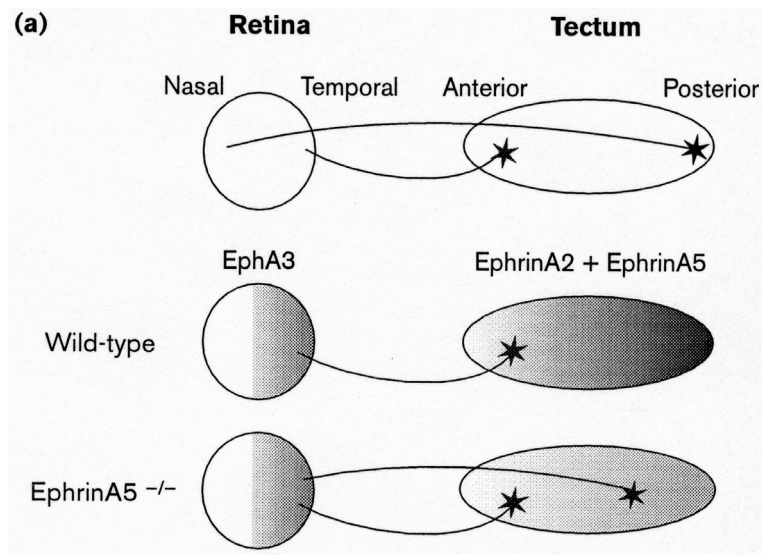


Abbildung 1.9: Einfluss der Ephrine auf die retinotectale Projektion. Nasale Axone projizieren ins posteriore Tectum, temporale ins anteriore. Im Wildtyp erfolgt die Ausbildung dieser topographischen Karte unter anderem aufgrund gegenläufiger Gradienten von Rezeptor (EphA3 auf den Axonen) und Ligand (Ephrine-A2 und -A5 im Tectum). Die Entfernung eines Liganden aus dem System (Ephrin-A5^{-/-}) führt zum Teil zu falschen Projektionen (aus Mellitzer *et al.*, 2000).

Die Wechselwirkung zwischen den Ephrinen und ihren Rezeptoren basiert auf den folgenden Vorgängen. Nach Bindung des Ligandenkomplexes kommt es zur Aggregation von Rezeptoren mit anschließender Autophosphorylierung der Tyrosinreste, wodurch eine spezifische Bindestelle für SH2-Domänen von Zielproteinen erzeugt wird (Schlessinger und Ullrich, 1992). Die Signaltransduktion erfolgt dann über die kleinen GTP-bindenden Proteine, die später noch beschrieben werden. Allerdings sind auch hierbei die genauen Interaktionspartner noch nicht bekannt. Interessanterweise wurde aber nicht nur bei den Rezeptoren eine Aktivierung beobachtet, sondern bei den Liganden (zumindest den B Ephrinen) wurde ebenfalls eine Phosphorylierung, und zwar durch andere RTK, festgestellt. Man spricht in diesem Fall von bidirektionalen Signalwegen (englisch *bidirectional signaling*) (Henkemeyer *et al.*, 1996, Holland *et al.*, 1998, Brückner *et al.*, 1997).

Dennoch scheinen auch noch andere Faktoren an der Ausbildung der topographischen Karten beteiligt zu sein, wie etwa RGM (*repulsive guidance molecule*), welches ein ähnliches Gradientenmuster im Tectum zeigt und in *in vitro* Tests analog wirkt, allerdings in wesentlich geringeren Konzentrationen (Müller *et al.*, 1990, Monnier *et al.*, 2002).

Ein Teil der Charakterisierung von RGM sowie die Identifizierung und Charakterisierung seines potentiellen Rezeptors wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

RGM

RGM, das *repulsive guidance molecule*, wurde erstmals 1990 als ein 33 kDa Glykoprotein beschrieben (Müller *et al.*, 1990, Stahl *et al.*, 1990). In diesen Versuchen wurde spezifisch nach Molekülen gesucht, die auf der Grundlage der bereits beschriebenen Gradiententheorie eine gradierte Expression im Tectum mit einer hohen posterioren und niedrigen anterioren Konzentration aufwiesen. *In vitro* Versuche zur Axonlenkung (Kollaps- und Streifentest) mit den biochemisch isolierten Molekülen zeigten eine starke repulsive Aktivität. Dies wurde zum einen durch Kollaps temporaler Axone, wie auch die Vermeidung von Streifen, welche das Molekül enthielten, gezeigt. Weiterhin konnte für das 33 kDa Molekül eine Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Verankerung durch PI-PLC Behandlung nachgewiesen werden. Das Protein wurde nach PI-PLC Behandlung im Überstand und nicht mehr in der Membranfraktion gefunden und gleichzeitig wurde durch die Aufhebung der biologischen Aktivität nach PI-PLC Behandlung die repulsive Eigenschaft bewiesen. Ein weiterer Beleg hierfür war die Aufhebung der Entscheidung temporaler Axone im Streifentest durch Antikörper, die gegen posteriore Membranen erzeugt worden waren.

Immunfärbungen, durchgeführt mit einem gegen dieses Molekül erzeugten monoklonalen Antikörper zeigten im weiteren Verlauf der Untersuchungen eine gradierte Verteilung von RGM im Tectum, mit ebenfalls starkem posterioren und schwachem anterioren Signal. Außerdem konnte in CALI (*chromophore assisted laser inactivation*) Experimenten, bei denen durch Laserinaktivierung mittels eines an den Antikörper gekoppelten Farbstoffes (Malachitgrün), das entsprechende Antigen spezifisch zerstört wird, eine Aufhebung der Entscheidung im Streifentest gezeigt werden (Müller *et al.*, 1996). Die spezifische Anreicherung und Aufreinigung des 33 kDa Moleküls, sowie eine sich anschließende Proteinmikrosequenzierung ergaben Peptidsequenzen anhand derer mit degenerierten Primern eine cDNA (englisch *complementary deoxyribonucleic acid*) Bibliothek durchsucht wurde. Schließlich wurde eine vollständige Sequenz für das RGM erhalten (Monnier *et al.*, 2002). *In situ* Hybridisierungen, Northern und Western Blots, Streifen- und Kollapstests, N-terminale Sequenzierung rekombinant exprimierter Proteine, sowie der Datenbankabgleich inklusive Sequenz-, Struktur- und Domänenanalyse führten dann zur vollständigen Charakterisierung dieses repulsiven Lenkungsmoleküls. Der Beitrag zur Klonierung und Charakterisierung von RGM und dessen Rezeptor im Rahmen dieser Arbeit ist im Ergebnis- und Diskussionsteil beschrieben.

1.3 Signaltransduktion

Wie bereits mehrfach erwähnt, hat der „innere Zustand“ eines Wachstumskegels einen großen Einfluss auf die Lenkung von Axonen. Der Begriff innerer Zustand bedeutet hier vor allem unterschiedliche Konzentrationen bestimmter Faktoren, die an den Signalwegen beteiligt sind, sogenannten *second messengern*. Die wichtigsten daran beteiligten Signalmoleküle sind dabei Ca^{2+} -Ionen, Inositol-1,4,5-Triphosphate (IP_3) sowie die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP (Ming *et al.*, 1997, Song *et al.*, 1998, Hong *et al.*, 2000).

Die regulierende Rolle von Ca^{2+} beim Axonwachstum wurde sowohl durch *in vitro* als auch *in vivo* Daten bezüglich der inversen Korrelation von Wachstumsrate und der Frequenz der Ca^{2+} -Ströme gezeigt. So ist der Kollaps von Wachstumskegeln zum Teil mit einem starken Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration korreliert, während ein niedriger extrazellulärer Ca^{2+} -Spiegel die Auswuchsrate von Axonen häufig erhöht (Gomez und Spitzer, 1999). Weiterhin kann die durch Netrin-1, Acetylcholin, BDNF oder MAG induzierte Lenkungsantwort durch Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} unterdrückt werden, die von NT-3 oder Sema III allerdings nicht. Viele Signalwege können durch Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran oder durch Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Speichern die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöhen (etwa durch NCAM- oder L1-Signalwege oder durch Inositol-1,4,5-Phosphat (IP_3)) (Berridge, 1998). Die Transduktion von Calciumsignalen erfolgt durch Calmodulin (CaM) und CaM-abhängige Kinasen. Ein weiteres wichtiges Molekül, auf welches Calciumsignalwege wirken, ist die Adenylatcyclase. Typ I- und Typ VIII- Adenylatcyclasen werden *in vivo* durch Ca^{2+} und Calmodulin aktiviert, um cAMP zu produzieren (Xia und Storm, 1997).

Auch die zyklischen Nukleotide besitzen eine wichtige Rolle bei der Umsetzung der durch Lenkungsmoleküle ausgesendeten Signale. Vor allem die intrazelluläre Konzentration der zyklischen Nukleotide entscheidet über attraktive oder repulsive Lenkung. Man unterscheidet hierbei zwei Gruppen von Lenkungsmolekülen, und zwar jene, bei denen cAMP eine Rolle spielt, wie etwa Acetylcholin, BDNF, Netrin-1, MAG, NGF und zum anderen diejenigen, bei denen cGMP die Lenkung beeinflusst, nämlich beispielsweise Sema 3 und NT-3 (Song und Poo, 1999). Die kompletten Signaltransduktionswege sind allerdings noch nicht bekannt, es konnten lediglich einige Faktoren bestimmt werden, mit denen man relativ gut Untersuchungen durchführen konnte.

Festzuhalten bleibt, dass bei der Gruppe I (cAMP-Gruppe) eine Erniedrigung des cAMP-Spiegels zu einer Repulsion führt, wohingegen eine Erhöhung der cAMP-Konzentration eine Attraktion vermittelt. Analog dazu reagieren die Axone auf die Veränderungen in der cGMP-

Konzentration bei Molekülen der Gruppe II: Erhöhung führt zu Attraktion, Senkung der Konzentration zu Repulsion. Die Modulation der Konzentrationen von zyklischen Nukleotiden kann dabei über viele verschiedene Signale erfolgen. So erniedrigt zum Beispiel die Aktivierung von Integrinen die intrazelluläre cAMP-Konzentration (O'Connor *et al.*, 1998), was wiederum darauf hinweist, dass verschiedene Substrate die Lenkungsantwort unterschiedlich beeinflussen können. Dies wurde zum Beispiel für Laminin berichtet, bei dessen Verwendung, an Stelle von Polylysin, die attraktive Wirkung von Netrin-1 und BDNF auf kultivierte retinale Axone in eine Repulsion umgewandelt wurde (Song *et al.*, 1997, Song und Poo, 1999). Der cAMP-Effekt wird durch die Protein-Kinase A (PKA) vermittelt. Substrate für die PKA sind dabei unter anderem die IP₃-Rezeptoren, wie auch Zytoskelett-assoziierte Proteine. So beendet die PKA-abhängige Phosphorylierung von RhoA, einem Mitglied der kleinen GTP-bindenden Proteine, die an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind, das RhoA-Signal (Lang *et al.*, 1996).

Zwei verschiedene Klassen von Guanylat-Cyclasen sind für die Synthese von cGMP verantwortlich. Die löslichen heterodimeren Guanylatcyclasen lassen sich durch die Bindung von gasförmigen Molekülen wie etwa Stickoxid (NO) oder Kohlenmonoxid aktivieren. Die membrangebundenen Rezeptor-Guanylatcyclasen werden durch die Bindung von Liganden oder durch Ca²⁺ aktiviert. NO und cGMP wurden als wesentliche Faktoren für die Etablierung der zentralen Verbindungen von sich entwickelnden retinalen und olfaktorischen Axonen diskutiert. Die Vermittlung der cGMP-Effekte erfolgt durch die Protein-Kinase G (PKG), einer Serin-Threonin-spezifischen Kinase, deren Substrate unter anderem das G-Protein G_i und der Typ I IP₃-Rezeptor sind (Haug *et al.*, 1999, Foster *et al.*, 1999).

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Teil der bisher untersuchten Moleküle sowohl Attraktion als auch Repulsion ausgelöst haben, eine eindeutige Zuordnung also nicht möglich ist. Für die unterschiedliche Reaktion, Attraktion oder Repulsion, sind noch zusätzliche Informationen notwendig, die durch extra- und intrazelluläre Bedingungen bestimmt werden.

Ein wichtiges Glied in der Kette der Signalintegration stellt hierbei der Umbau des Zytoskeletts dar. Hier wurde in den letzten Jahren eine wichtige Gruppe von Molekülen erforscht, deren Beeinflussung direkte Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett hat, die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Subfamilie (Rho-ähnliche GTPasen) (Hall, 1998). Sie bilden eine Subfamilie der Ras-Familie von kleinen GTP-bindenden Proteinen. Die GTPasen dienen dabei als sogenannte molekulare Schalter, die zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand hin und her pendeln. Der Austausch von GDP gegen GTP und somit die Aktivierung wird durch die GEF (englisch *guanine nucleotide-*

1. Einleitung

exchange factors) katalysiert. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität wird dann das GTP in GDP und anorganisches Phosphat (P_i) gespalten und das Protein somit inaktiviert (Hall, 1994). Als Aktivatoren für die GTPase dienen die sogenannten GAP (englisch *GTPase-activating proteins*). Schließlich stabilisieren die GDI (englisch *guanine nucleotide dissociation inhibitors*) noch die GDP-gebundene, inaktive Form und verhindern desweiteren die Translokation der RhoGTPasen an die Plasmamembran.

Für jede dieser unterschiedlichen Faktoren sind mehrere Vertreter bekannt, aber die genauen Zusammenhänge sind noch nicht vollständig geklärt. Man kennt auf jeden Fall die Funktionen der kleinen GTP-bindenden Proteinfamilien Rho, Rac und Cdc42. So reguliert Rho die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionsstellen in Fibroblasten, während Rac1 die Bildung von Lamellipodien und Cdc42 die Bildung von Filopodien reguliert (Nobes und Hall, 1995). Durch Expression von dominant-negativen Formen von Rac1 und Cdc42 hat man wesentliche Defekte in der Axonlenkung und Zellmigration in verschiedenen Systemen, etwa *Drosophila* und Maus induziert. Durch die beobachteten Effekte wurde postuliert, dass Rac1 und Cdc42 unter dem Einfluss von attraktiven Lenkungsmolekülen stehen, da die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien für den Wachstumskegel des wachsenden Axons charakteristisch ist. RhoA-Aktivierung steht nach dieser Theorie unter dem Einfluss von repulsiven Lenkungsmolekülen, da der Rückzug von Lamellipodien und Filopodien charakteristisch für den Kollaps des Wachstumskegels ist (Hall, 1998, Mueller, 1999).

Bevor bei allen Detailbetrachtungen die Mechanismen des Gesamtsystems begriffen werden, bedarf es auf jeden Fall der Beantwortung noch vieler Fragestellungen. Einen Beitrag dazu liefern die in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellten Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurden.

2. Aufgabenstellung

Die Ausbildung des Nervensystems ist ein wesentlicher Bestandteil der Embryonalentwicklung. Dabei wachsen die Axone von ihrem Ursprung zu den jeweiligen Zielzellen entlang vorgegebener Wege. Die Wegfindung wird von den an der Spitze der auswachsenden Axone liegenden Wachstumskegeln sichergestellt. Sie benutzen die als Wegweiser fungierenden axonalen Lenkungsmoleküle zur Orientierung. Die Lenkungssignale werden durch entsprechende Rezeptoren, die sich auf den Wachstumskegeln befinden integriert und mittels *second messenger* Systemen weitergeleitet.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Molekülen, die an diesen Lenkungsvorgängen beteiligt sind, identifiziert und charakterisiert. Dabei wurden sowohl die außerhalb der Zellen vorkommenden Liganden, Rezeptoren und Substrate untersucht, als auch die innerhalb der Zelle beteiligten Moleküle, die zum einen die Signale weitergeben und zum anderen das gegebene Signal umsetzen, zum Beispiel am Zytoskelettbau beteiligte Proteine.

Ein besonders intensiv untersuchtes System zur Identifizierung von Liganden und deren Rezeptoren ist das der retinotectalen Projektion, insbesondere beim Hühnerembryo. Anhand dieses Systems wurden wesentliche Entdeckungen bezüglich der Ausbildung von sogenannten topographischen Karten gemacht als auch grundlegende *in vitro* Testsysteme, die auch auf andere System übertragbar waren, entwickelt (Walter *et al.*, 1987a,b, Cox *et al.*, 1990, Raper und Kapfhammer, 1990).

Neben den Ephrinen und Eph Rezeptoren, die im retinotectalen System zum Teil vorkommen, wurde bereits 1990 ein weiteres, 33 kDa großes Molekül mit repulsiver Wirkung auf temporale Axone gefunden (Stahl *et al.*, 1990). Die biochemische Aufreinigung und Proteinmikrosequenzierung führte schließlich zu verschiedenen Peptidsequenzen, anhand derer mittels degenerierter Primer eine DNA-Sequenz aus einer cDNA-Bibliothek gewonnen werden konnte.

Eine Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit war die Beteiligung an der weiteren Charakterisierung dieses repulsiven Lenkungsmoleküls (englisch *repulsive guidance molecule*, RGM). Hierzu sollten vor allem mittels molekularbiologischer Techniken (*In situ* Hybridisierung und Northern Blot Analyse) sowie Immunhistochemie die zeitlichen und örtlichen Expressionsmuster untersucht werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch auf der Identifizierung und Charakterisierung von RGM-bindenden Molekülen beziehungsweise möglicher Rezeptoren.

2. Aufgabenstellung

Hierzu war es zunächst erforderlich geeignete Werkzeuge in Form von RGM-Sonden herzustellen. Diese sollten in Gestalt von Fusionsproteinen aus RGM und alkalischer Phosphatase zur Verfügung stehen. Zudem war die Etablierung geeigneter Techniken und Protokolle zur spezifischen Detektion der Fusionsproteine notwendig. Hierzu sollten alkalische Phosphatase Tests, zelluläre und biochemische Bindungstestsysteme sowie spezifische Immundetektionssysteme verwendet werden.

Für die Identifizierung und Isolierung der RGM-bindenden Moleküle sollten zwei Strategien verfolgt werden. Der erste Ansatz sollte ein biochemischer sein, bei dem das entsprechende Gewebe homogenisiert, Membranen aufgereinigt und darin befindliche Moleküle spezifisch detektiert beziehungsweise herausgefischt werden. Da sich im Verlauf dieser Versuche herausstellte, dass eine biochemische Aufreinigung und Anreicherung spezifisch detektierter und gebundener Moleküle nicht in greifbare Nähe rückte, sollten im zweiten Ansatz durch molekularbiologische Techniken Expressionsbibliotheken durchsucht werden.

Im abschließenden Teil der Arbeit sollten die identifizierten Moleküle charakterisiert und die Wechselwirkung mit RGM sowie eine mögliche Funktion als RGM-Rezeptor untersucht werden. Hierzu sollten die Spezifität der Bindung, die Bindungsstärke, ein Vergleich der Expressionsmuster von RGM und des potentiellen Rezeptors sowie eventuelle funktionelle Eigenschaften des Kandidatenproteins auch im Vergleich zu anderen Lenkungsmolekülen untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1 Northern Blot Analyse der RGM Expression im Tectum des Hühnerembryos und im Hippocampus der Ratte

Die Expression der Lenkungsmoleküle ist in den einzelnen Geweben jeweils auf die Zeit kurz vor der Auswuchsphase bis einschließlich kurz nach Abschluss der Projektionsbildung beschränkt. Deshalb kann man durch Northern Blot Analysen die mRNA- (englisch *messenger ribonucleic acid*) Expression und damit die vermeintliche Proteinexpression überprüfen. Für RGM wurden entsprechende Northern Blots mit verschiedenen Entwicklungsstadien der retinotectalen Projektion und der entorhinalen Projektion des Hippocampus durchgeführt.

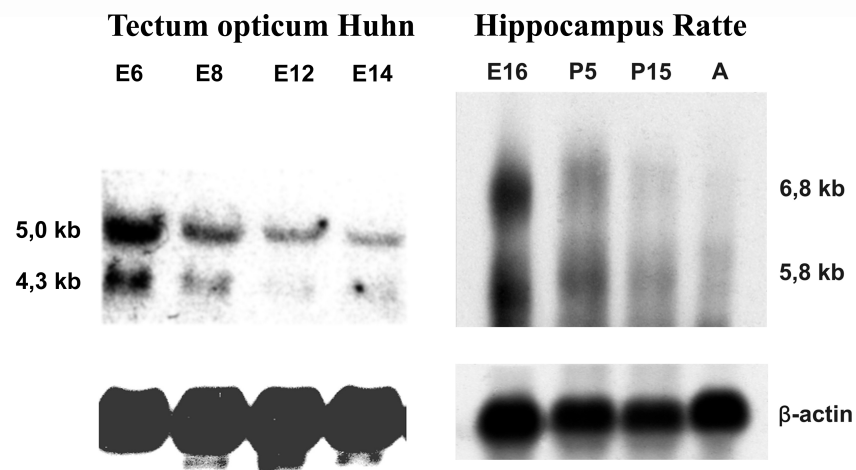


Abbildung 3.1: Northern Blots mit RGM *antisense* Proben. RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien aus dem Hühnertectum sowie dem Hippocampus der Ratte wurde im Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran überführt und mit *antisense* Proben spezifisch detektiert. Eine entwicklungsabhängige Expression mit anschließender Abnahme der RGM mRNA Konzentration ist für beide Systeme zu erkennen. Als Kontrolle einer gleichmäßigen RNA-Konzentration wurde β-Actin *antisense* Probe verwendet.

Abbildung 3.1 zeigt die entwicklungsabhängige RNA-Expression von RGM sowohl für die retinotectale Projektion als auch im Hippocampus. Man erkennt sehr gut, dass die Expression im Anschluss an die Ausbildung der Projektionen wieder herunter reguliert wird und verschwindet. Dies entspricht den Erwartungen, dass das Signal nur für einen bestimmten Zeitverlauf während der Entwicklung und Ausbildung der Systeme erscheint. Zusätzlich ist zu beobachten, dass in beiden Systemen jeweils zwei Banden unterschiedlicher Größe spezifisch detektiert werden. Es handelt sich dabei vermutlich um Splicevarianten des RGM.

3.2 In situ Hybridisierung und Immunfärbung von RGM mRNA und Protein im Hühnertectum

Die Ausbildung von sogenannten topographischen Karten, bei denen benachbarte Zellen der Ursprungsregion auf benachbarte Zellen des Zielgebiets projizieren, basiert wahrscheinlich zu einem wesentlichen Teil auf der axonalen Lenkung mit Hilfe komplementärer Gradienten. Wie bereits in der Einleitung am Beispiel der Ephrine-A2 und -A5 und des EphA3 Rezeptors dargestellt, gibt es dabei im Zielgebiet einen ansteigenden Gradienten eines repulsiven Moleküls und auf den einwachsenden Axonen einen ansteigenden Rezeptorgradienten in umgekehrter Richtung der Projektion. Der Grundgedanke dabei ist, dass nasale Axone mit einer niedrigen Rezeptorexpression bis ins posteriore Tectum wachsen, wo eine hohe repulsive Ligandenkonzentration vorliegt. Die äußersten temporalen Axone hingegen, auf denen die Konzentration sensitiver Rezeptoren am höchsten ist, wachsen nur bis zum vordersten anterioren Pol des Tectums, da sie bereits auf kleinste Mengen an repulsivem Signal reagieren. Entsprechend den gegenläufigen Gradienten von Rezeptor und Ligand, die bei den Eph Rezeptoren zusätzlich durch die Modulation der Sensitivität aufgrund einer gradierten Phosphorylierung verstärkt werden (Hornberger *et al.*, 1999), projizieren die dazwischenliegenden RGC in das entsprechende Gebiet, bis die Axone das repulsive Signal detektieren und zurückgestoßen werden.

RGM war ursprünglich auf der Suche nach Signalen, die spezifisch temporale Axone inhibieren, als repulsives Protein identifiziert worden (Stahl *et al.*, 1990) und Immunfärbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen RGM zeigten ebenfalls einen Gradienten auf Proteinebene (Mueller, 1997). Zusätzlich konnte in *in vitro* Inaktivierungsversuchen mittels CALI (*chromophore assisted laser inactivation*, Mueller 1996) eine Aufhebung der Lenkung durch RGM gezeigt werden und auch Daten von Ephrin-A Knockout Mäusen, bei denen das Mapping entlang der anteroposterioren Achse zum Teil betroffen ist (Frisen *et al.*, 1998, Feldheim *et al.*, 1998, 2000), wiesen darauf hin, dass neben den Ephrinen weitere Moleküle beteiligt sein müssen. Daher wurden nach der Sequenzidentifizierung von RGM *in situ* Hybridisierungen an Schnitten durch das Tectum des Hühnerembryos durchgeführt. Mit RGM spezifischen Sonden wurde die örtliche Expression der RGM mRNA vor allem am Entwicklungsstadium E8/ E9 untersucht, also zu dem Zeitpunkt, an dem die Axone auf der Oberfläche des Tectums zum jeweiligen Zielort auswachsen. Als Kontrolle wurden *sense* Proben verwendet, die keinerlei Signal zeigten. Außerdem wurde durch DAPI-Färbung der Zellkerne die Verteilung der RGM produzierenden Zellen untersucht.

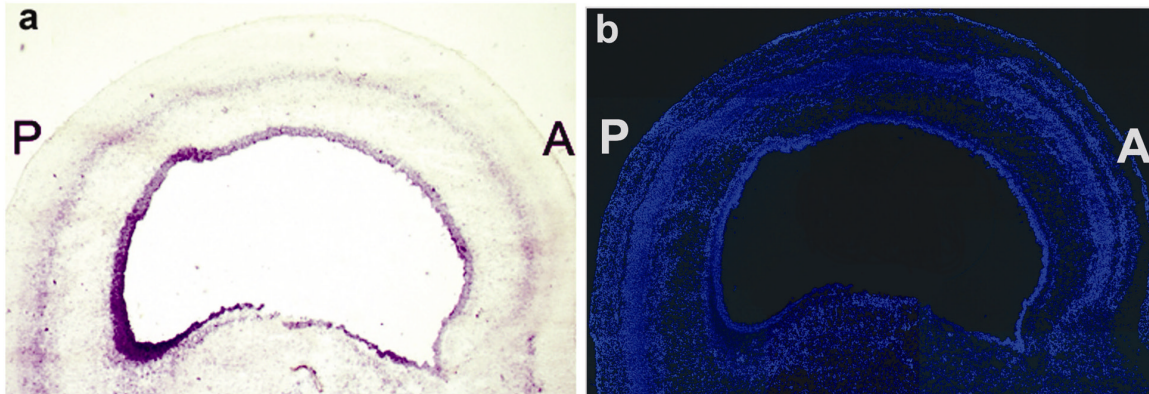


Abbildung 3.2: Gradierte Expression von RGM im optischen Tectum des Hühnerembryos (Stadium E9). a: *In situ* Hybridisierung mit RGM-spezifischen *antisense* Proben zeigt eine starke Färbung der periventrikulären Schicht sowie ein schwächeres Signal in einer darüber liegenden Schicht. Die Färbung in der periventrikulären Schicht weist eine graduierte Verteilung mit hohem posterioren (P) sowie niedrigem anterioren (A) Signal auf. b: Zellkernfärbung desselben Tectums. Die Abbildung ist beispielhaft für analog erhaltene Färbungen (aus Monnier *et al.*, 2002).

Abbildung 3.2 zeigt beispielhaft die Färbung aufgrund von *in situ* Hybridisierungen mit RGM spezifischen Proben auf einem Gewebeschnitt des optischen Tectums im Stadium E9. In den Hybridisierungen konnte eine graduierte Verteilung mit einem hohen posterioren und niedrigen anterioren Signal detektiert werden. Dabei wurde vor allem eine starke Färbung in der periventrikulären Schicht, welche den tectalen Ventrikel umgibt, detektiert. Zusätzlich wurde eine schwächere Färbung in einer darüber liegenden Schicht detektiert. Eine DAPI-Färbung der Zellkerne ergab, dass die Zelldichte in der periventrikulären Schicht konstant ist. Diese Beobachtung impliziert, dass der Gradient durch eine differenzielle Expressionsrate zu Stande kommt und nicht durch eine unterschiedliche Zelldichte von RGM exprimierenden Zellen.

Zusätzlich wurden Antikörperfärbungen mit unterschiedlichen Antikörpern gegen verschiedene Peptide des RGM Proteins durchgeführt. Man erkennt in den Stadien E8 (C, F1, E1) und E10 (R1) eine Färbung vor allem in der äußersten Schicht des Tectums, dem sogenannten *Stratum opticum*, und eine leicht graduierte Expression von RGM. Ein Problem hierbei war jeweils die Hintergrundfärbung, so dass sowohl die Erst- als auch die Zweitantikörperkonzentration so weit abgesenkt werden musste, bis die Signaldetektion fast nicht mehr möglich war. Dementsprechend kommt die Gradientenfärbung nur relativ schwach zur Geltung.

Abbildung 3.3 zeigt die Färbung mit verschiedenen Antikörpern. Beim zuerst generierten polyklonalen R1-Antikörper konnte zusätzlich die Expression auf den radialen Gliazellen detektiert werden. Diese haben ihren Ursprung in einer ventrikulären inneren Schicht und besitzen Fortsätze, die das gesamte Tectum durchziehen und mit den sogenannten Endfüßchen (englisch *endfeet*) auf der Oberfläche des Tectums enden.

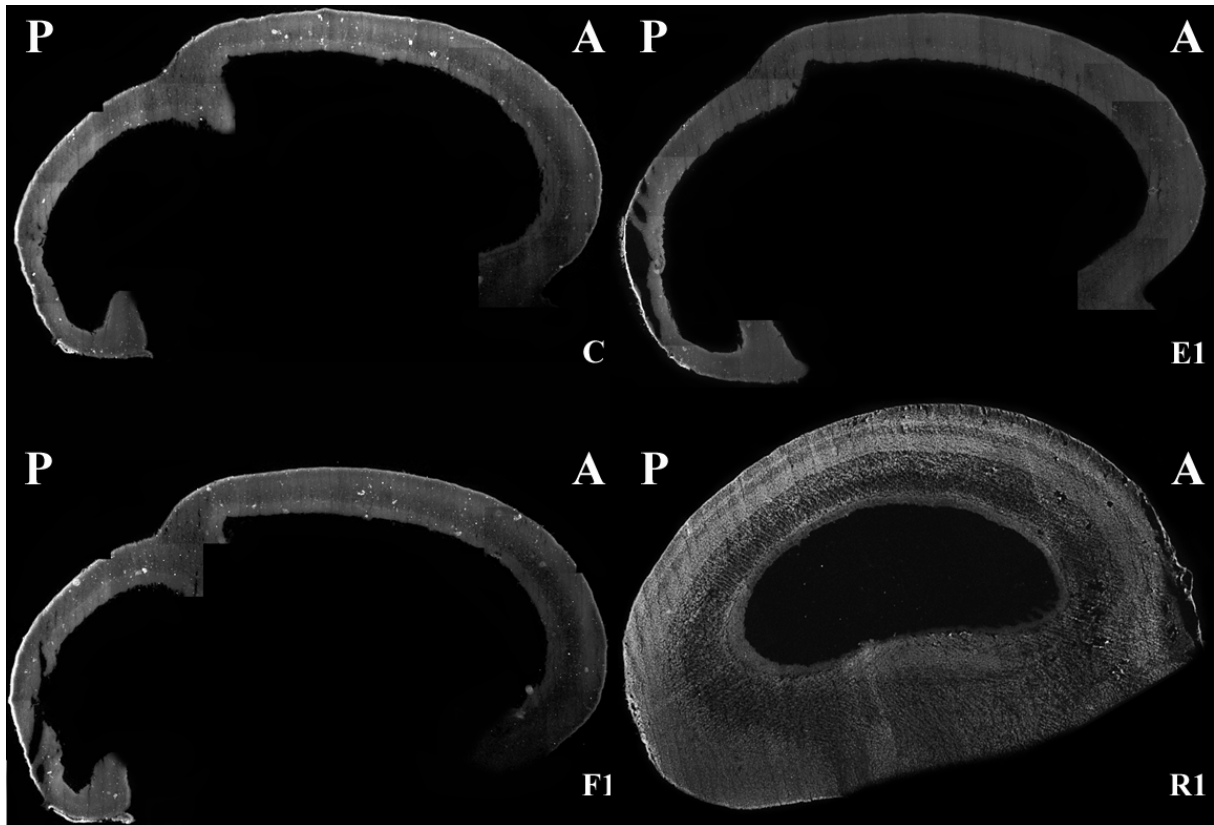


Abbildung 3.3: Immunfärbung mit anti-RGM-Antikörpern. Verschiedene Antikörper wurden zur Detektion von RGM im Hühnertectum getestet. Eine graduierte Verteilung konnte nur durch Verdünnungsreihen zu Lasten der Signalintensität detektiert werden. Die Antikörper C, E1 sowie F1 detektieren hier nur Protein in der äußeren Tectenschicht (SO) (Stadium E8), anti-RGM-R1 ergibt auch ein Signal im SGFS sowie in der periventrikulären Schicht (Stadium E10).

In diesem Zusammenhang ist auch die unterschiedliche Lokalisation von mRNA Signalen und Proteindetektion durch Immunfärbung zu sehen. Es ist deshalb anzunehmen, dass das Protein im Soma der radialen Gliazellen produziert wird und anschließend in die Endfüßchen an der Oberfläche des Tectums transportiert wird, die in Kontakt mit den einwachsenden retinalen Axonen stehen. Zusätzlich sollte RGM noch von anderen Zelltypen exprimiert werden, da die zugehörige RNA auch in zwischengelagerten Schichten zu finden war. Die Färbungen mit dem R1 Antikörper weisen auf jeden Fall auch in diese Richtung. Entsprechende Ergebnisse wurden für die Ephrine ebenfalls beobachtet (Monschau *et al.*, 1997).

3.3 Herstellung und Charakterisierung von RGM-AP Konstrukten inkl. N-terminaler Sequenzierung

Für die Isolierung und Charakterisierung von RGM-bindenden Proteinen wurde eine sogenannte RGM-Sonde in Form eines Proteins benötigt. Diese sollte einfach herzustellen, als Protein in ausreichender Menge rekombinant zu exprimieren und gut zu detektieren sein. Da RGM normalerweise GPI-verankert ist, sollte das herzustellende Konstrukt zusätzlich ohne diesen GPI-Anker vorliegen und somit frei ins Medium abgegeben werden. Das Expressionssystem sollte zudem die folgenden Eigenschaften besitzen: Signalpeptid mit guter Expressionsrate zur Ausschleusung des Proteins aus der Zelle sowie Expression in Säugerzellen für potentielle Glykosylierungen und andere posttranslationale Modifikationen. Deshalb wurde, auch um das Arbeiten mit Radioaktivität zu vermeiden, mit dem Expressionsvektor APTag-2 ein bereits gut etabliertes System ausgewählt.

Dabei wurde das codierende DNA-Fragment des zu untersuchenden Proteins N-terminal zu einem Fragment der humanen plazentalen alkalischen Phosphatase (AP) in den Vektor kloniert. Das so entstandene RGM-AP Fusionsprotein wurde nach Transfektion in Cos7- und HEK293-Zellen exprimiert und von diesen ins Zellkulturmedium abgegeben.

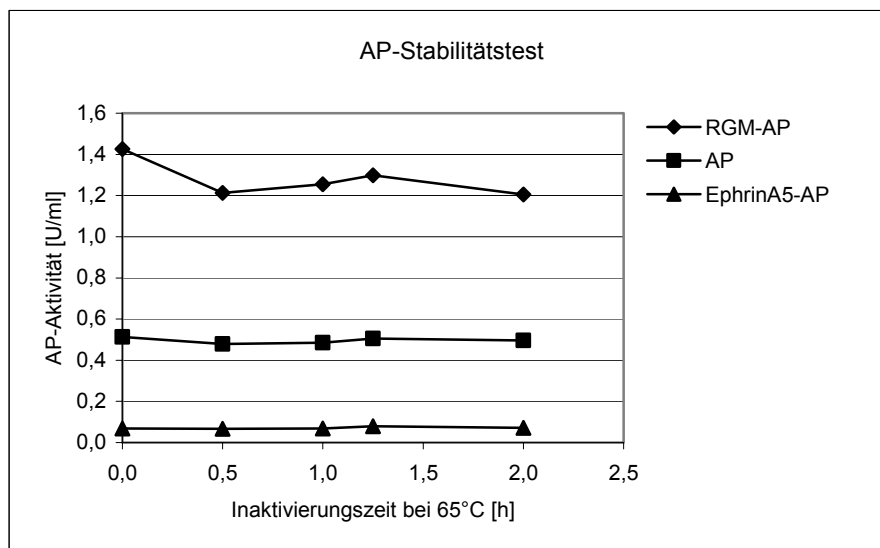


Abbildung 3.4: AP-Stabilitätstest. Humane plazentale alkalische Phosphatase ist über längere Zeit hitzestabil (>14h bei 67°C, Daten nicht gezeigt), die entsprechenden Fusionsproteine zeigen die gleiche Stabilität. Der Nachweis erfolgte durch Messung der AP-Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten.

Die vom Vektor codierte humane plazentale alkalische Phosphatase besitzt den Vorteil, dass sie hitzestabil ist und eine mehrstündige Inaktivierung anderer Phosphatasen bei 65-67°C

3. Ergebnisse

ohne bemerkenswerte Aktivitätsverluste –wie in Abbildung 3.4 gezeigt- aushält, so dass man bei Entwicklung mit entsprechenden Substratlösungen ein sehr spezifisches Signal erhält. Da die Expression nicht den Mengen entsprach, die für die vorgesehenen Arbeiten benötigt wurden, wurde die codierende Sequenz für das RGM-AP-Fusionsprotein mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert (ohne Signalpeptid) und im Leserahmen in den pSecTag2-B Expressionsvektor (Invitrogen) kloniert. Dieser verwendet das Signalpeptid für die murine Ig κ -Kette, welches für eine sehr gute Expression sorgt. Abbildung 3.5 zeigt schematisch den Aufbau von RGM sowie die darauf basierenden Konstrukte. Zusätzlich zu dem RGM Konstrukt mit der gesamten Extrazellulärdomäne, wurden noch Konstrukte mit dem um die hydrophobe Domäne verkürzten Extrazellulärteil von RGM (AS 1-350) hergestellt, um die Löslichkeit bei der Expression eventuell zu erhöhen. Jedoch zeigte sich hierbei, dass überhaupt keine Expression stattfand beziehungsweise das entstehende Produkt vermutlich sofort wieder abgebaut wurde. Somit kamen letztlich nur noch die Konstrukte mit der für die AS 31-404 codierenden Domäne zum Einsatz.

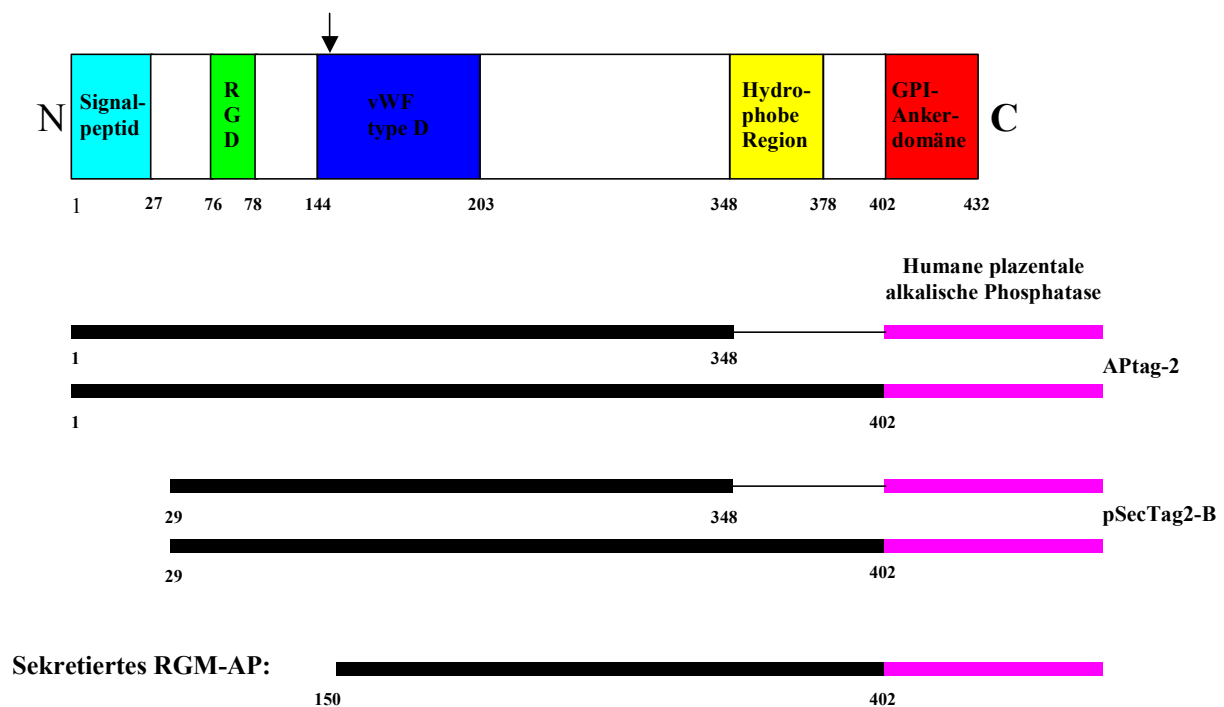


Abbildung 3.5: Domänenstruktur von RGM sowie schematischer Aufbau der RGM-AP Konstrukte. RGM besitzt N-terminal ein Signalpeptid, es folgen eine RGD Sequenz sowie ein Fragment einer von Willebrand Faktor Typ D ähnlichen Domäne (vWF type D). C-terminal befindet sich eine GPI-Anker-Domäne sowie im Bereich davor eine Region mit vielen hydrophoben Aminosäuren. Das native RGM wird posttranslational zwischen AS 149/ 150 proteolytisch gespalten. Für die RGM-AP Konstrukte wurde zum einen der Bereich von AS 1-348 bzw. 402 in den APTag-2 Vektor N-terminal zur alkalischen Phosphatase kloniert und zum anderen der Bereich von AS 29 bis 348 bzw. 402 inklusive alkalischer Phosphatase aus dem APTag-2 Vektor in den pSecTag2-B Vektor. Eine Expression konnte nur für diejenigen Konstrukte beobachtet werden, die die hydrophobe Region beinhalteten. Das rekombinant exprimierte RGM-AP wurde ebenfalls posttranslational gespalten und bestand somit in der reifen Form aus den AS 150 – 402 des RGM sowie der alkalischen Phosphatase.

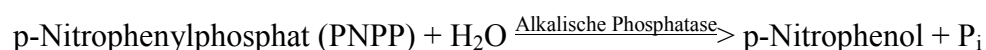
Das im Überstand lösliche RGM-AP- (sekretiertes RGM-AP) Fusionsprotein besteht wie in der Abbildung 3.5 gezeigt nach der Prozessierung aus den AS 150 bis 402 von RGM und der alkalischen Phosphatase.

Ein weiterer Vorteil aus der Verwendung des pSecTag2-B Vektors ergab sich daraus, dass gleichzeitig noch zwei so genannte Marker angefügt wurden, nämlich ein myc- und ein hexa-His-Marker, deren codierende Sequenzen C-terminal zu dem eingefügten Insert vorlagen. Vor allem mit His-Marker lassen sich Proteine sehr einfach durch zum Beispiel Ni-NTA-Agarose aus dem Medium mittels Affinitätschromatographie aufreinigen. Außerdem sind Antikörper gegen myc- und His-Marker gut charakterisiert und kommerziell verfügbar, somit lassen sich Proteine mit diesen Markern durch Immunfärbung nachweisen. Nach Transfektion in HEK293-Zellen konnte eine Steigerung der Expression beobachtet werden, allerdings noch nicht zur vollen Zufriedenheit. Deshalb wurden transfizierte Zellen mittels Zeocin auf Expression des Fusionsproteins hin selektioniert und stabil exprimierende Zelllinien hergestellt. Die Selektion mit Zeocin (Invitrogen) konnte aufgrund einer weiteren Eigenschaft des pSecTag2-B Vektors eingesetzt werden, da dieser zusätzlich für eine entsprechende Zeocinresistenz eine codierende Sequenz enthält. Die folgende Tabelle zeigt die Expressionssteigerung des RGM-AP-Fusionsproteins aufgrund der gewählten Verbesserungsstrategien:

Konstrukt	Aktivität im AP-Test
RGM in APtag-2	0,03-0,14 U/ml
RGM-AP in pSecTag2-B	0,14-0,4 U/ml
Stabile Zelllinien	2,7-4 U/ml

Der Nachweis der Expression wurde durch Anwendung des AP-Tests erreicht. Die Bestimmung der AP-Aktivität konnte zudem zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Da bei der Expression des Fusionsproteins jeweils auch ein Molekül AP hergestellt wurde, konnte man im AP-Test die Aktivität der AP bestimmen und mittels Molmasse und Proteinbestimmung die Konzentrationen berechnen.

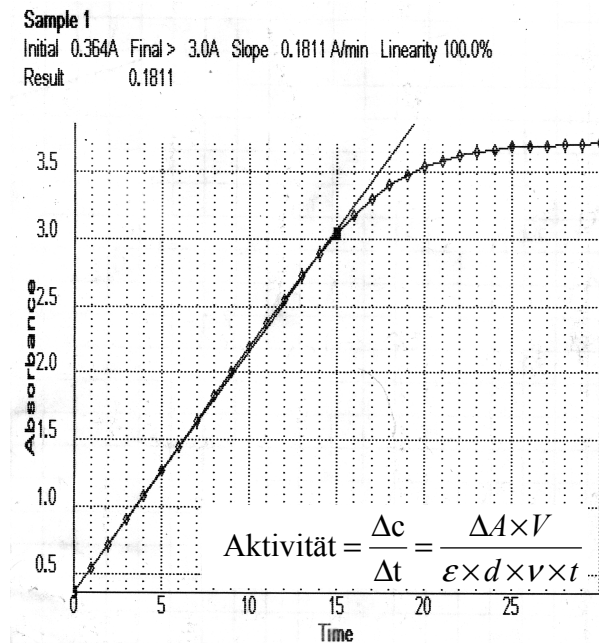
Das Prinzip des AP-Tests beruht auf der folgenden Reaktionsgleichung:



Dabei wird eine Einheit (Unit [U]) folgendermaßen definiert:

Eine Unit hydrolysiert 1.0 mMol PNPP pro Minute bei pH 9,8 und 37°C.

3. Ergebnisse



Entsprechend wird die Absorptionsänderung bei 405nm über eine Minute gemessen und zwar im linearen Anfangsbereich der Reaktion (siehe Regressionsgerade in der Abbildung). Die nebenstehende Abbildung 3.6 zeigt den typischen Verlauf dieser Reaktion bis zur Sättigung. Die Berechnung der Aktivität erfolgt mit der in der Abbildung angegebenen Formel. Die durchschnittliche Aktivität von RGM-AP betrug 300 U/mg und die von AP 350 U/mg.

Abbildung 3.6: Messung des AP-Substratumsatzes von RGM-AP. Es ist der Verlauf der vollständigen Reaktion mit einem linearen Anstieg am Anfang (steady-state) und dem Übergang in die Sättigung gegen Ende dargestellt. Die Berechnung der Aktivität erfolgt mittels der angegebenen Formel für den linearen Bereich mit den folgenden Variablen: ΔA = Absorptionsänderung, V = Volumen, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (18,5 für PNPP), d = Durchmesser der Küvette, v = Verdünnungsfaktor und t = Zeit.

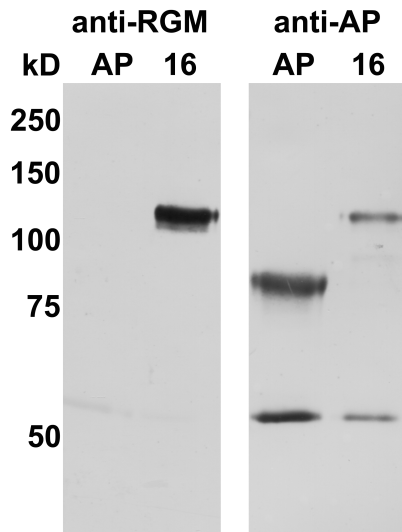


Abbildung 3.7 zeigt den Nachweis der RGM-AP Expression mittels Western Blot. Dabei wurden RGM-AP Fusionsprotein beziehungsweise AP immunpräzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulosemembran wurden die Proteine mittels anti-AP-beziehungsweise anti-RGM-Antikörpern nachgewiesen. Der Größenunterschied zwischen AP alleine und RGM-AP entsprach dem erwarteten Molekulargewicht von RGM. Die Detektion mit anti-RGM- und anti-AP-Antikörpern zeigte zudem, dass RGM-AP vollständig exprimiert wurde. Im anti-AP Blot wurden zusätzlich die schweren Ketten des Präzipitationsantikörpers detektiert.

Abbildung 3.7: Nachweis der Expression von RGM-AP (16) und AP. Beide rekombinant exprimierten Proteine wurden mittels anti-AP-Antikörper immunpräzipitiert, im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran überführt und spezifisch mit Antikörpern gegen RGM (linker Blot) bzw. AP (rechter Blot) detektiert. RGM-AP wurde sowohl vom anti-RGM- als auch vom anti-AP-Antikörper detektiert, AP nur von letzterem. Das Vorhandensein nur einer Bande deutete auf eine vollständige Expression ohne Abbau hin. Der Größenunterschied zwischen AP und RGM-AP entsprach dem Laufverhalten des nativen RGM im SDS-Gel. Die Banden bei 50 kDa entsprechen den schweren Ketten des Präzipitationsantikörpers.

Da das Laufverhalten des RGM Fragments im RGM-AP exakt dem des nativen RGM entsprach, es jedoch eine Diskrepanz zwischen der berechneten Molmasse von 42 kDa und der im SDS-Gel gezeigten von 33 kDa gab, wurde aufgrund seiner guten Expression RGM-AP-Fusionsprotein nach Affinitätschromatographischer Aufreinigung mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen, nach Anfärbung mit Ponceau ausgeschnitten und anschließend N-terminal mittels Edman Abbau durch die Firma Toplab sequenziert. Aufgrund der GPI-Verankerung konnte von einer posttranslationalen Modifikation durch N-terminale Proteasespaltung ausgegangen werden, die durch die Sequenzierung bestätigt wurde. Demnach wird RGM zwischen den Aminosäuren 149 und 150 durch eine unbekannte Protease gespalten. Das aktive, GPI-verankerte Fragment beginnt mit der Sequenz PHLRT. Die folgende Abbildung zeigt sowohl Nukleinsäure- als auch Proteinsequenzen und veranschaulicht die verschiedenen Modifikationen, denen RGM während und nach der Translation unterworfen wird.

AAACTCTTCTCCAGGGAGAGGATAGTGGTTAAAGCTCGAGCTGGATGGATGGGTTGGGGAGAGGGGCAGGATCCACAGCCCTGGGACTTTTCCAATCCTCCCTGCTTTCTCTGCAT	120
M G R G A G S T A L G L F Q I L P V F L C I	22
CTTCCCTCCAGTGACGTCTCCATGCAAGATCCTCAAGTGCAACTCTGAGTCTGGGGCCACGTCGGGTTTCGACCCACCTGGGCGCAGAGAAACCCCGGAGTCTGCACGGCGTTGGC	240
F P P V T S P C K I L K C N S E F W A A T S G S H H L G A E E T P E F C T A L R	62
CGCCTACGCGCAGTGCACCCCGCGCACCCCGCACCTGCAGGGGGACCTGGCCTACCACTCGGCCGTGCATGGCATAGACGATCTCATGGTGCAACACAACCTCCAAGGATGGCCC	360
A Y A H C T R R T A R T C R G D L A Y H S A V H G I D D L M V Q H N C S K D G P	102
CAGTCCAGCCCGCCTCCGGACATTGCCCGGGGACAGCCAGGAGCGCTCTGACAGCCCGAAATCTGCCACTACGAGAAGAGCTTTCACAACACTCGGCAGCTCCCAACTACAC	480
T S Q P R L R T L P P G D S Q E R S D S P E I C H Y E K S F H K H S A A P N Y T	142
CCACTGTGGGCTCTTCGGGGACCCCACTCAGGACTTTACGGACACCTTCCAGACCTGCAAGGTGCAAGGGGCTTGGCCGCTCATAGACAATAACTACCTGAACGTCCAGGTACCCAA	600
H C G L F G D H L R T F T D T F O T C K V Q G A W P L I D N N Y L N V Q V T N	182
CACGCCGTGTGCCTGGCTCCTCAGCCACCGCCACAGCAAGCTCACCATCATCTTCAAGAGCTTCCAGGAATCGGTGGAGCAGAAAAGTGTACCAGGCAGAGATGGACGACCTCCCTGC	720
T P V L P G S S A T A T S K L T I I F K S F Q E C V E Q K V Y Q A E M D E L P A	222
TGCCTTTGCTGATGGCTCAAGAAGCGGGCGGCAAGCAGGACCAACAGCCTGAAGATCACCAGAAAGGTGTGGGCCAGCACATCGAGATCCAGGCCAAGTACATGGCACCACAT	840
A F A D G S K N G G D K H G A N S L K I T E K V S G Q H I E I Q A K Y I G T T I	262
CGTGGTGAGGCAGGTGGGCGCTACCTCACTTCGCCGTGCGTATGCCGGAGGAGGTGGTCAACGCTGTGGAGGACCGGGACAGTCAGGGCCCTACCTGTGCCTCCGGGTTGTCGCT	960
V V R Q V G R Y L T F A V R M P E E V V N A V E D R D S Q G L Y L C L R G C P L	302
CAACCAACAGATTGACTTCCAGACTTTCGCTTGGCTCAGGCCGCTGAGGGCCGCTGCGCAGGAAGGGGCCAGCTTGCCTGGCCCGCCCTGAGGCCTTCACTTACGAGTCGGCCACTGC	1080
N Q Q I D F Q T F R L A Q A A E G R A R R K G P S L P A P P E A F T Y E S A T A	342
CAAGTGCAGGAAAAGCTGCCCGTAGAGGACCTTACTTCCAGTCTGCGTCTTTGACCTCTGACTACGGGGGATGTCAACTTCATGCTGGTCTTATTACGCTTTTGAGGACGTGAA	1200
K C R E K L P V E D L Y F Q S C V F D L L T T G D V N F M L A A Y Y A F E D V K	382
GATGCTTCACTCCAACAAGACAAACTGCACCTCTATGAAAGGACACGGGCCCTAGCCCCGGGCAATGCAGCTCCCTCGGAGCATCCCTGGGCCCTCCCTGCCCTCTGGGTAGCACTGCT	1320
M L H S N K D K L H L Y E R T R A L A P G N A A P S E H P W A L P A L W V A L L	422
GAGTTTGTAGTGTGGTGGGTTTGTATAGAGTTTGTCTTCTCACGCTGTGGGAAAAGGGGAGCAGGAGGGGACAAGGACAAGATGACAGCGCTGGACAAGGAGAGATGGGATA	1440
S L S Q C W L G L L *	432
AAGGATCCAGTGGGGAGCAGTGGATCATCTCAGATCTCAGCCCC	1486

Abbildung 3.8: RGM Sequenzen (Nukleotid und Aminosäuren) und posttranslationale Modifikationen. Box: Startcodon, Dreieck: potentielle Signalpeptidspaltstelle, Punkte: RGD Stelle, Rauten: vorausgesagte N-Glykosylierungsstellen, Pfeil: Spaltstelle, mit gepunkteter Linie markierte AS: durch Massenspektrometrie analysierte Peptide, Unterstreichung: GPI-Ankersequenz, Stern: Stopcodon (Monnier *et al.*, 2002).

3.4 RAP- (receptor-affinity-probe) Färbung

Für eine Isolierung RGM-bindender Proteine beziehungsweise möglicher Rezeptoren war es unerlässlich festzustellen, ob entsprechende Bindungspartner im untersuchten, retinotectalen System überhaupt vorhanden waren. Hierzu wurden Gewebeschnitte mit dem rekombinant exprimierten RGM-AP inkubiert und nach intensivem Waschen und Hitzeinaktivierung von endogenen Phosphatasen bei 67°C, um die Hintergrundfärbungen so weit wie möglich zu reduzieren, wurden die AP spezifischen Signale mittels Substratentwicklung detektiert.

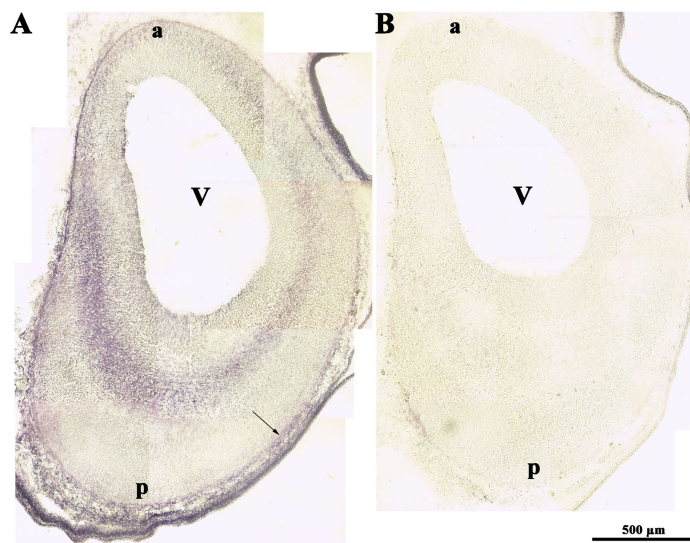


Abbildung 3.9: RAP-Färbung des Tectums (Stadium E9). Eine spezifische Bindung des RGM-AP Fusionsproteins (A) ist aufgrund der erhaltenen Signale im *Stratum opticum* (Pfeil) sowie einer intermediären Schicht des Tectums im Vergleich zu einer Kontrollfärbung mit AP (B) eindeutig zu erkennen; V= Ventrikel, a = anterior, p= posterior.

Dabei konnten im wesentlichen die bereits bekannten Ergebnisse, die mit Vorgängerkonstrukten des RGM-AP im Rahmen der Diplomarbeit generiert wurden, bestätigt werden (Deitinghoff, 2001). Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 3.9 die erhaltenen Signale im Tectum im Stadium E9. Man erkennt spezifische Färbungen vor allen in der faserführenden Schicht (SO), sowie ebenfalls in einer intermediären Schicht des Tectums. Die Färbung der faserführenden Schichten der Retina (OFL) konnte ebenfalls bestätigt werden (nicht gezeigt). Neue Ergebnisse wurden hier jedoch zusätzlich durch die Detektion eines Gradienten in der Retina mit starkem temporalen und schwachen bis nicht detektierbarem nasalen Signal erhalten. Die entsprechenden Abbildungen 3.19 und 3.20 sind in Abschnitt 3.8 gezeigt, um die Übereinstimmung mit der Immunfärbung des potentiellen Rezeptors darzustellen.

3.5 Biochemischer Ansatz zur Isolierung RGM-bindender Proteine

Die spezifische Bindung von RGM-AP an distinkte Strukturen des retinotectalen Systems führte zu dem Ansatz, einen potentiellen Rezeptor durch Affinitätsaufreinigung mittels RGM-AP- (RAP-) Färbungen von Blots, Immunpräzipitations- (IP-) beziehungsweise Crosslinking-Experimenten zu isolieren. Hierzu wurden zuerst durch differentielle Zentrifugation Zellmembranen aus embryonalen Hühnerhirnen isoliert. Dann wurden Membranextrakte mit verschiedenen Detergenzien hergestellt und diese auf unterschiedliche Art und Weise weitergehend untersucht. Zum einen wurden die Extrakte direkt mittels nativer als auch denaturierender (SDS) Gelelektrophorese aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen in einer Transferkammer überführt (Blotten) und diese mit RGM-AP inkubiert (RAP Blot analog zu den RAP Gewebefärbungen); als Kontrolle wurden parallel Blots mit AP inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die Membranen in AP-Substratlösung inkubiert und die sich entwickelnden Bandenmuster verglichen. Die Fülle von Banden wurde durch verschiedene Maßnahmen wie Zugabe von Detergenz IGEPAL CA-630 während der Inkubation oder Reduktion der Ligandenkonzentration reduziert, das heißt die Detektion wurde spezifischer. Dennoch ließ sich aufgrund der immer noch zahlreichen Banden keine spezifische Wechselwirkung mit einem bestimmten Protein nachweisen beziehungsweise dieses isolieren. Abbildung 3.10 zeigt beispielhaft solch einen RAP Blot.

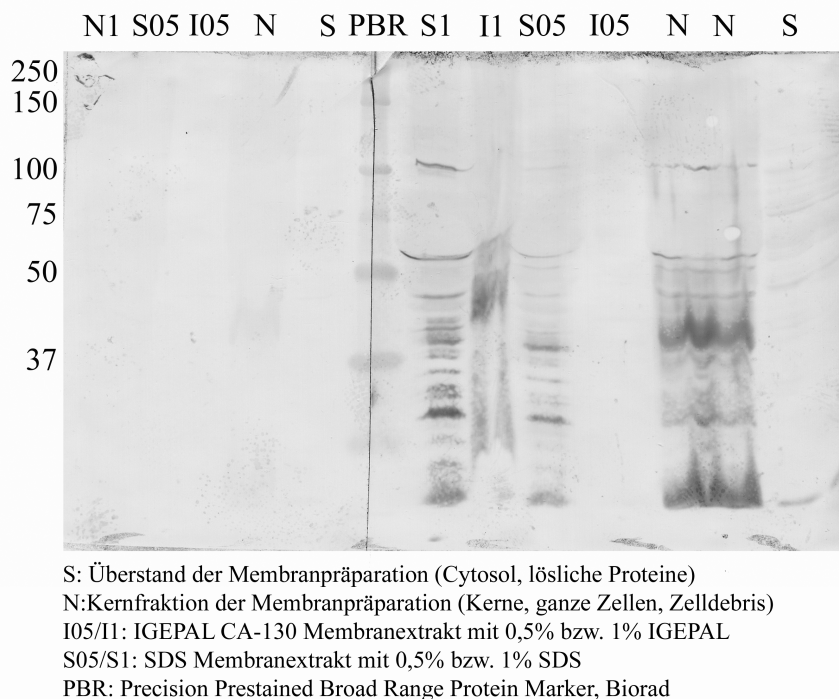


Abbildung 3.10: RGM-AP Blot. Verschiedene Membranextrakte sowie verschiedene Fraktionen der differentiellen Zentrifugation wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und spezifisch mit RGM-AP detektiert (rechte Blot-Hälfte). Als Kontrolle diente die Bindung von AP alleine (linke Blot-Hälfte).

3. Ergebnisse

Die Verwendung unterschiedlicher Detergenzien beeinflusste zwar die Bandenmuster, jedoch weniger deren Anzahl beziehungsweise die Spezifität. Daraufhin wurden Membranextrakte mit RGM-AP sowie als Kontrolle mit AP alleine inkubiert und diese dann mit anti-AP Antikörper immunpräzipitiert, um RGM-bindende Proteine mitzufällen. Abbildung 3.11 zeigt ein Silbergel von immunpräzipitierten Proben mit verschiedenen Detergenzien hergestellter Membranextrakte. Die Anzahl der gebundenen Proteine war sehr hoch. Dies deutet darauf hin, dass RGM eine relativ hohe Anzahl von unspezifischen Bindungen einzugehen scheint, was auch die große Anzahl an Banden in den RAP Blots erklären würde. Dennoch konnten Unterschiede in den Bandenmustern detektiert werden. Wie in der Abbildung durch Pfeile angedeutet, gab es zusätzliche Banden bei 75 kDa (RIPA) sowie 90 kDa (TX-100), die jedoch nicht bei den entsprechenden Kontrollen zu finden waren. Weitere Banden im hochmolekularen Bereich bei 220 und 150 kDa konnten in anderen Immunpräzipitationen spezifisch für RGM-AP detektiert werden. Allerdings konnte bei einer Überprüfung im RAP Blot dies nicht bestätigt werden. Zudem waren die Reinheit und Konzentration der spezifisch präzipitierten Banden für eine Sequenzierung nicht ausreichend.

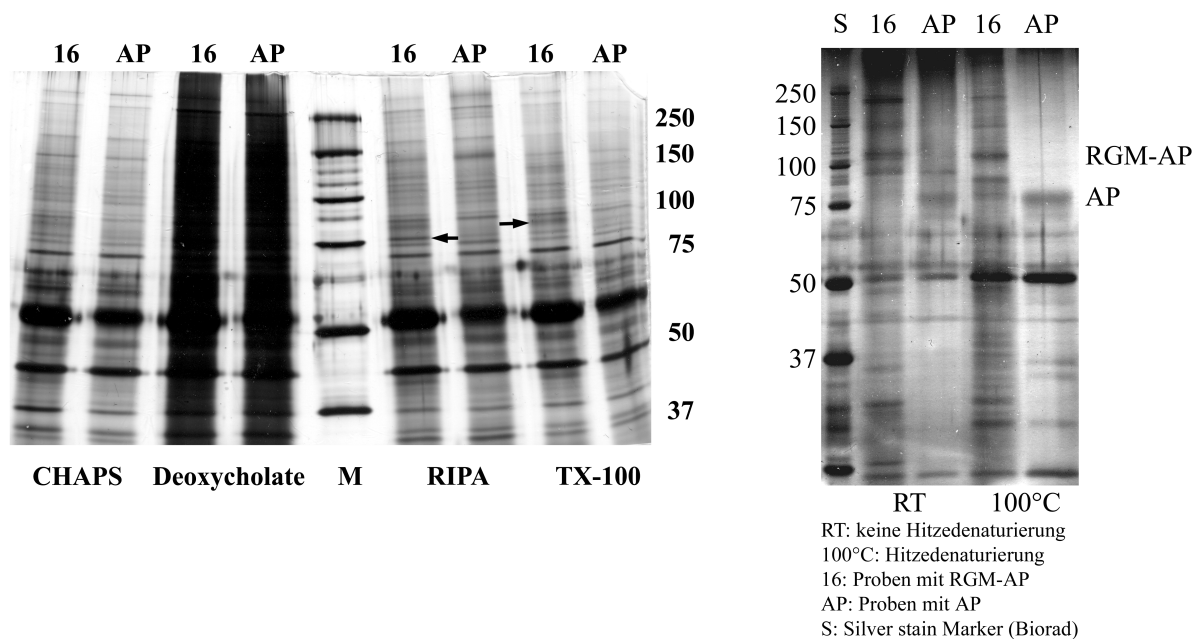


Abbildung 3.11: Silberfärbung immunpräzipitierter Proben nach Auftrennung im SDS-Gel. Unterschiedliche Membranextrakte (mit den Detergenzien CHAPS, Deoxycholate, Triton X-100 (TX-100) sowie RIPA-Puffer) wurden mit RGM-AP (16) oder AP alleine (AP) inkubiert und mittels anti-AP-Antikörpern immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der Proben im SDS-Gel wurden diese Silber gefärbt. Das rechte Gel zeigt immunpräzipitierte Proben eines RIPA Membranextraktes dessen Proben mit und ohne vorherige Hitzedenaturierung im SDS-Gel aufgetrennt wurden. Gut zu erkennen sind spezifische RGM-AP gebundene Banden bei 220 und 150 kDa sowie im niedermolekularen Bereich.

Deshalb wurde als nächster Ansatz zur Anreicherung der spezifisch bindenden Proteine ein Crosslinking von an die nativen Membran gebundenem RGM-AP gewählt. Es wurden unterschiedliche Crosslinker gewählt. Bei DSS (Disuccinimidyl suberate) handelte es sich um einen wasserunlöslichen, homobifunktionellen N-Hydroxysuccinimidester. Dieser ist aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit membrangängig und vernetzt somit vor allem innerhalb der Membranproteine. DMA (Dimethyl Adipimate Dihydrochloride), ein wasserlöslicher, membrangängiger homobifunktioneller Imidoester, vernetzt sowohl extra- wie intrazellulär Proteine über deren primäre Amine. Das Imidoamidreaktionsprodukt verändert weder die Ladung des Proteins noch wird die native Konformation und die Aktivität des Proteins zerstört. EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride) reagiert mit einer Carboxylgruppe, wodurch ein Amin-reaktives Zwischenprodukt gebildet wird, welches in wässrigen Lösungen instabil ist. Wenn kein Reaktionspartner in Form eines Amins zur Verfügung steht, erfolgt eine Hydrolyse des Zwischenprodukts und die Carboxylgruppe wird wieder regeneriert. Schließlich wurde noch Kupfer- (Cu(II)-) Phenanthrolin eingesetzt. Bei dieser Reagenz macht man sich die Anwesenheit von Cysteinen zu Nutze. Die Sulfhydrylgruppen dieser bilden sofern sie benachbart sind Disulfidbrücken aus, die reversibel sind. Durch das Cu(II)-Phenanthrolin wird aufgrund oxidativer Reaktionen eine kovalente Bindung gebildet, so dass im Falle einer Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor über Disulfidbrücken eine feste Verknüpfung besteht.

Bei den detektierten Signalen handelte es sich um hochmolekulare Aggregate, die nur eine geringe Laufstrecke im Gel zurücklegten. Eine entsprechende Reinigung beziehungsweise Isolierung war deshalb nicht erfolgversprechend. Zudem wurden parallel erste Ergebnisse aus dem Screening der cDNA Banken erhalten, so dass der Ansatz einer biochemischen Isolierung und Reinigung nicht weiterverfolgt wurde.

3.6 Screening der cDNA Bibliotheken

Da die unterschiedlichen biochemischen Methoden nicht den gewünschten Erfolg zeigten, beziehungsweise eine Isolierung und vor allem Charakterisierung RGM-bindender Proteine nicht in greifbare Nähe rückte, wurde parallel dazu ein weiterer Ansatz verfolgt, der ebenfalls mit Hilfe des RGM-AP Fusionsproteins durchgeführt werden konnte. Beim Durchsuchen von Expressionsbibliotheken macht man sich zu Nutze, dass eine Vielzahl von Proteinen eines bestimmten Gewebes oder auch ganzer Körperteile von sogenannten cDNA Bibliotheken codiert werden und mit Hilfe der entsprechenden Systeme (bakteriellen oder eukaryontischen Ursprungs) exprimiert werden. Man kann dann im Falle einer spezifischen Bindung markier-

3. Ergebnisse

ter Liganden den Bindungspartner identifizieren. Die Bibliotheken werden dazu in anfangs größere Pools aufgeteilt, welche in einer ersten Runde durchsucht werden. Findet sich in einem Pool ein entsprechender Bindungspartner, so wird dieser Pool verkleinert und in kleinere Pools aufgeteilt, erneut mit dem Liganden durchsucht, bis ein weiterer Pool mit exprimierten Genen identifiziert wird. Je nach Größe der Bank und der Pools kann meist nach der zweiten Runde eine finale Runde mit homogenen Pools durchgeführt werden, das heißt in jedem Pool wird nun nur noch ein einzelnes Protein synthetisiert. Wenn das entsprechende ligandbindende Protein dann identifiziert wurde, greift man auf die cDNA zurück und sequenziert diese. Ein Datenbankabgleich klärt, ob es sich um ein bereits bekanntes Protein handelt und/ oder eventuelle Ähnlichkeiten vorhanden sind.

Für die Identifizierung RGM-bindender Proteine wurde eine SMART-library von Clontech verwendet, welche aus humanem, fötalem Hirn hergestellt war und einen Insertgrößenbereich von 0,5kb bis 4kb abdeckte. Diese lag zwar nicht in Expressionsvektoren vor, sollte sich jedoch relativ einfach mittels des CRE-Systems umklonieren lassen. Leider stellte sich heraus, dass dies nur für einzelne Inserts möglich war und damit sehr uneffizient für die Umklonierung der gesamten Bibliothek. Deshalb wurde die cDNA Bibliothek in Zusammenarbeit mit Dr. M. R. Hornberger amplifiziert, die Plasmide wurden isoliert, nach Restriktionsverdau in die SfiI Schnittstelle des pLP-IRESneo Expressionsvektors ligiert (Dr. M. R. Hornberger), und nach Transformation in XL10-GOLD ultrakompetente Zellen wurden diese auf Nitrocellulosefiltern ausplattiert und Replikplatten von diesen hergestellt. Nach Extraktion der DNA aus den Bakterien der Replikplatten, wurde diese in Cos7-Zellen transfiziert und die verschiedenen Pools mit RGM-AP-Fusionsprotein durchsucht (nach Cheng und Flanagan, 1994). Abbildung 3.12 zeigt die in der ersten Runde erhaltenen positiven Klone. Da die Zellen zum Teil zu dicht gewachsen waren und Aggregate bildeten und da der Background noch zu hoch war, wurden in einer zweiten Runde, bei der erneut die gesamten 103 Pools der Bibliothek durchsucht wurden, die Zellen vor der Transfektion weniger dicht ausgesät und die Konzentration von RGM-AP Fusionsprotein während der Bindung reduziert. Weiterhin wurde die Inaktivierung von 2h bei 65°C auf Übernachtenaktivierung bei 67°C in Anwesenheit von BSA ausgedehnt. Von den 103 Pools wurden vier positive isoliert, von denen jeweils sechs Subpools hergestellt und gescreent wurden. Je ein Subpool von zwei Pools zeigte positive Signale, so dass nach einer weiteren Verkleinerung und Identifizierung von positiven Subpools, Einzelklone gepickt werden konnten. Die DNA positiver Einzelklone wurde in einem Agarosegel überprüft um sicherzustellen, dass tatsächlich nur ein Plasmid vorlag, und anschließend sequenziert.

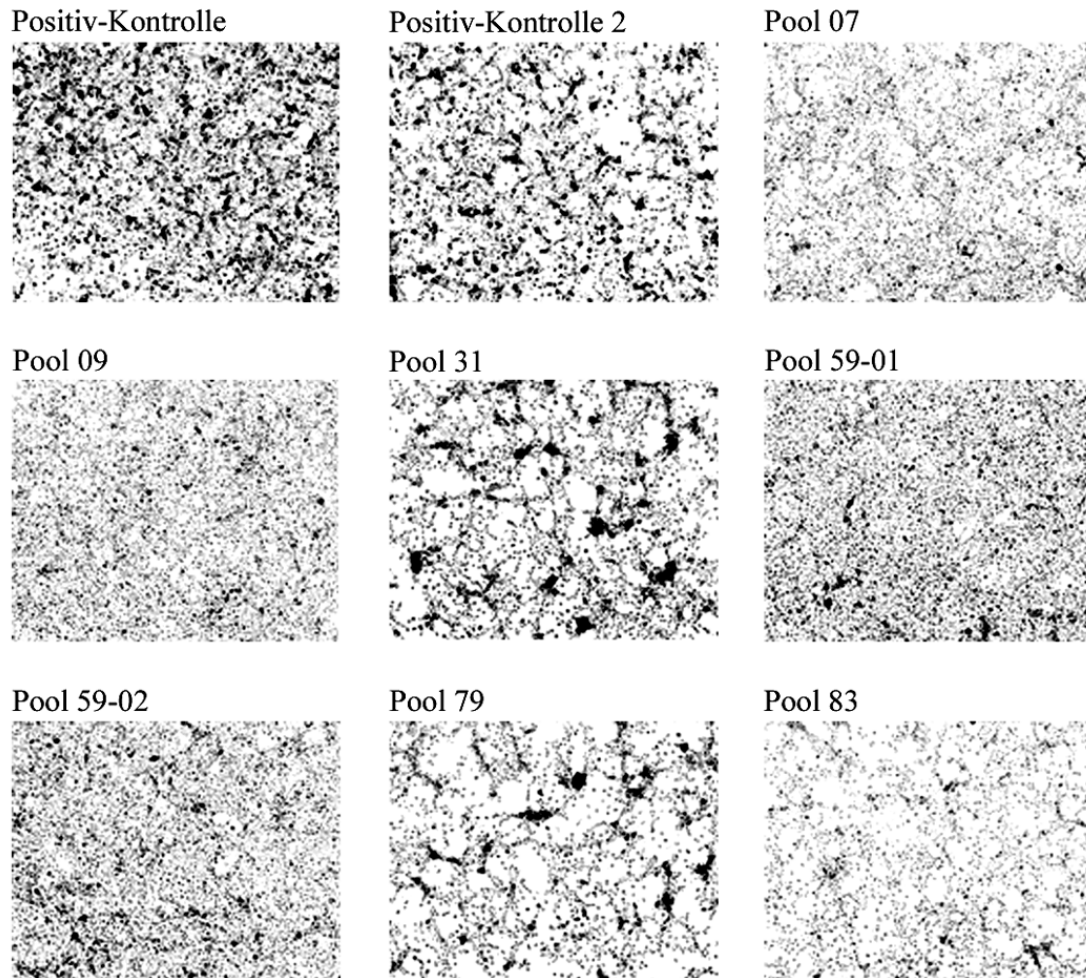


Abbildung 3.12.: Färbung von transfizierten Zellen nach RGM-AP Bindung. Verschiedene Pools zeigten ein der Positiv-Kontrolle, die aus mit EphrinA5-AP gefärbten, den EphA3-Rezeptor exprimierenden Zellen bestand, entsprechendes Signal.

Die erhaltene Sequenz wurde in der Datenbank abgeglichen und als Ergebnissequenz wurde Cryp- α aus Huhn angezeigt. Der sich anschließende Restriktionsverdau, sowie Expression und AP-Test ergaben, dass es sich um ein Konstrukt aus dem Labor handelt, Cryp- α -AP, und somit ein Artefakt vorlag. Es wurden keine weiteren Signale detektiert. Insgesamt wurden 500.000 Klone überprüft.

Parallel zum Screening der SMART Bibliothek wurde in einer Kooperation mit Prof. S. M. Strittmatter von der US-amerikanischen Yale Universität im dortigen Labor eine weitere cDNA Bibliothek (*Origene adult mouse library*) mit dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, RGM-AP-Fusionsprotein sekretierenden, stabilen Zelllinien durchsucht. Das Screening von 480.000 Klonen ergab als einziges RGM-bindendes Protein Neogenin. Insgesamt wurde somit aus zwei Expressionsbibliotheken mit circa 1.000.000 Klonen ein einziges spezifisches Signal erhalten.

3. Ergebnisse

3.7 Herstellung von Neogenin Konstrukten und deren Expression

Da Neogenin aufgrund seines Expressionsmusters, seines Aufbaus sowie seiner Verwandtschaft zu DCC als Rezeptor für RGM ein potentieller Kandidat war, sollte im folgenden die Bindung zwischen RGM und Neogenin näher untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Neogenin-Konstrukte im pSecTag2-B System hergestellt. Als PCR-Matrize für die Klonierungen wurde cDNA aus embryonalem Hühnertectum verwendet.



Abbildung 3.13: Struktur des Neogenins aus Huhn nach Vielmetter *et al.*, 1994. Extrazellulärdomäne mit acht potentiellen N-Glykosylierungsstellen verteilt auf vier Ig Domänen (Ig) und sechs Fibronectin III Domänen (FNIII), gefolgt von einer Transmembrandomäne (TM) sowie einer zytoplasmatischen Domäne (CYT).

Abbildung 3.13 zeigt den schematischen Aufbau des Neogenins aus Huhn.

Neogenin besitzt eine extrazelluläre Domäne, die sich N-terminal aus vier Ig-Domänen (4x Ig) und sich anschließenden sechs Fibronectin III Domänen (6x FNIII) zusammensetzt. Es folgt ein einzelner Membrandurchgang (Transmembrandomäne TM) sowie eine zytoplasmatische Domäne (CYT) mit vierzehn potentiellen Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen. Außerdem gibt es acht potentielle N-Glykosylierungsstellen, wodurch die Diskrepanz zwischen der berechneten relativen Molmasse von 150 und der im SDS-Gel beobachteten von 190 zu erklären ist. Im Huhn existieren zwei Splice-Varianten der zytoplasmatischen Domäne (Vielmetter *et al.*, 1994).

Zur Untersuchung der RGM-Neogenin Interaktion wurden Konstrukte unterschiedlicher Längen und verschiedener Domänenstruktur wie folgt hergestellt:

A: 4x Ig, sekretiert (AS 1-400)

B: 6x FNIII, sekretiert (AS 400-1087)

D: 4x Ig + 6x FNIII, sekretiert (= gesamte extrazelluläre Domäne, AS 1-1087)

E: 4x Ig + 6x FNIII + TM (= D, jedoch membranverankert, AS 1-1115)

F: volle Länge Neogenin (= 4x Ig + 6x FNIII + TM + CYT, AS 1-1443)

G: FNIII + TM (AS 400-1115)

H: FNIII + TM + CYT (AS 400-1443).

Nach der erfolgreichen Klonierung der verschiedenen Konstrukte wurde die Expression zum Teil durch Western Blot und zum Teil durch RAP Zellfärbung mit RGM-AP überprüft.

Abbildung 3.14 zeigt einen Blot mit anti-His-Antikörperdetektion. Die in den Überstand sekretierten Moleküle weisen im Vergleich zu den analogen membranverankerten Fragmenten ein größeres Molekulargewicht auf. Dies kann zum einen auf unterschiedliche Glykosylierungsmuster zurückzuführen sein. Zum anderen binden die Transmembrandomänen aufgrund ihrer Hydrophobizität eventuell mehr SDS, wodurch die Nettoladung größer wird und die Proteine im elektrischen Feld schneller wandern. Bei der Bande in der Spur A handelt es sich vermutlich um das Dimer dieses Konstrukts.

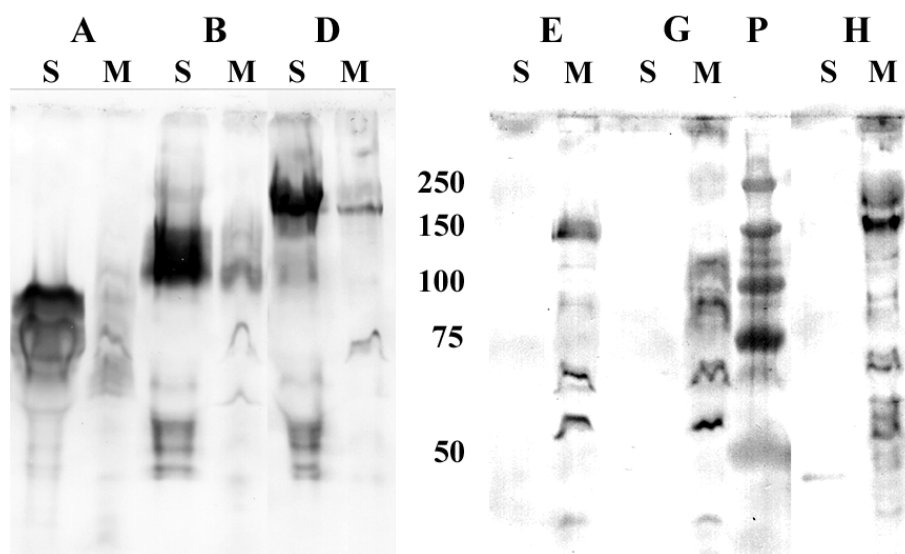


Abbildung 3.14: Expression verschiedener Neogenin Konstrukte (A, B, D, E, G, H). Es wurden jeweils Zellkulturüberstand (S) und Zellysate (M) aufgetragen, im SDS-Gel aufgetrennt und mit anti-His-Antikörper immungefärbt. Die Konstrukte zeigen entsprechend ihrer Größe jeweils eine spezifische Bande (A: 90kD, B: 110kD, D: 160kD, E: 150kD, G: 90kD, H: 150kD). Die in den Überstand sekretierten Proteine weisen jeweils ein höheres Molekulargewicht auf, als die entsprechenden membranverankerten, evtl. aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsgrade. Die anderen Banden sind Hintergrundfärbungen erzeugt durch unspezifische Bindung des His-Antikörpers, P = Precision Prestained Broad Range Protein Marker (Biorad).

3. Ergebnisse

3.8 Stärke und Spezifität der RGM-Neogenin Bindung

Die Untersuchung der Domänenwechselwirkung von RGM und Neogenin wurde mit den verschiedenen Konstrukten zum einen in Form eines Protein-Protein Interaktionsassays auf ELISA Basis und zum anderen in Form eines zellulären Assays auf Basis des Bibliotheken-Screenings durchgeführt. Für den Interaktionsassay wurden die verschiedenen, in den Überstand sekretierten Neogeninfragmente (A, B, D) an ELISA Platten gebunden, anschließend wurde RGM-AP in verschiedenen Konzentrationen binden gelassen und nach intensivem Waschen die AP-Aktivität gemessen. Die Auftragung der Absorptionsänderung gegen die Zeit kann als Maß für die gebundene RGM-AP Menge genommen werden und mittels Eichkurven ließen sich die entsprechenden Konzentrationen und damit auch die Bindungskonstanten berechnen.

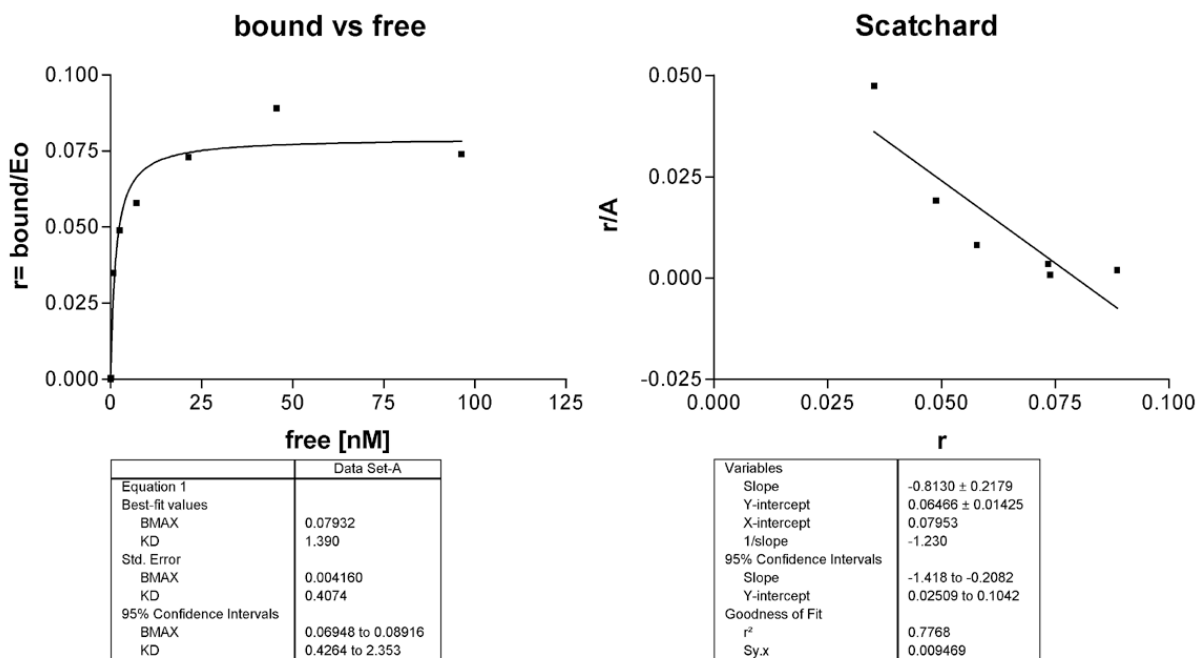


Abbildung 3.15: Rezeptor-Ligand Bindungskurven und Scatchard plot. Anhand der Bindungskurven und dem daraus abgeleiteten Scatchard plot ließen sich die Dissoziationskonstanten k_D für die RGM-Neogenin Interaktion bestimmen.

Abbildung 3.15 zeigt die Bindungskurve für die gesamte Extrazellulärdomäne des Neogenins (NeogD). Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten ergab für die Extrazellulärdomäne einen Wert von 1,4 nM. Für die weiteren löslichen Neogeninfragmente (A und B) konnte keine Bindung festgestellt werden. Lediglich NeogB zeigte eine leicht über dem Hintergrund liegende Bindung, was daraufhin deutet, dass die räumliche Anordnung für eine starke Bindung nicht gegeben war.

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten im zellulären Test unter Verwendung der vollen Länge von Neogenin, ergab sich eine wesentlich stärkere Bindung. Der Wert betrug dabei 230 pM (Rajagopalan, Deitinghoff *et al.*, 2003).

Für die Bindung von RGM an Neogenin exprimierende Zellen wurden alle Neogeninkonstrukte in Cos7-Zellen transfiziert. Zwei Tage später wurden die Zellen gewaschen und mit RGM-AP konditioniertem Medium inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die Zellen mit AP-Substratlösung behandelt, um die Bindung von RGM-AP an die Neogeninfragmente exprimierenden Zellen zu detektieren.

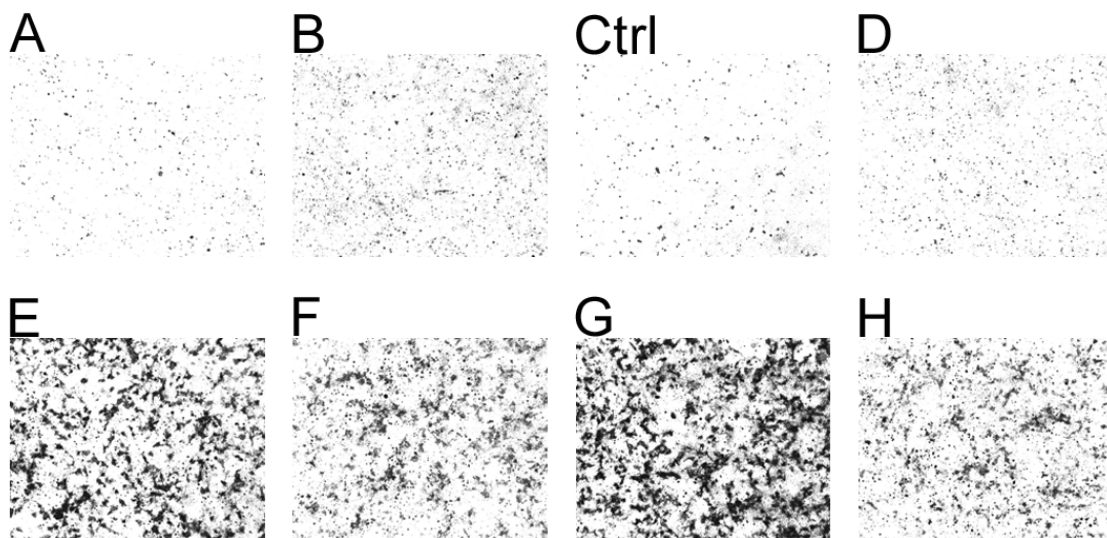


Abbildung 3.16: Bindung von RGM an Neogenin. Diverse Neogenin-Fragmente (Neog A-H) exprimierende Cos7-Zellen wurden mit RGM-AP inkubiert und anschließend wurde RGM-AP mit AP-Substratlösung detektiert. Nur membranverankerte Neogeninkonstrukte wiesen eine Bindung auf. Für die Bindung von RGM ist eine verkürzte Form des Neogenins, die nur die FNIII-Domäne beinhaltet, ausreichend.

Man erkennt in Abbildung 3.16 eine Färbung derjenigen Cos7-Zellen, die die membranverankerten Neogeninfragmente exprimierten. Im Gegensatz dazu ist die Färbung der Zellen, welche die in den Überstand sekretierten Neogeninfragmente exprimierten, lediglich auf dem Niveau der untransfizierten Kontrollzellen anzusiedeln. Der Hintergrund ist auf tote Zellen sowie unspezifische Bindung zurückzuführen. Für eine Bindung an die membranverankerten Neogeninkonstrukte ist die Expression einer verkürzten Extrazellulärdomäne, die lediglich aus den FNIII-Domänen besteht, ausreichend (NeogG und H). Dies steht im Gegensatz zu den Beobachtungen aus dem Interaktionsassay, bei der eine schwache Bindung an die lösliche FNIII-Domäne zwar leicht über der Kontrolle lag, jedoch nicht mit der gesamten Extrazellulärdomäne vergleichbar war.

3. Ergebnisse

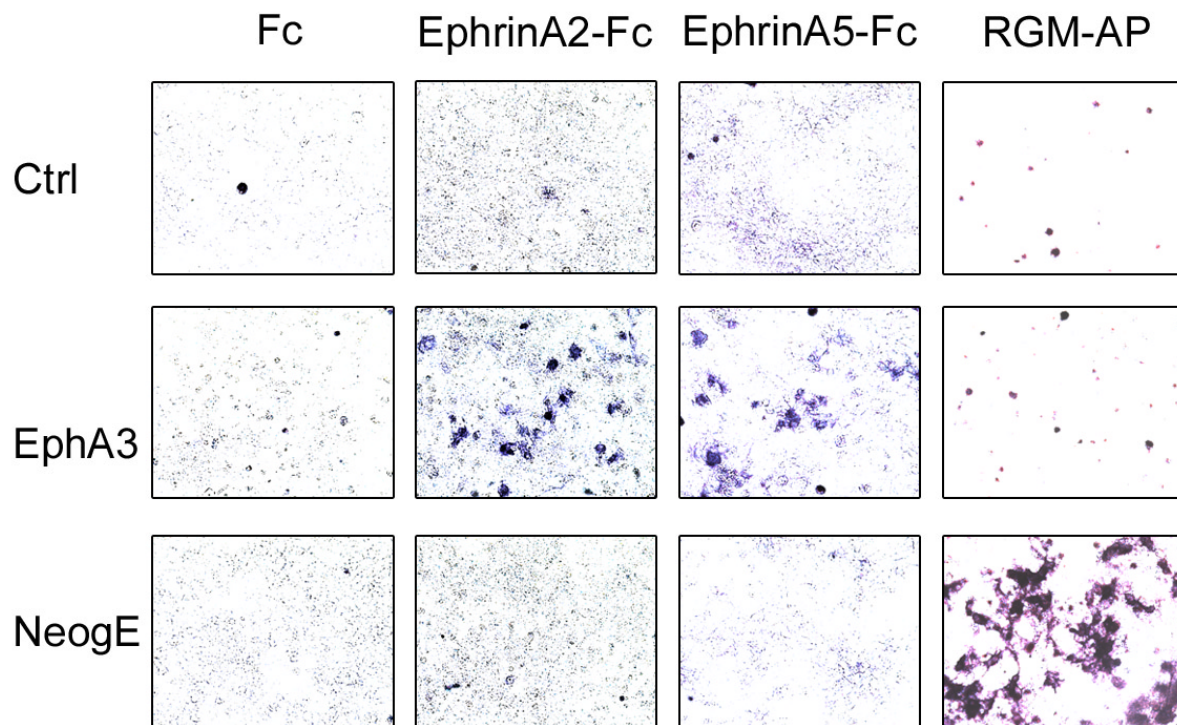


Abbildung 3.17: Bindungsspezifität von Ephrin-A2-Fc, Ephrin-A5-Fc und RGM-AP bezüglich EphA3 bzw. NeogE mittels AP-Färbung. Fc-Konstrukte wurden durch Ig-AP direkt detektiert. Die Ephrine-A2 und -A5 wiesen eine Bindung an den EphA3-Rezeptor auf und RGM-AP an Neogenin.

Um die Interaktion von RGM mit anderen Rezeptoren beziehungsweise von Ephrinen mit Neogenin zu bestimmen, wurde analog vorgegangen und die entsprechenden Konstrukte in Cos7-Zellen transfiziert sowie anschließend mit den verschiedenen Bindungspartnern detektiert. Eine Bindung von Ephrin-A2- beziehungsweise Ephrin-A5-Fc ließ sich nur für den EphA3-Rezeptor nachweisen, genauso wie eine Bindung von RGM-AP nur für NeogE zu erkennen war. Weder Fc alleine band an einen der Rezeptoren noch banden die Ephrine an Neogenin, noch band RGM an den EphA3 Rezeptor. Man erkennt hier bei allen Liganden lediglich eine geringe Hintergrundfärbung, wie sie auch bei untransfizierten Zellen zu beobachten ist.

Weitere Untersuchungen zur Spezifität der RGM-Neogenin Interaktion wurden für die Netrin Rezeptoren DCC und UNC5 sowie bezüglich einer möglichen Kompetition zwischen Netrin und RGM durchgeführt. Neogenin ist zu 50% Homolog zu DCC, einem Rezeptor für das sowohl attraktiv als auch repulsiv wirkende, sekretierte Lenkungsmolekül Netrin. Da für verschiedene Netrine eine Bindung an DCC, Neogenin sowie UNC5H1-H3 gezeigt werden konnte und zumindest DCC und UNC5 als Rezeptoren für Netrin fungieren, bestand die Frage nach der Wechselwirkung von RGM und Netrin, beziehungsweise ob RGM auch an DCC und/ oder UNC5 bindet.

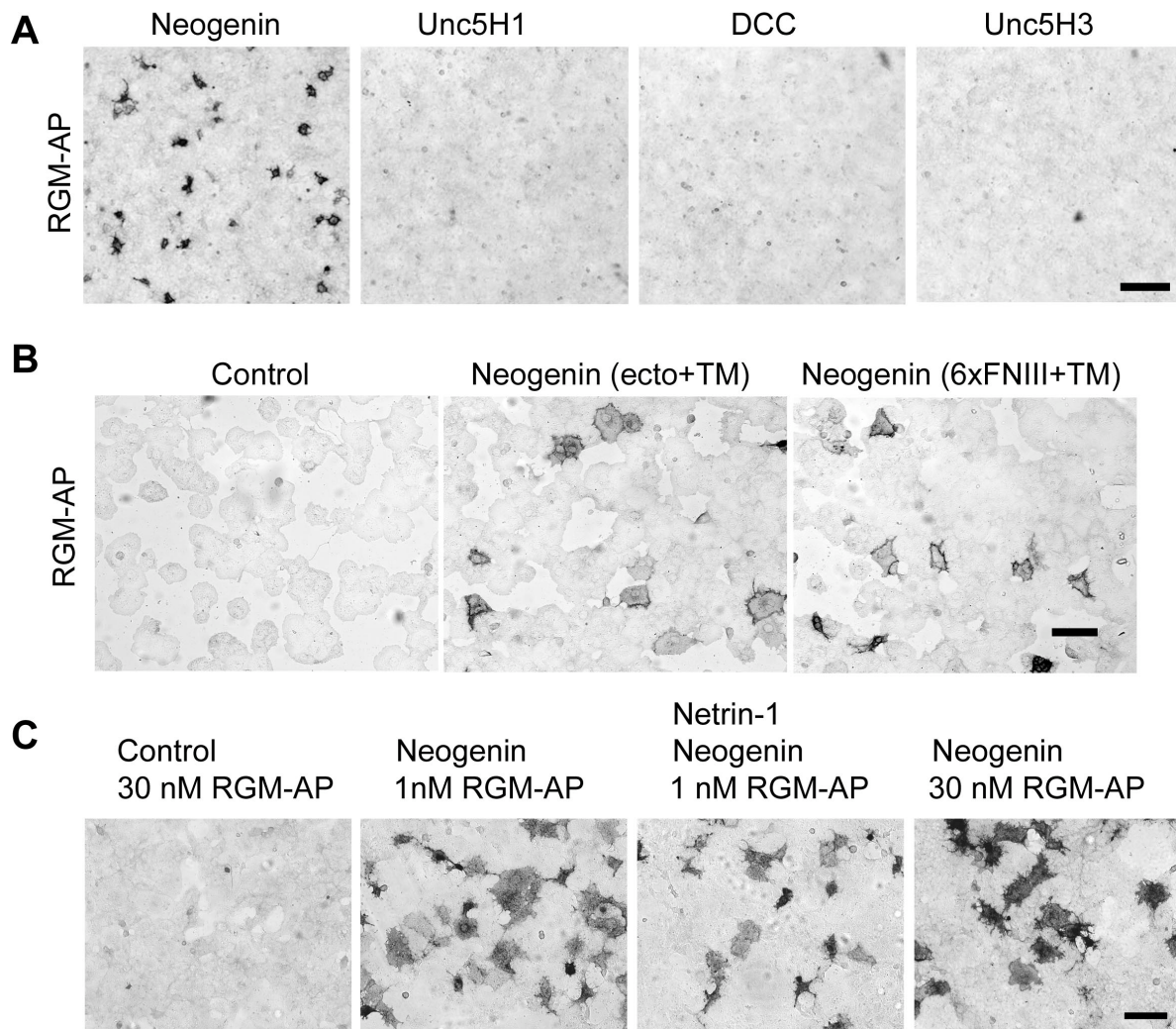


Abbildung 3.18: Spezifität der RGM-Neogeninbindung. A: Unterschiedliche Netrin-Rezeptoren wurden in Cos7-Zellen exprimiert und mit RGM-AP inkubiert. Lediglich die Neogenin exprimierenden Zellen zeigten diesbezüglich ein Signal. B: Verkürzte Neogenin-Konstrukte wurden exprimiert und die RGM-AP Bindung an diese untersucht. Für die Bindung reichte das Vorhandensein der FNIII-Domänen des Neogenin aus. C: Die Gegenwart von Netrin, auch im Überschuss (100 nM) beeinflusste die RGM-Bindung an Neogenin nicht (Rajagopalan, Deitinghoff *et al.*).

Deshalb wurde der zelluläre RGM-AP Bindungstest ebenfalls für die Rezeptoren DCC, UNC5H1 und UNC5H3 durchgeführt (in Kooperation mit S. M. Strittmatter). Man erkennt eindeutig eine spezifische Bindung von RGM-AP an Neogenin und sonst an keinen der Netrin Rezeptoren (3.18 A). Für die Bindung von RGM an Neogenin sind die FNIII-Domänen ausreichend (3.18 B). Zusätzlich wurde der Einfluss der Bindung von Netrin-1 auf die RGM-Neogenin Interaktion getestet, durch Bindung von RGM-AP in Gegenwart von Netrin-1. Wie in der Abbildung 3.18 C zu erkennen ist, beeinflusste Netrin-1 diese Interaktion nicht. RGM-AP wies weiterhin eine Bindung an Neogenin exprimierende Zellen auf, trotz eines großen Überschusses an Netrin (100 nM).

3. Ergebnisse

Die Expression von Neogenin und RGM-bindenden Molekülen in der Retina des Hühnerembryos wurde durch anti-Neogenin-Antikörper- und RAP-Färbungen mit RGM-AP untersucht. Dabei konnte jeweils eine gradierte Expression mit hohem temporalem und niedrigem nasalem Signal nachgewiesen werden.

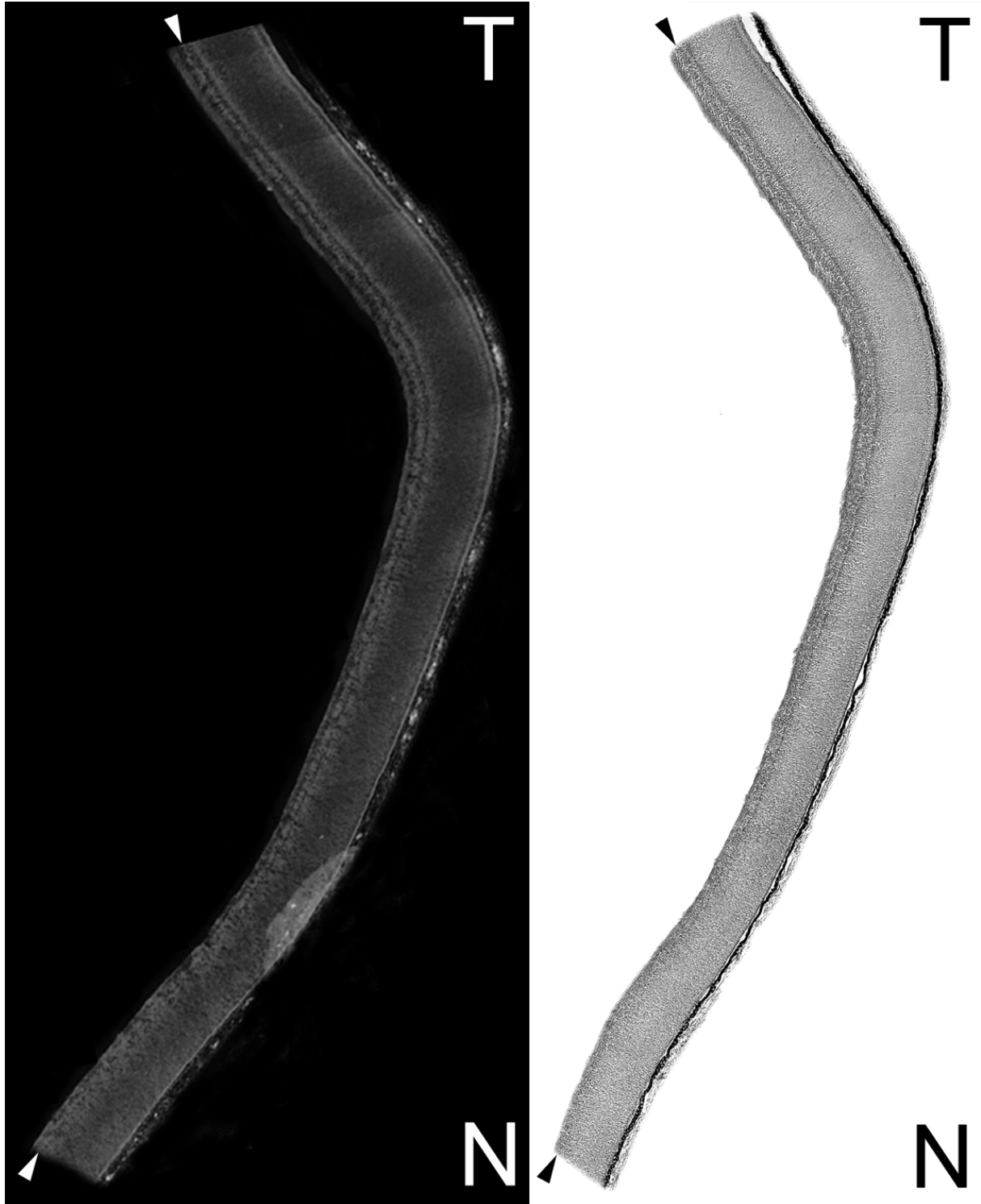


Abbildung 3.19: Vergleich von Immun- und RAP-Färbung. Eine gradierte Verteilung mit starkem temporalem und schwachem nasalem Signal war für beide Färbungen zu erkennen. Zudem stimmen die Expressionsmuster von Neogenin sowie einem RGM-AP bindenden Protein exakt überein. Es wurden Signale in der optischen Faserschichten, der retinalen Ganglienzellschichten (Pfeile), der inneren Körnerschicht sowie der äußeren nukleäre Schicht erhalten (Stadium E8).

Abbildung 3.19 zeigt eine Immunfärbung mit anti-Neogenin Antikörpern sowie eine RAP-Färbung mit RGM-AP der Retina im Stadium E8. Man erkennt in beiden Färbungen einen Gradienten mit starker temporaler und niedriger nasaler Färbung. Die Färbung ist sowohl in der optischen Faserschicht, der retinalen Ganglienzellschicht sowie der sich anschließenden inneren Körnerschicht zu erkennen. Zudem gibt es eine Färbung im Bereich der äußeren nukleären Schicht, wo sich auch die Photorezeptoren finden.

Die Ausschnitte aus den temporalen und nasalen Bereichen der Retina-Färbungen zeigen dies in der Vergrößerung noch deutlicher. Sowohl bei der Antikörper- als auch bei der RAP-Färbung sind die Expressionsunterschiede zwischen temporaler (starkes Signal) und nasaler Retina (schwaches bis kein detektierbares Signal) eindeutig zu erkennen.

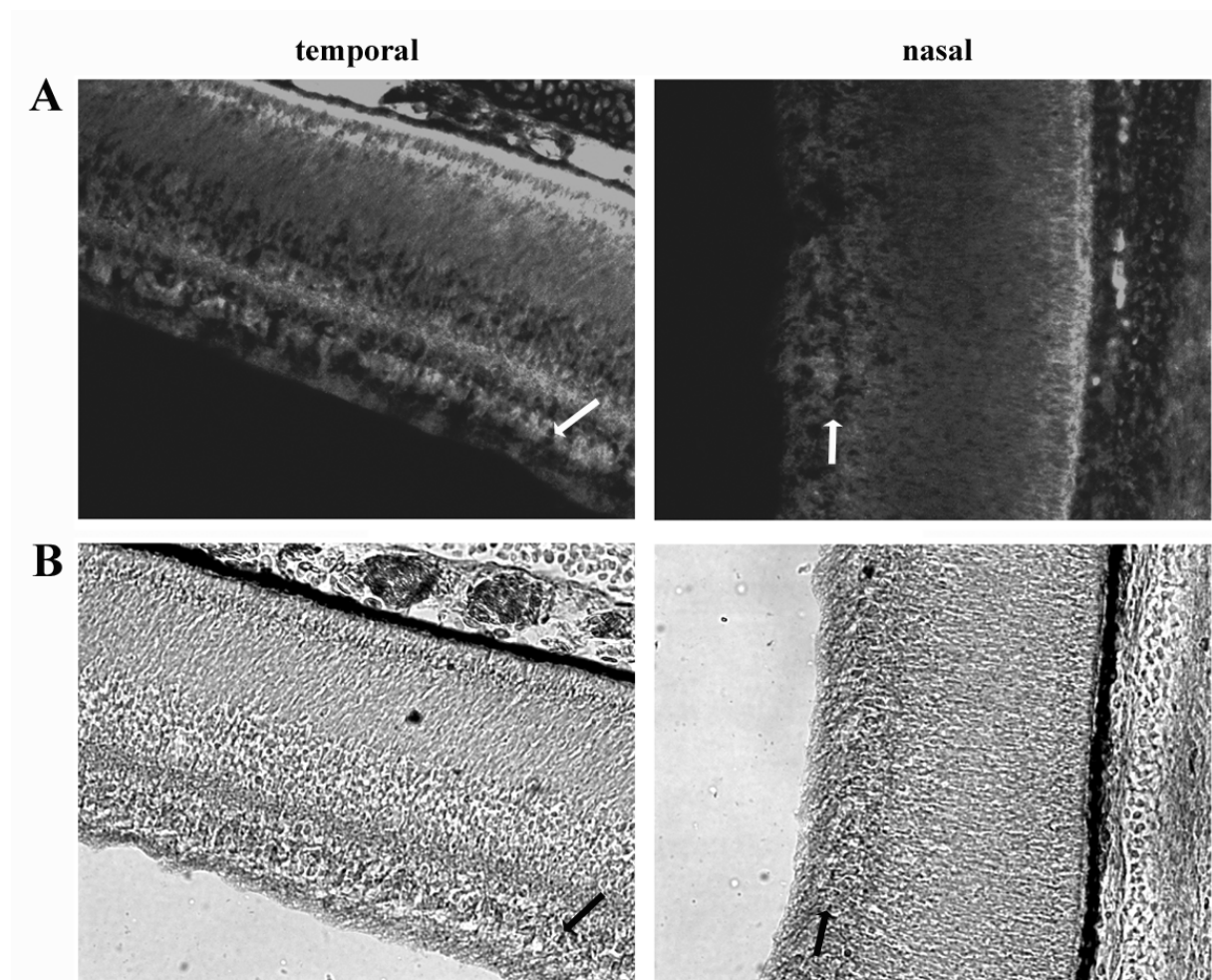


Abbildung 3.20: Ausschnitt aus den Immun- und RAP-Färbungen (Abbildung 3.19). Die beschriebenen Signalmuster sind noch einmal eindeutig zu erkennen, vor allem auch die verschiedene Signalstärke zwischen temporaler und nasale Retina.

Eine weitere Abbildung aus dem Labor von S. Strittmatter zeigt dies ebenfalls noch mal für eine anti-Neogenin Antikörperfärbung, wobei zusätzlich die Signalintensität gemessen wurde.

3. Ergebnisse

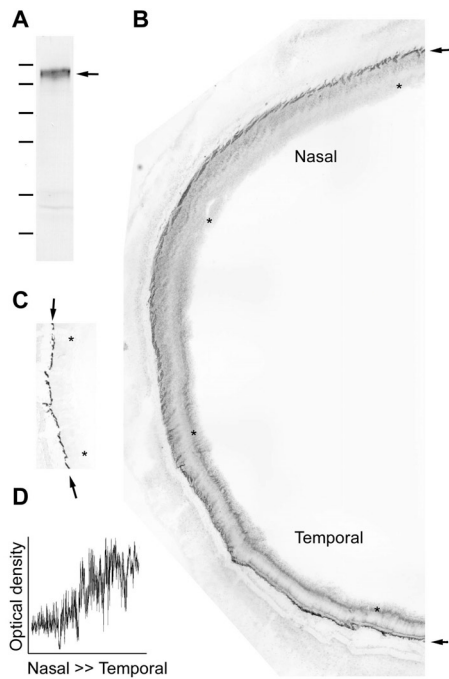


Abbildung 3.21.: Neogenin wird in einem temporal-nasalen Gradienten in der Retina exprimiert (Rajagopalan, Deitinghoff *et al.*)

A: Anti-mNeogenin Antikörper detektiert chNeogenin (Pfeil) aus E11 Hühner Retina im Western Blot. Die Wanderung im Gel des Molekulargewichtstandards von 250, 150, 100, 75, 50 und 37 kDa wird durch die Teilstriche auf der linken Seite angezeigt.

B: Antikörperfärbung mit Anti-Neogenin Antikörpern von E11 Hühnerretina. Die Färbung der retinalen Ganglienzellschicht (*) ist temporal stärker als nasal. Das Pigmentepithel wird durch Pfeile angezeigt.

C: Das Weglassen des anti-Neogenin Antikörpers bei der Immunfärbung führt zu einem Verlust des Signals in der temporalen Ganglienzellschicht (*). Nur das Pigmentepithel der temporalen Retina ist noch sichtbar (Pfeile).

D: Mikrodensitometrische Messung durch die retinale Ganglienzellschicht von gefärbten Schnitten (siehe B) zeigt den Gradienten mit niedrigem nasalem und hohem temporalem Signal.

Eine Titration mit abnehmender Antikörperkonzentration bei *in vitro* kultivierten retinalen Ganglienzell-Explantaten zeigte ebenfalls ein stärkeres Signal auf temporalen Axonen im Vergleich zu nasalen. Abbildung 3.22 zeigt dies für eine Antikörperverdünnung von 1:1000, bei der die unterschiedliche Signalintensität zu erkennen war.

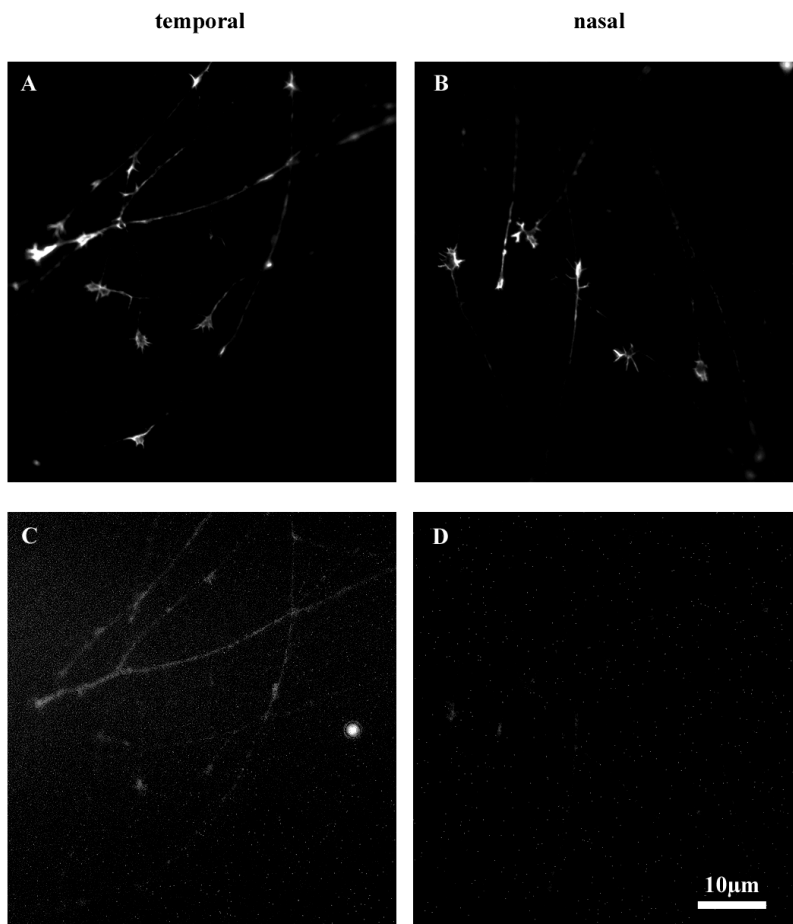


Abbildung 3.22: Doppelfärbung mit Alexa-phalloidin 408 (A/B) und anti-Neogenin Antikörper (C/D) von temporalen (A/C) und nasalen (B/D) Axonen. Die Abbildung zeigt Aufnahmen einer 1:1000 Verdünnung des anti-Neogenin Antikörpers. Die Titration ergab, dass geringere Verdünnungen gleiche Signalintensitäten hervorriefen, bei höheren Verdünnungen konnte kein Signal mehr detektiert werden. Die Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss Axioplan Mikroskop unter den gleichen Aufnahmebedingungen.

3.9 Streifentest

Die Bindung von RGM an Neogenin allein reichte für die Definition als Rezeptor nicht aus. Deshalb wurde ein allgemein anerkannter und im Bereich der Lenkungsforschung etablierter Test angewendet, um die biologische Aktivität von Neogenin *in vitro* zu untersuchen.

Es handelte sich hierbei um ein klassisches Experiment, den sogenannten Streifentest (Walter *et al.*, 1987a, b, Müller *et al.*, 1990), bei dem anteriore (A) und posteriore (P) Membranen aus Hühnerembryotecten präpariert und in alternierenden Streifen auf einen Filter gesaugt wurden. Anschließend wurden Retinaexplantate mit nasalen und temporalen Abschnitten der Retina auf die Filter aufgelegt, inkubiert, nach 48h Wachstum fixiert, gefärbt und dann ausgewertet. Dabei beobachtete man, dass Axone aus dem nasalen Bereich der Retina keine Präferenz für eines der beiden Substrate zeigten und quer über die Streifen wuchsen, wohingegen temporale Axone eindeutig bevorzugt auf anterioren Membranen wuchsen (von Boxberg *et al.*, 1993). Der hier vorliegende Mechanismus beruht auf einer Vermeidung von repulsiven Molekülen, im Falle der posterioren Membranen bestehen diese mindestens aus den GPI-verankerten Glykoproteinen Ephrin-A2 und -A5, sowie RGM (*repulsive guidance molecule*). Behandelte man die posterioren Membranen vorher mit PI-PLC (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C), welche spezifisch GPI-verankerte Proteine von der Membran abspaltet, so wurde kein gestreiftes Wachstum der temporalen Axone mehr beobachtet (Walter *et al.*, 1990).

Entsprechend dem oben beschriebenen Versuchsaufbau, wurden retinale Ganglienzellaxone auf alternierenden anterioren (A) und posterioren (P) Membranstreifen aus Hühnertectum wachsen gelassen. Zusätzlich wurde gereinigtes Neogeninfragment (NeogD = extrazelluläre Domäne, Neogenin-Ecto) in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und der Einfluss auf die Lenkung von temporalen Axonen untersucht. Abbildung 3.23 zeigt Streifen nach 48 h Wachstum in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen NeogD. In der Kontrolle zeigte sich eine eindeutige Entscheidung der temporalen Axone, in der sie fast ausschließlich auf anterioren Membranstreifen wuchsen. Die Streifen aus posterioren Membranstreifen wurden hingegen gemieden. Nasale Axone zeigten wie erwartet keine Entscheidung. Mit zunehmender Neogeninkonzentration wurde die Entscheidung temporaler Axone aufgehoben, so dass diese bei vollständiger Aufhebung kreuz und quer auf den Streifen wuchsen, ohne sich von posterior vorkommenden Lenkungsmolekülen beeinflussen zu lassen.

3. Ergebnisse

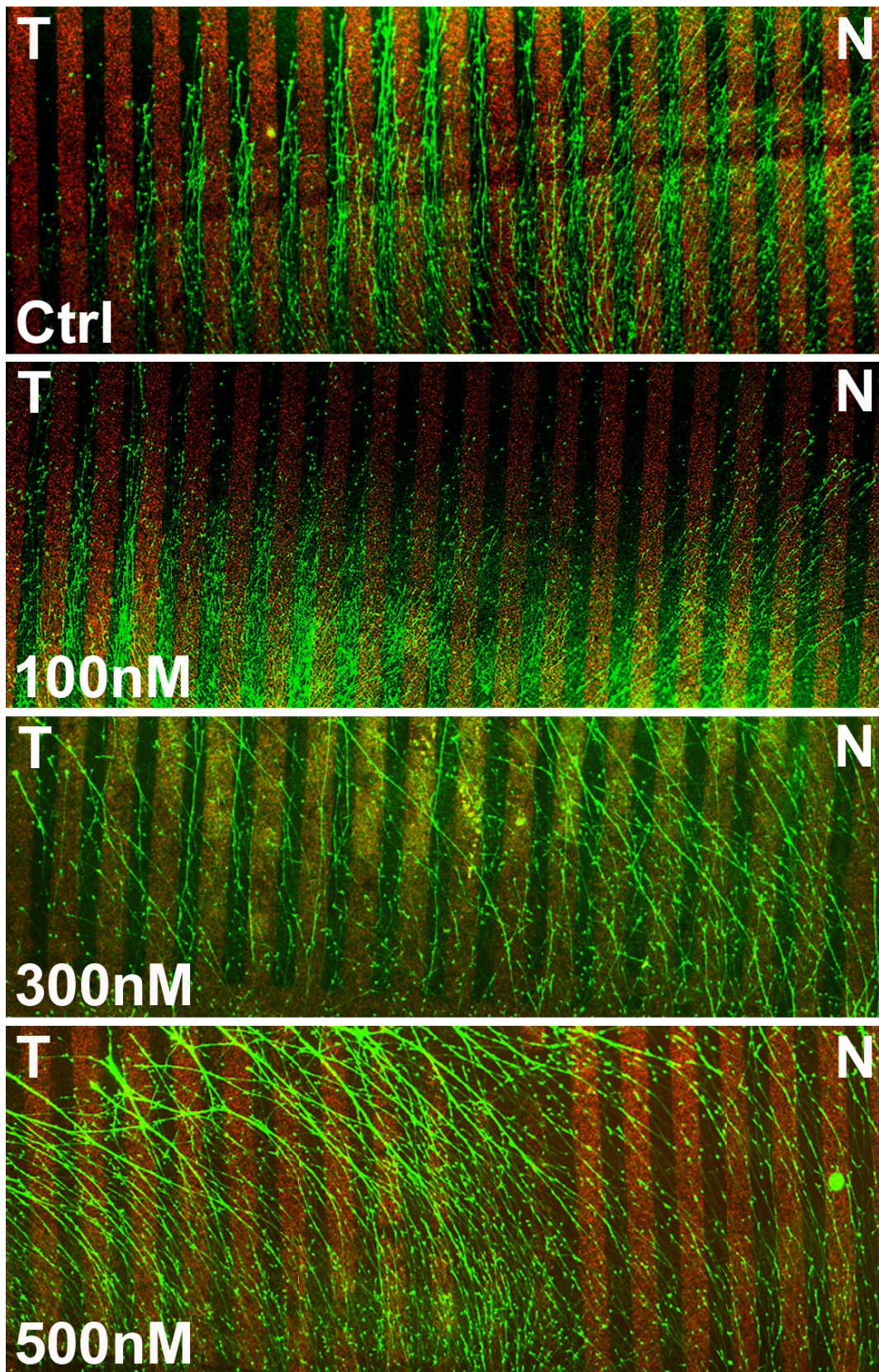


Abbildung 3.23: Streifenassay. Retinaexplantate mit temporalen und nasalen Axone wurden auf alternierenden Streifen aus posterioren (rot) und anterioren (schwarz) Tectummembranen wachsen gelassen, in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen rekombinant exprimierter Neogenin Extrazellulärdomäne. Mit steigender Konzentration von Neogenin wurde die in der Kontrolle gezeigte starke Entscheidung der temporalen Axone zunehmend aufgehoben, nasale Axone zeigten zu keiner Zeit eine Entscheidung.

Eine Blindauswertung der Streifen nach der beschriebenen Methode (Walter *et al.*, 1987b, Ciossek *et al.*, 1998) und anschließende Auftragung der Werte gegen die Neogenin-Ecto-Konzentration führte zu folgendem Diagramm:

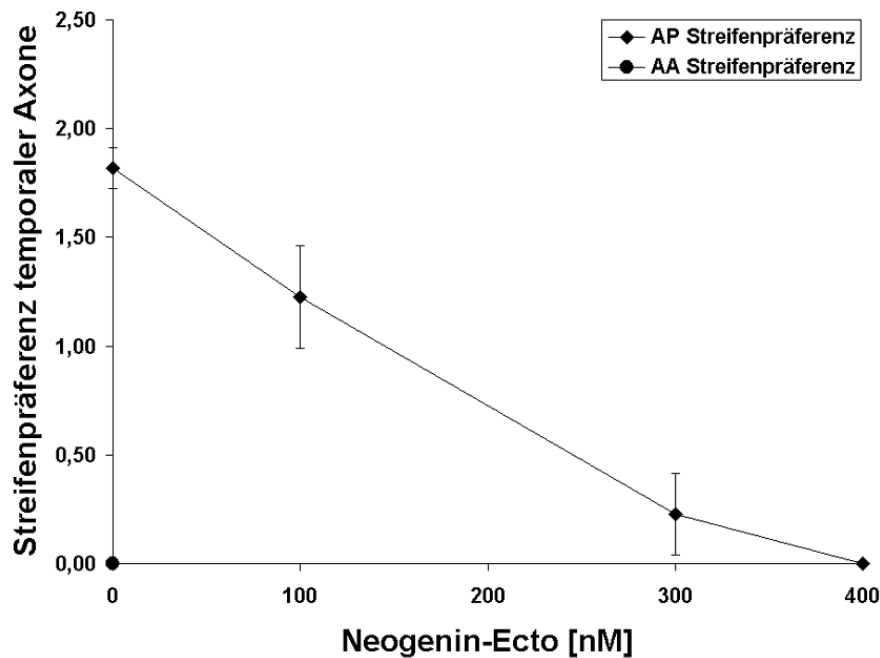


Abbildung 3.24: Dosis-Wirkungskurve von Neogenin im Streifenassay. Die Präferenz der temporalen Streifen wurde für unterschiedliche Neogenin-Ecto Konzentrationen ausgewertet und diese Werte gegen die Konzentration aufgetragen. Mit zunehmender Konzentration nahm die Präferenz der temporalen Axone für anteriore Streifen ab, bis diese bei 400nM komplett aufgehoben wurde.

Man erkennt eine Abnahme der Werte der Entscheidungspräferenz temporaler Axone mit zunehmender Neogenin-Ecto Konzentration. Eine vollständige Aufhebung ist ab einer Konzentration von 400 nM zu beobachten. Dies entspricht dem Wert der Negativ-Kontrolle, bei der das Wachstum und die Entscheidung von temporalen Axonen auf Teppichen mit anterioren gegen anteriore Streifen überprüft wurde.

4. Diskussion

Im Laufe der letzten Jahre wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung der Ausbildung des Nervensystems während der Embryonalentwicklung eine Vielzahl von Komponenten und Molekülen identifiziert und charakterisiert. Dabei wurden sowohl Strukturelemente, die für den Aufbau der beteiligten Zellen, Nervenfasern und deren Umgebung verantwortlich sind, als auch regulierende Moleküle, die einen direkten Einfluss auf die Ausbildung der Gewebe sowie das Wachstum und die Wegfindung der Nerven haben, beschrieben. Ein Fokus der Untersuchungen richtete sich auf die Frage, wie die auswachsenden Axone den richtigen Weg finden und vor allem auch, wie sie den jeweiligen Partner im Zielgebiet finden. Die bereits 1963 von Sperry entwickelte Chemoaffinitätstheorie legte dabei eine wichtige Grundlage für die Untersuchungen, die allerdings erst mit Beginn der 80er Jahre in Gang kamen. Sperry postulierte das Vorhandensein von zytochemischen Signalen (sogenannte *tags*) sowohl im Ursprungs- als auch im Zielgebiet. Diese *tags* würden jede Zelle mit einer Positionsinformation versorgen, so dass ein Zusammentreffen von korrespondierenden Zellen gewährleistet wäre, wenn einwachsende Axone, die ein spezifisches Rezeptormolekül tragen, spezifisch mit dem Gegenrezeptor im Zielgebiet interagieren. So wurden seitdem zahlreiche Moleküle entdeckt, die die Axone durch einen attraktiven oder repulsiven Effekt auf den richtigen Weg führen. Eine Vielzahl dieser Moleküle wurde bereits in der Einleitung detailliert beschrieben. Weiterhin wurden gegenläufige Gradienten von Liganden und zugehörigen Rezeptoren im Zielgebiet und auf den einwachsenden Axonen gefunden, die an der Ausbildung von sogenannten topographischen Karten wesentlich beteiligt sind. Ein besonders intensiv untersuchtes Studienobjekt war dabei die Ausbildung des retinotectalen Systems im Hühnerembryo. Hier wurden wesentliche Grundlagen bei der Erforschung der topographischen Karten sowie auch bezüglich der Gestaltung von *in vitro* Testsystemen (Walter *et al.*, 1987 a und b, Cox *et al.*, 1990, Raper und Kapfhammer, 1990) gelegt. Zusätzlich konnte mit der Isolierung und Charakterisierung einiger Mitglieder der Ephrinfamilie und ihrer Rezeptoren erstmals ein konkretes Verständnis bezüglich der bei der Ausbildung des retinotectalen Systems vorliegenden Mechanismen gewonnen werden (Cheng und Flanagan, 1994, Cheng *et al.*, 1995, Drescher *et al.*, 1995, Monschau *et al.*, 1997). Dennoch reichten die bekannten Komponenten des Systems für eine vollständige Erklärung noch nicht aus, zudem mindestens ein weiteres Molekül, das 1990 bereits biochemisch isoliert wurde und *in vitro* repulsive Aktivität gegenüber retinalen Ganglienzellen zeigte (Stahl *et al.*, 1990, Mueller *et al.*, 1996), bekannt war.

4. Diskussion

Die Klonierung dieses repulsiven Lenkungsmoleküls (*repulsive guidance molecule*, RGM) wurde deshalb lange erwartet und gelang schließlich durch PD Dr. B. K. Müller und Kollegen im Jahr 1999. Von besonderem Interesse war dabei, dass es sich um eine vollkommen neue Familie (der Datenbankabgleich ergab für Mensch und Maus zwei weitere Homologe) handelt, die zwar analoge Eigenschaften zu den Ephrinen aufweist, aber dennoch unabhängig von diesen zu sein scheint. Im Rahmen dieser Arbeit wurden wichtige Beiträge besonders bezüglich der zeitlichen und räumlichen Expression von RGM sowie bei der Strukturaufklärung geleistet, die in die Publikation Monnier *et al.* (2002) einfließen. Diese Publikation stellt einen wichtigen Beitrag dar, um den Mechanismus der Ausbildung von topographischen Karten zu einem Gesamtbild zusammenfügen zu können.

Mit der Identifizierung dieses neuen Lenkungsmoleküls kam zugleich die Frage nach möglichen Bindungspartnern beziehungsweise Rezeptoren auf. Hierzu lagen bisher noch keine Erkenntnisse vor. Erste Untersuchungen zur Lokalisation wurden im Rahmen einer früheren Arbeit (Deitinghoff, 2001) vor allem auch im Vergleich mit der RGM Expression durch L/RAP (*ligand/ receptor affinity probe*) Färbungen durchgeführt. Allerdings lag dabei das Hauptaugenmerk auf der Herstellung eines geeigneten Werkzeugs in Form eines Fusionsproteins bestehend aus RGM und alkalischer Phosphatase (RGM-AP). Es konnte dennoch zumindest eine Lokalisation im retinotectalen System bestätigt werden. Darauf basierend wurden im Rahmen dieser Arbeit wesentliche Verbesserungen vor allem in Bezug auf die Expressionsrate und einer Steigerung der Proteinmenge des AP-Fusionsproteins vorgenommen, beschrieben im zweiten Teil der vorliegenden Dissertation. Mit Hilfe dieser verbesserten und effizienteren Werkzeuge wurden dann Untersuchungen zur Lokalisation von möglichen Bindungspartnern durchgeführt. Die bereits bekannten Ergebnisse konnten dabei bestätigt werden, und es wurden zusätzlich neue Erkenntnisse gewonnen, die im Abschnitt 4.4.1 diskutiert werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden zwei Ansätze zur Isolierung von RGM Bindungspartnern beziehungsweise potentiellen Rezeptoren verfolgt, zum einen ein biochemischer, bei der die Bindungspartner über die Affinität zu RGM als Protein isoliert werden sollten und zum anderen ein molekularbiologischer mittels Screening einer Expressionsbibliothek, bei der auch die Protein-Protein Wechselwirkung zur Detektion verwendet wird, aber durch das Verwenden der Bibliothek auf die DNA-Sequenz zurückgegriffen werden kann.

Schließlich wurde im abschließenden Teil der Arbeit ein im vorangegangenen Abschnitt isoliertes Molekül, Neogenin, das aufgrund der bekannten Eigenschaften als potentieller Rezeptor für RGM fungiert, näher charakterisiert und vor allem die Interaktion mit RGM, die

Wechselwirkung mit anderen Lenkungsmolekülen sowie seine mögliche Funktion als Rezeptor untersucht. Diese Ergebnisse flossen in eine Publikation ein, die zur Zeit für die Veröffentlichung vorbereitet wird (Rajagopalan, Deitinghoff *et al.*, 2003). Durch die Kooperation mit Prof. S. M. Strittmatter konnte eine funktionelle Aktivität des RGM-Neogenin Systems als neue Komponente bei der axonalen Lenkung im retinotectalen Systems gezeigt werden. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit innerhalb kurzer Zeit ein neues Rezeptor-Ligand System bei der Axonlenkung sowohl funktionell als auch strukturell charakterisiert werden.

4.1 Expression von RGM

Die zeitliche Begrenzung der Expression während der Embryonalentwicklung von bestimmten Genen ist ein erster Hinweis auf die Beteiligung dieser bei der Entwicklung. Deshalb wurde der Expressionszeitraum von RGM untersucht, um zu analysieren, ob im fraglichen Zeitraum überhaupt ein Signal vorliegt. Eine Methode, um spezifische mRNA oder Boten RNA (englisch *messenger RNA*) nachzuweisen, ist die Northern Blot Analyse. Dazu wird die RNA aus dem Gewebe extrahiert, im Agarosegel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit spezifischen *antisense* Sonden untersucht. Für RGM wurde die RNA zum einen aus dem Hühnertectum zur Untersuchung des retinotectalen Systems und zum anderen in Kooperation mit Prof. Dr. T. Skutella aus dem Hippocampus der Ratte zwecks Untersuchung der entorhinalen Projektion verwendet. Es wurden jeweils aus dem für die Entwicklung dieser Systeme relevanten Zeiträume sowie den sich anschließenden Entwicklungsstadien RNA-Proben untersucht. Dabei zeigte sich eine starke Expression zu Beginn der Entwicklung dieser Systeme und bis zu ihrem Abschluss. Anschließend wurde eine entsprechende Herunterregulierung des Signals auf ein geringes, basales Niveau beobachtet. Diese Aufrechterhaltung einer Expression auf niedrigem Level beruht vermutlich auf der Bewahrung einer gewissen Flexibilität des Systems. Diese Daten entsprachen den Erwartungen, dass eine zeitliche Begrenzung während des Auswachsens der Fasern und der Ausbildung des Systems die Spezifität des Signals wesentlich erhöht und dass nach Beendigung der Ausbildung dieses entsprechend wieder verschwindet. Analog wurde auch für andere Lenkungsmoleküle und Rezeptoren eine entsprechende zeitliche Begrenzung der Signale festgestellt (zum Beispiel Vielmetter *et al.*, 1994, Drescher *et al.*, 1995, Demyananko und Maness, 2002). Man kann deshalb davon ausgehen, dass ähnliche Mechanismen auch bezüglich der RGM Expression wirksam sind.

Eine weitere Anwendung fanden die spezifischen RGM-Sonden auch bei der Lokalisierung der RGM-Expression, denn nicht nur die exakte zeitliche Anwesenheit des Signals ist von

4. Diskussion

Bedeutung, sondern auch die räumliche. Für das retinotectale System wurde dementsprechend für RGM eine gradierte Expression mit hohem posterioren und niedrigem anterioren Signal erwartet. Die Expressionsdaten der Ephrine-A2 und -A5 im Tectum (Cheng *et al.*, 1995, Drescher *et al.*, 1995, Monschau *et al.*, 1997), die Isolierung des 33 kDa Moleküls mit unterschiedlicher Konzentration im posterioren (hoch) und anterioren (niedrig) Tectum (Stahl *et al.*, 1990) sowie Immunfärbungen mit dem monoklonalen F3D4 Antikörper gegen RGM (Mueller, 1997) ließen für die Ligandenexpression das angesprochene Expressionsmuster erwarten. Die Axone wachsen vom anterioren zum posterioren Pol und werden je nach ihrer Herkunft durch steigende Ligandenkonzentration an der Stelle inhibiert, an der die Rezeptordichte und/ oder die Rezeptorsensitivität (Hornberger *et al.*, 1999) auf dem Wachstumskegel entsprechend hoch genug ist, damit das Signal in ausreichender Stärke weitergeleitet wird. Für temporale Axone ist dies bereits für geringe Mengen Ligand ausreichend; Axone, die aus der nasalen Region kommen, sind hingegen weniger sensitiv und benötigen ein sehr starkes Signal, damit deren Wachstum gestoppt wird. Diese starke repulsive Aktivität wurde bisher nur für Ephrin-A5 beobachtet, welches im äußersten posterioren Tectum lokalisiert ist (Drescher *et al.*, 1995, Monschau *et al.*, 1997).

In situ Hybridisierungen von Gewebeschnitten des Hühnertectums mit RGM-spezifischen Sonden zeigten ein entsprechendes Expressionsmuster für RGM. Demnach lag ein Gradient mit hoher posteriorer und niedriger anteriorer RGM-Expression vor. Analog zum Ephrin-A5 wurde eine starke Färbung der periventriculären Schicht sowie eine schwache Färbung einer weiter oben gelegenen Schicht detektiert. Dabei konnte die Entstehung des Gradienten auf eine differenzierte Expressionsrate an Stelle einer unterschiedlichen Zelldichte von RGM exprimierenden Zellen zurückgeführt werden. Denn eine Färbung der Zellkerne mit DAPI zeigte eine konstante Zelldichte in der periventriculären Schicht.

Immunfärbungen mit verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche RGM-Peptide bestätigten diesen Gradienten. Allerdings war die Detektion aufgrund starker Hintergrundsignale sehr schwierig. Durch starke Verdünnungen der Erst- als auch Zweitantikörper sowie lange Belichtungszeiten bei den Aufnahmen konnten entsprechende Gradienten im *Stratum opticum* detektiert werden. Lediglich der R1 Antikörper zeigte zusätzlich eine Färbung radialer Gliazellen sowie in der periventriculären Schicht, wie sie analog bei den Ephrinen zu beobachten ist (Drescher *et al.*, 1995, Monschau *et al.*, 1997). Dadurch lässt sich auch die unterschiedliche Lokalisation von mRNA Signalen und Proteindetektion durch Immunfärbung erklären. Demnach wird das Protein im Soma der radialen Gliazellen produziert und anschließend in die Endfüßchen an der Oberfläche des Tectums transportiert, die in Kontakt mit den ein-

wachsenden RGC Axonen steht. Zusätzlich sollte RGM noch von anderen Zelltypen exprimiert werden, da die zugehörige RNA auch in zwischengelagerten Schichten zu finden war. Die Färbungen mit dem R1 Antikörper wiesen auf jeden Fall auch in diese Richtung. Entsprechende Vorgänge wurden für die Ephrine ebenfalls beobachtet (Monschau *et al.*, 1997).

Vom Expressionsmuster her betrachtet ist festzustellen, dass RGM sich für die Ausbildung des retinotectalen Systems und seine entsprechende Beteiligung an dieser zur richtigen Zeit am richtigen Ort befindet. Die spezifische Expression während der Ausbildung der Systeme und die örtliche Begrenzung auf die beteiligten Regionen der Axonlenkung unterstützen die Annahme, dass RGM an der Entwicklung des retinotectalen Systems beteiligt ist. Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten im Kollaps- und Streifenest (Monnier *et al.*, 2002, T. Skutella, unveröffentlicht) bestätigten eine funktionelle repulsive Aktivität des RGM. RGM verfügt somit über alle wesentlichen Merkmale, über die auch die Ephrine-A2 und -A5 als repulsive Lenkungsmoleküle bei der Ausbildung des retinotectalen Systems definiert wurden. Die Identifizierung dieser neuen Familie von Axonlenkungsmolekülen trägt zum Verständnis der an der Ausbildung topographischen Karten beteiligten Komponenten bei und diese Erkenntnisse helfen bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Axonlenkung.

4.2 Optimierung der RGM-AP Expression und Nachweis von RGM-bindenden Proteinen im retinotectalen System

Ein wichtiges Werkzeug für die Identifizierung und Charakterisierung von Rezeptoren ist eine Sonde, die aus Teilen oder dem gesamten Liganden sowie einer zusätzlichen Komponente zur Detektion dieser Sonde besteht. Da zum einen das Arbeiten mit Radioaktivität eine entsprechende Laborausstattung voraussetzt und zum anderen immer besser entwickelte alternative Methoden zur Verfügung stehen, wurde trotz eventuell höherer Spezifität und Signalintensität aufgrund der angeführten Punkte auf ein Arbeiten mit Radioaktivität verzichtet. Stattdessen wurde als Strategie für die Herstellung einer spezifischen RGM-Sonde zur Isolierung RGM-bindender Moleküle, die Verwendung eines Fusionsproteins aus RGM und der humanen plazentalen alkalischen Phosphatase gewählt. Die Auswahl dieser erfolgte aufgrund folgender Vorteile. Es gibt sehr weit entwickelte und ausgereifte Protokolle zur Detektion mittels spezifischer Substratreaktionen. Wegen einer großen Hitzestabilität bei 67°C über mehr als 14h lässt sich die Spezifität des Signals durch entsprechende Wärmebehandlung wesentlich erhöhen, da endogene Phosphatasen zum Beispiel dann nicht mehr aktiv sind. Außerdem bleibt die Enzymaktivität an sich sehr lange erhalten, wodurch aufgrund der Substratreaktion

4. Diskussion

eine hohe Sensitivität erreicht wird. Zudem bildet sie im nativen Zustand Oligomere, das heißt ein Clustering mit Antikörpern wie etwa bei Fc- oder His-Markern ist hier nicht mehr nötig. Diese Eigenschaft hat sich als besonders wichtig erwiesen, da RGM im Western Blot auch eine Bande in der Größe des Dimers aufweist und im Vergleich die Ephrine zum Beispiel ebenfalls nur geclustert aktiv (Davis *et al.*, 1994) sind. Zudem konnte mit dem löslichen His-markierten RGM *in vitro* keine Aktivität im Kollapstest gezeigt werden, sondern nur für membrangebundenes RGM, was zusätzlich für ein Clustering in sogenannten *rafts* spricht. Diese *rafts* sind spezielle Mikrodomänen der Zellmembran (<100nm) (Friedrichson und Kurzchalia, 1998, Varma und Mayor, 1998), in denen spezifisch Sphingolipide und Cholesterol angereichert sind. Die Anreicherung dieser Mikrodomänen mit GPI-verankerten und Transmembranrezeptoren sowie intrazellulären Signalvermittlern, wie etwa trimeren und kleinen GTPasen, Src-Familienmitgliedern (Simons und Ikonen, 1997), *lipid second messengers* und einer Vielzahl von zytoplasmatischen Signaltransduktoren, ließ auf eine Funktion dieser als Signalzentren schließen (Harder *et al.*, 1998, Brückner *et al.*, 1999, Anderson, 1998, Brown und London, 1998, Tsui-Pierchala *et al.*, 2002). Die meisten Proteine werden aufgrund von Lipidmodifikationen, wie GPI- oder Acyl-Ankern in die *rafts* eingelagert, da diese eine sehr dichte Packung der Proteine in den Mikrodomänen erlauben. Für RGM konnte aufgrund seiner GPI-Verankerung sowie seiner Funktion als Signalmolekül ebenfalls von einer Einlagerung in *rafts* ausgegangen werden, und ebenso davon, dass für eine Bindung an den Rezeptor zumindest eine Dimerisierung aufgrund der fehlenden repulsiven Aktivität als Monomer und der Detektion von Dimeren in der Gelelektrophorese notwendig ist.

Ein kritischer Punkt war die Expressionsrate des RGM-AP Fusionskonstrukts. Deshalb wurden zwei unterschiedliche Konstrukte hergestellt, eines bestehend aus dem gesamten extrazellulären Teil von RGM (ohne GPI-Ankerdomäne) sowie ein um die hydrophobe Region verkürztes (ebenfalls ohne GPI-Ankerdomäne) RGM. Bei letzterem war die Überlegung, dass die Deletion der hydrophoben Domäne zu einer besseren Löslichkeit sowie aufgrund der geringeren Größe auch zu einer erhöhten Proteinsynthese führt. Wie sich bereits bei den ersten Konstrukten im APTag-2 Vektor herausstellte, wurde das kürzere Fusionsprotein überhaupt nicht synthetisiert oder bei der Translation beziehungsweise im sekretorischen Pathway wieder abgebaut. Zellen besitzen einige intrazelluläre proteolytische Wege, um missgefaltete oder denaturierte Proteine zu entsorgen. So findet ein Großteil des Proteinabbaus in Lysosomen statt, eine andere Möglichkeit ist der Abbau in sogenannten Proteasomen, von denen Proteine mit einer Ubiquitinmarkierung gespalten werden (Lodish *et al.*, 2000).

Auch die Umklonierung in den pSecTag2-B Vektor, welcher eine andere Signalsequenz besitzt, führte für das Konstrukt ohne die hydrophobe Domäne zu keiner Expression. Diese scheint also essentiell für die RGM-Expression zu sein. Bezüglich des längeren RGM-AP Konstrukts wurde bereits im APtag-2 Vektor eine Expression beobachtet, jedoch nicht in einer ausreichenden Menge. Die Umklonierung als RGM-AP in den pSecTag2-B Vektor mit dem Vektor-eigenen Signalpeptid führte zu einer wesentlich besseren Expression, zumal gleichzeitig auch noch aufgrund der im Vektor vorhandenen myc- und HexaHis-Marker eine bessere und schnellere Aufreinigung und Detektierbarkeit möglich wurde. Die Selektion stabil exprimierender Zelllinien mit Zeocin führte schließlich zu einer sehr guten und für die weiteren Zwecke zufriedenstellenden Expressionsrate. Die Steigerung der Expression konnte mittels des AP-Testes eindeutig belegt werden und die Expression wurde bei jeder Aufreinigung ebenfalls kontrolliert. Nach circa 20-30 Übergängen in der Zellkultur ließ die Rate jedoch aufgrund von Zellalterungsprozessen stark nach, so dass eingefrorene Zellen des stabilen Zellklons aufgetaut und hochgezogen werden mussten. Eine Beeinträchtigung der Expression aufgrund des Einfrier- und Auftauprozesses konnte nicht beobachtet werden.

Die Analyse des RGM-AP im SDS-Gel und Western Blot ergab, dass dieses vollständig exprimiert wurde. Die AP-Aktivität konnte mittels AP-Test sowie Dot-Blot (einer Methode, bei der hitzeinaktivierter Zellkulturüberstand direkt auf Nitrocellulosemembranen in Tropfenform aufgetragen wird und dann die alkalische Phosphatasereaktion durch Substratzugabe gestartet wird) und anschließender Entwicklung nachgewiesen werden. Weiterhin entsprach das Laufverhalten in der SDS-PAGE im Vergleich zu AP alleine dem des nativen RGM beziehungsweise des rekombinant exprimierten löslichen RGM (siehe Ergebnisteil 3.3). Auch die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose über den C-terminalen HexaHis-Marker belegt die vollständige Expression, da die Proteinsynthese vom N- zum C-Terminus durchgeführt wird. Eine Aufreinigung wäre bei einem vorzeitigen Kettenabbruch somit nicht möglich. Aufgrund dessen dass identische Laufverhalten im SDS-Gel sowohl für RGM-AP wie für das native RGM beobachtet wurden, wurde das Protein nach affinitätschromatographischer Aufreinigung (mit C-terminalem His-Marker), Auftrennung im SDS-Gel sowie Transfer auf Nitrocellulosemembran auch einer N-terminalen Sequenzierung unterworfen. Die Sequenzierung durch Edman-Abbau, durchgeführt von der Firma Toplab, ergab, dass RGM als reifes Protein mit der Aminosäure 150 anfängt. Dies deutet auf eine posttranslationale proteolytische Spaltung von RGM zwischen den Aminosäuren 149 und 150 hin. Dies erklärte zudem die Differenz zwischen der berechneten Molmasse von 42 kDa und dem im SDS-Gel beobachteten Laufverhalten des nativen RGM mit einem relativen Molekulargewicht von 33.

4. Diskussion

Versuche zur repulsiven Aktivität des RGM-AP im Vergleich zum rekombinant exprimierten, löslichen RGM-His im Kollapstest zeigten keine Wirkung (A. Sierra und L. Deitinghoff, Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte eine Entscheidung temporaler Axone nach Bindung von RGM-AP an Antikörperstreifen auf Deckgläschen gezeigt werden (S. Strittmatter, persönliche Mitteilung). Dies weist zusammen mit den Daten des nur membrangebunden aktiven RGM erneut daraufhin, dass RGM nur eine kontaktvermittelt repulsive Aktivität besitzt.

Noch ungewiss ist, was mit dem abgespaltenen N-terminalen Fragment geschieht. Antikörper, die gegen Peptide aus dieser Region erzeugt wurden, detektierten das Fragment im Western Blot lediglich in löslichen Fraktionen und nicht membran-assoziiert. Es wurde allerdings keine spezifische Färbung in Gewebeschnitten mit diesen gefunden. Eine mögliche Wechselwirkung zum Beispiel mit Integrinen aufgrund der RGD Sequenz, wie es etwa bei Laminin der Fall ist (Tashiro *et al.*, 1991), kann bisher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Ein Schutzmechanismus durch dieses Fragment während der Expression im Verlauf des sekretorischen Pathways wäre eine mögliche Funktion. Eine andere Funktion könnte auch in Bezug auf eine richtige Faltung des Proteins bestehen, um eine Missfaltung auszuschließen. Immerhin deuten viele Cystein- und Prolinreste auf eine sehr globuläre Struktur des RGM hin, so dass der Faltprozess hier möglicherweise durch die Anwesenheit des N-terminalen Fragments beeinflusst und reguliert wird. Für die Aktivierung scheint dann eine Protease nach korrekter Faltung das N-terminale Fragment abzuspalten. Die Identität der Protease konnte bisher nicht ermittelt werden. Sie scheint allerdings weitverbreitet zu sein, da die Spaltung auch bei Expression in HEK293-Zellen vorkommt, die epithelialen Ursprungs sind.

Im Rahmen einer früheren Arbeit (Deitinghoff, 2001) wurden bereits Untersuchungen zur Lokalisation möglicher RGM-bindender Moleküle im retinotectalen System durchgeführt. Diese waren für eine Identifizierung und Isolierung natürlich unerlässlich, denn ohne ein Vorkommen von potentiellen Bindungspartnern, hätte eine Suche nach diesen keinen Sinn ergeben. Mit den neu hergestellten und vor allem in ihrer Expression wesentlich verbesserten RGM-AP-Fusionsproteinen, wurden die früheren Untersuchungen nochmals überprüft und bestätigt. Demnach kommen RGM-bindende Proteine spezifisch in den faserführenden Schichten der Retina und des Tectums vor. Weiterhin wurden Signale auch in einer intermediären Schicht des Tectums beobachtet. Neue Erkenntnisse wurden vor allem in Bezug auf eine gradierte Verteilung des potentiellen Rezeptors in der Retina gewonnen. Demnach liegt auch hier ein Gradient RGM-bindender Moleküle vor, und zwar mit einem starken temporalen und schwachen nasalen Signal. Dieser Sachverhalt wird im Abschnitt 4.4.1 genauer diskutiert, um den Zusammenhang mit der Expression des potentiellen Rezeptors darzustellen.

4.3 Isolierung RGM-bindender Proteine

4.3.1 Biochemischer Ansatz

Ein erster Ansatz zur Isolierung RGM-bindender Proteine war der Versuch einer biochemischen Isolierung aus dem entsprechenden Gewebe. Hierzu wurden Gehirne von Hühnerembryonen der Stadien E8 und E10 präpariert und homogenisiert. Anschließend wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt, in deren Verlauf zuerst Zelldebris und Zellkerne (Pellet der ersten Zentrifugation bei 16.000 x g) und danach extrazelluläre Matrixproteine und lösliche zytoplasmatische Proteinen im Überstand der zweiten Zentrifugation bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge abgetrennt wurden. Das aus der zweiten Zentrifugation erhaltene Pellet bestand weitestgehend aus Membranen. Von diesen wurden mit unterschiedlichen Detergenzien wie zum Beispiel Triton X-100, Tween-20, CHAPS und Natriumdeoxycholat beziehungsweise einer Mischung verschiedener Detergenzien, dem sogenannten RIPA-Puffer, Membranextrakte hergestellt, die zuerst auf einem SDS-Gel aufgetrennt wurden und nach Transfer auf Nitrocellulosemembranen mit RGM-AP inkubiert wurden. Nach intensivem Waschen unter anderem auch mit detergenzhaltigen Lösungen (z. B. IGEPAL CA-130) zur Erhöhung der Spezifität, wurden Bandenmuster mit AP-spezifischer Substratlösung entwickelt. Je nach Konzentration und Art des Detergenz ergaben sich verschiedene Muster. Für alle Blots lässt sich festhalten, dass relativ viele Banden durch das RGM-AP detektiert wurden. Dabei führte eine Erhöhung der Detergenzkonzentration auch zu einer höheren Bandenzahl, was sich durch stärkeres Herauslösen der Proteine aus der Membran aufgrund der höheren Detergenzkonzentration erklären lässt. Nicht zu erklären ist hingegen, weshalb solch eine große Anzahl von Banden erhalten wurde, da das RGM-AP dementsprechend eine große Anzahl von Bindungspartnern haben müsste. Dem widersprechen jedoch die sehr spezifischen Bindungsmuster aus den Gewebeschnitten. Es scheint sich demnach um eine unspezifische beziehungsweise artifizielle Bindung an ein bestimmtes Epitop zu handeln, das vermutlich durch die Denaturierung der Proteine im SDS-Gel zugänglich gemacht wurde. Eine andere Erklärung wäre eine gewisse „Klebrigkeit“ des RGM-AP, wogegen jedoch wiederum die hoch spezifischen Signale der Gewebsschnitte sprechen. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde deshalb versucht zuerst RGM-AP binden zu lassen und anschließend nach Präzipitation mit RGM- beziehungsweise AP-Antikörpern und Protein G-Sepharose im Gel unterschiedliche Expressionsmuster im Vergleich zu AP alleine zu detektieren. Die Erhöhung der Spezifität sollte bei der Wahl dieser Methode vor allem dadurch erreicht werden, dass die potentiellen Bindungspartner in ihrer nativen Konformation vorliegen und dadurch eine spezifische

4. Diskussion

Bindung ermöglicht wird. Es wurden außerdem unterschiedliche Membranextrakte mit verschiedenen Detergenzien hergestellt, zum Teil nach Bindung von RGM-AP an die Membranen und zum Teil bereits vorher, um Membrananteile nicht in den folgenden Arbeitsschritten als Verunreinigungen zu haben. Wie an den Beispielgelen im Ergebnisteil gut zu erkennen ist (siehe 3.5), führte die Verwendung unterschiedlicher Detergenzien ebenfalls zu unterschiedlichen Bandenmustern. Zusätzlich ist hier festzustellen, dass es weiterhin eine große Anzahl von Proteinen gab, die allerdings sowohl mit RGM-AP als auch mit AP präzipitiert wurden. Im Gegensatz zu den Bindungsblots, wo AP alleine zu keinem Signal führte, die detektierten Banden also „RGM-AP“ spezifisch waren, wurden hier viele Banden entweder durch AP oder die eingesetzten Antikörper oder die Protein G-Sepharose gebunden und präzipitiert. Dennoch waren Unterschiede in den Bandenmustern beim Vergleich von RGM-AP und AP alleine zu beobachten. So wurden mehrfach Banden im Bereich von 80 und 90 kDa, 150 kDa, 200 kDa sowie im niedermolekularen Bereich beobachtet, die spezifisch nur bei den RGM-AP präzipitierten Proben auftraten. Die Überprüfung in Western Blots mit anti-RGM- und anti-AP-Antikörpern zeigte an diesen Stellen im Vergleich keine Signale, so dass Abbauprodukte ausgeschlossen werden konnten. Es konnte jedoch im Bindungsblot ebenfalls keine Bande bei den präzipitierten Proben beobachtet werden, vermutlich aufgrund der Denaturierung im SDS-Gel, so dass das Bindungsepitop nicht mehr vorhanden war beziehungsweise zerstört wurde. Eine Anreicherung durch Präzipitation konnte nicht erreicht werden; zudem waren die hohe Bandendichte und die geringe Menge weitere Hindernisse für eine Proteinsequenzierung. Deshalb sollte eine Anreicherung durch Crosslinking von RGM-AP an die bindenden Proteine erreicht werden. Hierzu wurden unterschiedliche Crosslinker eingesetzt, wobei anfänglich im Vergleich zur Kontrolle mit AP alleine nur gleiche Bandenmuster mit sehr großen Aggregaten erhalten wurden. Versuchsreihen mit unterschiedlichen Crosslinker Konzentrationen und Reaktionszeiten führten schließlich zu RGM-AP spezifischen Banden, die jedoch ebenfalls hochmolekularer Art waren. Derartige Cluster standen ebenfalls einer Proteinsequenzierung entgegen. Zusätzlich wurde parallel bereits über eine andere Strategie zur Rezeptorisolierung nachgedacht, so dass der biochemische Ansatz zuerst nicht weiterverfolgt wurde und nach den Ergebnissen des Screenings schließlich beendet wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beim biochemischen Ansatz spezifische Banden in verschiedenen Versuchen detektiert wurden, die von der Konzentration und Reinheit jedoch nicht den Ansprüchen einer Proteinsequenzierung genügten.

4.3.2 Molekularbiologischer Ansatz

Aufgrund des geringen Erfolgs beim biochemischen Ansatz wurde parallel bereits an einem molekularbiologischen Ansatz gearbeitet, dem Screening von Expressionsbibliotheken. Hierbei werden Boten-RNA Moleküle (mRNA) aus Geweben isoliert, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und als Pools in verschiedene Teile einer sogenannten cDNA Bibliothek aufgeteilt. Meist werden diese Bibliotheken dann mittels PCR aufgrund von Sequenzbruchstücken aus Proteinsequenzierungen oder bereits bekannten Genen nach verwandten Sequenzen beziehungsweise den vollständigen Sequenzen durchsucht. Auch eine Hybridisierung mit Sonden, sofern die Bibliothek zum Beispiel nicht gereinigt, sondern in Bakterien auf Replikplatten oder Filtern vorliegt und man direkt einzelne Klone detektieren möchte, ist möglich. Eine weitere Variante ist die Expression dieser cDNAs in Zellen (Bakterien, Hefe oder Säugerzelllinien). Dabei werden die durch die cDNAs kodierten Proteine, sofern die Bibliothek in Expressionsvektoren vorliegt, von den Zellen exprimiert. Mit einem geeigneten Bindungspartner, der detektierbar sein muss, zum Beispiel aufgrund einer AP-Substratreaktion bei AP-Fusionsproteinen (Flanagan und Leder, 1990, Cheng und Flanagan, 1994) oder durch radioaktiv markierte Proteine, RNAs, DNAs, etc., lassen sich dann entsprechend detektierte Bindungspartner isolieren. Allerdings ist diese Variante vor allem für Oberflächenproteine geeignet, da sonst die Zellen erst noch lysiert werden müssten, was häufig zu unspezifischen Signalen führen kann.

Um einen möglichst großen Bereich von Proteinen abzudecken, wurde die SMART Bibliothek (Clontech), hergestellt aus humanem fötalen Hirn mit einem Insertgrößenbereich von 0,5 bis 4kb, ausgewählt. Diese lag zwar nicht in Expressionsvektoren vor, sollte jedoch relativ einfach mit dem CRE-System umzuklonieren sein. Leider stellte sich heraus, dass dies nur für einzelne Plasmide möglich war und nicht für die gesamte Bank, so dass diese zudem noch amplifiziert und umkloniert werden musste. Die Umklonierung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. M. Hornberger durchgeführt. Eine Überprüfung zufällig ausgewählter Pools nach der Umklonierung ergab, dass der Insertgrößenbereich weiterhin vollkommen abgedeckt wurde. Zudem wurde die DNA so auf die Pools verteilt, dass durchschnittlich 5.000 Klone pro Pool vorhanden waren. Dies stellte eine sinnvolle Größe dar, um zum einen die größtmögliche Anzahl an Klonen pro Pool zu erhalten, ohne daß die Gefahr bestand, dass eine Expression nicht mehr gewährleistet wäre und zum anderen die Größe der Bank auf eine möglichst geringe Anzahl an Pools zu beschränken, damit das Screening in einem überschaubaren Rahmen ablaufen kann. Entsprechend diesen Abwägungen wurden 103 Pools mit je circa 5000 Klonen erhalten, die gesamte Bank enthielt somit ungefähr 500.000 Klone. Ob und wie

4. Diskussion

viele Inserts während der Umklonierung nicht überführt wurden, ließ sich nicht abschätzen. Da jedoch der gesamte Insertgrößenbereich noch vorhanden war, sollten die Verluste eher gering gewesen sein. Zudem sollten in der Originalbank mehrere Kopien von ein und demselben Insert vorgelegen haben.

Im Verlauf der ersten Screening-Runde wurden verschiedene Pools mit positiven Signalen erhalten, jedoch waren die Zellen zum Teil zu dicht gewachsen und hatten Aggregate gebildet, an denen auch Färbungen auftraten. Deshalb wurde erneut die gesamte Bank mit weniger dicht ausgesäten Zellen durchsucht. Zudem wurde die Inaktivierung endogener Phosphatasen auf 14h bei 67°C in Anwesenheit von Proteinen (BSA-haltiger Puffer) verlängert. Es ergaben sich wiederum Pools mit positiven Signalen, die daraufhin nach Aufteilung in Subpools erneut durchsucht wurden. Insgesamt wurden drei beziehungsweise vier Runden mit immer weiter eingegrenzten Pools durchgeführt, bis homogene Pools mit je nur einem Plasmid erhalten wurden. Die Sequenzierung und der Datenbankabgleich ergaben dann, dass es sich um ein Laborkonstrukt handelte, welches vermutlich beim Umklonieren in die Bank eingeschleust wurde. Es handelte sich somit um ein Artefakt. Weitere positive Signale waren nicht erhalten worden. Da jedoch parallel eine weitere Expressionsbank mit dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten stabilen, RGM-AP exprimierenden Zellen in einer Kooperation durchsucht und aus diesem Screen ein einzelner positiver Klon erhalten wurde, wurde auf ein erneutes Amplifizieren, Umklonieren und ein modifiziertes Screening der SMART Bibliothek verzichtet. Prof. S. Strittmatter hatte die Origene *mouse adult brain* cDNA Bibliothek durchsucht (~480.000 Klone) und als einzigen positiven Klon Neogenin (Vielmetter *et al.*, 1994, Meyerhardt *et al.*, 1997) erhalten. Insgesamt wurde somit aus circa 1.000.000 Klonen nur ein einzelner Bindungspartner erhalten. Dies deutet im Vergleich zu den Daten aus dem biochemischen Ansatz auf eine hoch spezifische Interaktion zwischen RGM und Neogenin hin. Unter anderem wird dadurch die Hypothese bestätigt, dass die Vielzahl der Banden im AP-Bindungsblot durch Denaturierungsvorgänge im SDS-Gel hervorgerufen wurde, weil somit Bindungsepitope erst zugänglich gemacht wurden. Die bekannten Expressionsdaten deuteten zudem daraufhin, dass es sich bei Neogenin tatsächlich um einen RGM-Rezeptor handelt.

4.4 Neogenin als potentieller RGM Rezeptor

4.4.1 Neogenin Expression und Vergleich mit RAP Färbungen

Die RGM-AP Färbungen von Gewebeschnitten zeigten bereits ein spezifisches Vorkommen eines Bindungspartners im retinotectalen System. Deshalb wurden aufgrund der bereits

publizierten Daten weitere Untersuchungen bezüglich der Expression von Neogenin im retinotectalen System durchgeführt. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf einem möglichen Gradienten in der Retina mit hohem temporalen und niedrigem nasalen Signal. Hierzu wurden Immunfärbungen mit anti-Neogenin-Antikörpern durchgeführt und zum Vergleich zusätzliche RGM-AP Färbungen.

Nach Vielmetter *et al.* (1994) gibt es für Neogenin im Stadium E5 eine Färbung der retinalen Ganglienzellaxone in der optischen Faserschicht (OFL), wobei temporal ein stärkeres Signal beobachtet wurde als nasal. An E8 besteht die Färbung der OFL weiterhin, allerdings beobachteten Vielmetter und Kollegen nasal ebenfalls ein starkes Signal. Dieses Phänomen wurde mit der asymmetrischen Entwicklung der Retina erklärt, wonach temporale RGC zuerst differenzieren und ihre Axone aussenden und dann die nasalen folgen. Es wurde zudem eine Färbung der inneren plexiformen Schicht (IPL), welche RGC Dendriten und Neuriten von amakrinen und bipolaren Zellen beinhaltet und sich direkt an die RGC-Schicht anschließt, beschrieben. Weiterhin wurde auch eine schwache Färbung in der äußeren plexiformen Schicht beschrieben. Hier sind Neuriten von bipolaren und horizontalen Zellen zu finden. An E12 beschreibt Vielmetter mit Kollegen eine schwache Färbung in der OFL und außerdem weiterhin Färbungen in IPL und der äußeren plexiformen Schicht (OPL), welche dann an P1 alle nicht mehr detektiert wurden. Im adulten Tier wurde nur noch eine sehr schwache Expression im Western Blot detektiert.

Die Untersuchungen der Expression von Neogenin im Rahmen dieser Arbeit und in Bezug auf die RGM-Neogenin Interaktion wurden auf die Stadien E8/ E9 und E11 beschränkt, da innerhalb dieses Zeitraumes im wesentlichen die Ausbildung der topographischen Karte stattfindet. Embryonen mit einem Entwicklungsstadium älter als E14 wurden nicht untersucht. An E8/ E9 konnte sowohl eine schwache Färbung der optischen Faserschicht, wie auch der RGC-Schicht und des IPL beobachtet werden. Allerdings wurde im Gegensatz zu den Beobachtungen von Vielmetter und Kollegen ein Gradient mit hohem temporalen und niedrigem nasalen Signal gefunden. Dieser war sowohl in der RGC-Schicht als auch im IPL vorhanden, wie die Abbildungen im Ergebnisteil zeigen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Rezeptorsynthese im Soma des Neurons stattfindet und anschließend der Rezeptor in die Axone transportiert wird. Man erkennt auch eine Färbung, und zwar ebenfalls als Gradient, in der äußeren nukleären Schicht (ONL). In dieser Schicht finden sich die Photorezeptoren. Die Ausbildung der retinalen Schichten geschieht ebenfalls in dem hier untersuchten Zeitraum zwischen E6 und E14. Es ist also nicht auszuschließen, dass Neogenin bei den Prozessen der Zellmigration und Verknüpfung anderer neuronaler Zellen innerhalb der Retina eine Rolle spielt. Vor allem das

4. Diskussion

Vorkommen eines Gradienten scheint hier von Interesse zu sein, wird somit schließlich die spezifische Verknüpfung innerhalb der Retina möglicherweise ebenfalls in Form einer topographischen Karte ermöglicht. In diesem Zusammenhang sollte auch erwähnt werden, dass die Liganden selbst ebenfalls auf den retinalen Ganglienzellaxonen vorkommen. Bei den Ephrinen wurde eine gradierte Verteilung mit hoher nasaler und niedriger temporaler Konzentration in der Retina gefunden (Hornberger *et al.*, 1999). Durch Coexpression von Liganden und Rezeptoren scheint die Sensitivität der Wachstumskegel beeinflusst zu werden. So führte die Überexpression von Ephrinen auf temporalen Axonen zu einer Aufhebung der Sensitivität gegenüber posterioren tectalen Membranen und ein Entfernen der GPI-verankerten Liganden durch Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) Behandlung von auswachsenden nasalen Axonen machte diese sensitiv gegenüber posterioren tectalen Membranen. Außerdem wurden *in vivo* bei retinaler Überexpression von Ephrin-A2 eine gestörte Zielfindung bei der Ausbildung der topographischen Karte beobachtet. Auch für RGM wurde in Immunfärbungen eine Expression auf den retinalen Ganglienzellaxonen festgestellt (A. Sierra, persönliche Mitteilung). Weitergehende Untersuchungen bezüglich einer gradierten Expression auch in der Retina und funktioneller Art stehen allerdings noch aus. Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass auch hier für RGM ähnliche Effekte gefunden werden. Darüber hinausgehend könnte ein zum Rezeptor komplementärer Gradient des Liganden zur korrekten Ausbildung der intraretinalen Verschaltungen, zum Beispiel zwischen Photorezeptoren, zwischengeschalteten Neuronen und den Signal-weiterleitenden retinalen Ganglienzellen benötigt werden. Nicht auszuschließen bleibt auch eine Interaktion zwischen Neogenin und Netrin. Eine ausführliche Beschreibung dieses Zusammenhangs erfolgt im nächsten Abschnitt. An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass Netrin an der intraretinalen Wegfindung der RGC-Axone zur optischen Fissur durch Attraktion dieser beteiligt ist. Netrin-null Mäuse zeigten Wegfindungsfehler, bei denen die Axone die Retina nicht verließen, sondern in die andere Seite der Retina einwuchsen (Deiner *et al.*, 1997). Für diese Lenkung wurde DCC als Rezeptor identifiziert, allerdings kann eine Beteiligung von Netrin und Neogenin an anderen Vorgängen in der Retina nicht ausgeschlossen werden. Ebenso könnte die Hypothese von Vielmetter *et al.* (1994) sich hier erneut bestätigen, wonach Neogenin jeweils bei der Entstehung neuer Gewebe (daher die Namensgebung) exprimiert wird. Da bekannt ist, dass der Entwicklungs- und Reifungsprozess der Retina von der Mitte zur Peripherie sowie von der Basalmembran zum Pigmentepithel hin stattfindet, ließe sich der Neogenin-Gradient im ONL auch auf diese Weise erklären.

Die RGM-AP Bindungsfärbungen weisen exakt die gleichen Signale wie die Antikörperfärbungen auf. Es wurden zum einen die gleichen Schichten gefärbt, und zum anderen konnte ebenfalls eine gradierte Verteilung mit hoher temporaler und niedriger nasaler Bindung beobachtet werden. Diese Übereinstimmung sowie die hoch spezifischen Signale deuten stark auf Neogenin als potentiellen RGM-Rezeptor hin und reduzieren die Wahrscheinlichkeit der Existenz eines weiteren RGM-Rezeptors in der Retina. Zudem stimmen die Daten mit der Gradiententheorie überein, wonach temporale Axone aufgrund ihrer hohen Rezeptordichte beziehungsweise -sensitivität von starken posterioren repulsiven Signalen zurückgewiesen werden und nasale aufgrund der niedrigen beziehungsweise nicht mehr detektierbaren Sensitivität gegenüber den repulsiven Signalen bis ins posteriore Tectum einwachsen. Analog den Daten der Ephrine-A2 und -A5 sowie des EphA3 Rezeptors (Cheng *et al.*, 1995, Drescher *et al.*, 1995, Monschau *et al.*, 1997) konnte für RGM und Neogenin dieses bestätigt werden.

Auch an E11 wurde noch eine gradierte Expression mit anti-Neogenin-Antikörpern in der Retina detektiert. Über die Signalstärke im Vergleich zu den Daten von Vielmetter *et al.* (1994) lässt sich allerdings nicht sehr viel aussagen, da Vielmetter Immunfärbungen mit Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörpern durchgeführt hat, während hier eine Signalverstärkung durch Farbstoffentwicklung mittels an den Zweitantikörper gekoppelter alkalischer Phosphatase erreicht wurde. Je nach Entwicklungsdauer der Farbreaktion wird dabei die Signalintensität variiert. Auf jeden Fall konnte der Gradient auch durch mikrodensitometrische Messungen im Labor von S. M. Strittmatter bestätigt werden, womit der Gradient während des Zeitraums der Ausbildung der topographischen Karte Bestand hat. Dies sind klare Indizien für die Beteiligung von Neogenin als Rezeptor an der Ausbildung des retinotectalen Systems.

4.4.2 Spezifität und Stärke der RGM Neogenin Interaktion

Durch die Verwandtschaft (50% Homologie) von Neogenin zu DCC (*deleted in colorectal cancer*) und der Funktion von DCC als Netrin-Rezeptor wurde immer wieder eine mögliche Funktion auch des Neogenins als Netrin-Rezeptor diskutiert (Keino-Masu *et al.*, 1996, Guan und Condic, 2003).

Vor allem die Bindung von Netrin an Neogenin schien dies zu bestätigen (Keino-Masu *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1999). Dennoch wurde bisher keine Lenkung durch Neogenin in Bezug auf Netrin nachgewiesen. Neben dem DCC existieren zudem noch andere Netrinrezeptoren, die zum Teil im Komplex mit DCC und zum Teil auch alleine, je nach Axonpopulation, funktionell aktiv sind. Diese Rezeptoren wurden zuerst in *C. elegans* gefunden und als UNC5

4. Diskussion

bezeichnet. Das DCC Homologe wurde in diesem System als UNC40 charakterisiert (Hedgecock *et al.*, 1990). Es existieren auch in Säugerorganismen Homologe zu UNC5 die im Menschen als UNC5-H1, -H2 und -H3 bezeichnet werden (Ackerman *et al.*, 1997, Leonardo *et al.*, 1997). Die Netrine und deren Rezeptoren sind detailliert in der Einleitung (1.2) beschrieben.

Um die Spezifität der RGM Neogenin Bindung zu charakterisieren, wurde zuerst die Bindung von RGM-AP an diverse andere Netrinrezeptoren untersucht. Hierzu wurden Cos7-Zellen mit Expressionskonstrukten, in denen die entsprechenden Rezeptorsequenzen codiert vorlagen, transfiziert. Entsprechend den RAP-Experimenten ließ man RGM-AP binden und die Bindung wurde durch Entwicklung mittels AP-Substratlösung detektiert. Es zeigte sich weder für DCC noch UNC5-H1 und -H3 eine Bindung des RGM-AP. Lediglich Neogenin exprimierende Zellen waren positiv. Anschließend wurde der Einfluss von Netrin auf die Neogenin RGM Bindung durch Kompetitionsstudien untersucht. Hier ergab sich ein positives Signal nach RGM-AP Bindung an Neogenin exprimierende Zellen auch in Anwesenheit eines Überschusses von Netrin (100nM). Dies deutet darauf hin, dass RGM und Netrin nicht um die gleiche Bindungsstelle des Neogenin konkurrieren oder die RGM Neogenin Interaktion stärker ist als die von Netrin und Neogenin. Bezüglich dieser Interaktion wurden Bindungsstudien mit verkürzten Neogeninkonstrukten durchgeführt, da für Netrin bekannt ist, dass dieses an die FNIII-Region des DCC bindet (Geisbrecht *et al.*, 2003). Die Expression der membrangebundenen 6x FNIII-Domäne und anschließende Bindung des RGM-AP ergab ebenfalls positive Signale, das heißt zum einen, dass die 4x Ig-Domäne für die RGM Bindung nicht benötigt wird und zum anderen, dass in Bezug auf Netrin RGM an die gleiche Domäne bindet. Da RGM jedoch an keinen der anderen Netrinrezeptoren bindet und auch nicht durch Netrin in seiner Bindung an Neogenin beeinflusst wird, sind sehr wahrscheinlich unterschiedliche Epitope für die Bindung verantwortlich. Diese sind allerdings bisher nicht identifiziert worden.

Eine Messgröße zur Bindungsstärke ist die Bestimmung der Dissoziationskonstanten k_D . Hierzu wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurde die RGM-AP Bindung an Neogenin exprimierende Zellen untersucht und nach intensivem Waschen sowie Extraktion mit Detergenz wurde über die Bestimmung der AP-Aktivität die gebundene Menge RGM-AP berechnet. Dabei ergab sich im Labor von S. Strittmatter eine k_D von 230 pM, was im Vergleich zur Netrin-Neogenin Interaktion mit einer k_D von circa 3nM (Wang *et al.*, 1999) eine um den Faktor 10 stärkere Bindung bedeutet.

Zum anderen wurde die Bindung von RGM-AP an die affinitätschromatographisch gereinigte Extrazellulärdomäne des Neogenin untersucht. Die Bestimmung der k_D mit aufgereinigter Extrazellulärdomäne des Neogenin und Bindung an ELISA-Platten mit anschließender RGM-

AP Bindung und Berechnung der gebundenen RGM-AP Konzentration über die AP-Bestimmung ergab Werte von 1nM bis 9nM (L. Deitinghoff, S. Strittmater). Diese Differenz der Werte untereinander lässt sich zum einen mit dem unterschiedlichen Umgang mit den Proben erklären sowie mit möglichen Denaturierungsprozessen während der Aufreinigung. Je nach Aufreinigungsprotokoll und Vorgehensweise unterscheidet sich die Reinheit der Proben aber auch der Grad der Denaturierung. Im Vergleich zu dem zellulären Ansatz ist auch mit der Maskierung von Bindungsstellen aufgrund der Bindung des Neogenins an die ELISA Platte zu rechnen, die die schwächere Bindung erklären. Die Untersuchung der Domänenspezifität mit verschiedenen, verkürzten und löslichen Neogenin Konstrukten wurde ebenfalls auf ELISA-Basis durchgeführt und dabei die gesamte extrazelluläre Domäne mit den einzelnen Domänen bei gleichen Konzentrationen durch Bestimmung der AP-Aktivitäten verglichen.

Es ergaben sich für die 4x Ig-Domäne keine und für die 6x FNIII-Domäne alleine lediglich eine leicht über der Kontrolle liegende Bindung. Für die gesamte Extrazellulärdomäne hingegen konnten die oben angesprochenen Bindungen bestimmt werden. Dies deutet daraufhin, dass eine Dimerisierung des Neogenin für eine RGM-AP Bindung benötigt wird. Diese wird für die *in vitro* Bindung durch die Ig-Domäne gewährleistet. Da dieses verkürzte Konstrukt mit nur Ig-Domänen jedoch keine Bindungsstelle für RGM aufweist, erfolgt auch keine Bindung an diese. An das Neogeninfragment, welches nur aus der FNIII-Domäne besteht, bindet RGM-AP nur zu einem geringen Teil, da hier vermutlich keine Dimerisierung erfolgt. Für die gesamte Extrazellulärdomäne ist wiederum eine Bindung zu erkennen, da die Dimerisierung aufgrund der vorhandenen Ig-Domäne stattfinden kann und die Bindungsstelle der FNIII-Domäne zur Verfügung steht. Eventuell ist dies auch nur eine Frage der richtigen Orientierung, da die Bindung an membrangebundene FNIII-Domänen ebenfalls stattfindet. Dies kann jedoch auch an der Überexpression und damit dem dichten Besatz der Membran und somit einer zwangsläufigen „Dimerisierung“ liegen. Andererseits liegen wie bereits in einem vorherigen Abschnitt besprochen die Signalmoleküle häufig in den sogenannten *rafts* vor, um als Signalzentren zu fungieren. Die eingelagerten Proteine sind dabei sehr dicht gepackt, so dass ein Cluster von membrangebundenen Neogeninfragmenten automatisch entstehen könnte.

Wie bereits mehrfach geschildert sind die Ephrine-A2 und -A5 sowie der EphA3-Rezeptor sowie deren Expression in komplementären Gradienten im wesentlichen an der Ausbildung der topographischen Karten beteiligt. Um einen Einfluss der Ephrine beziehungsweise mögliche Wechselwirkungen zu untersuchen, wurden Neogenin sowie der EphA3-Rezeptor expriert und anschließend die Bindung von RGM-AP beziehungsweise Ephrin-A2-, Ephrin-A5-Fc und als Kontrolle Fc alleine an diese bestimmt. Dabei ergaben sich eindeutige Signale für

4. Diskussion

die Ephrine-A2 und -A5 bei der Bindung an den EphA3 Rezeptor und für RGM-AP an Neogenin, es gab jedoch keine über den Hintergrund der Kontrollen hinausgehenden Signale für die Bindung von RGM-AP an den EphA3 Rezeptor noch der Ephrine-A2 und -A5 an Neogenin. Auch eine direkte Bindung der Ephrine an RGM konnte aufgrund früherer Untersuchungen (L. Deitinghoff, Daten nicht gezeigt) ausgeschlossen werden. Natürlich besteht dabei immer noch die Möglichkeit, dass ein zwischengelagertes Molekül, welches in diesen Ansätzen fehlte, eine solche Interaktion vermittelt. Auch die Beteiligung weiterer Eph Rezeptoren, die ebenfalls im retinotectalen System vorkommen (Monschau *et al.*, 1997) und der Einfluss der Ligandenexpression auf den retinalen Axonen (Hornberger *et al.*, 1999) darf dabei nicht ignoriert werden. Andererseits ergaben Blockierungsversuche im Streifentest für die Ephrine (Ciossek *et al.*, 1998) ebenfalls funktionelle Daten, obwohl RGM und weitere Komponenten in den Membranen vorhanden waren. Diese Untersuchungen zur Wechselwirkung dienten somit vor allem dazu, eine direkte Bindung an Ephrine oder Eph Rezeptoren auszuschließen und so die Untersuchungen im Streifentest auf die RGM Neogenin Interaktion zurückführen zu können.

4.4.3 Untersuchungen zur funktionellen Aktivität von Neogenin

Der Streifentest wurde angewandt, um eine funktionelle Aktivität des Neogenin zu untersuchen. Hierzu wurden nach Walter *et al.* (1987, a und b) alternierende Streifen von tectalen posterioren und anterioren Membranen auf Nucleoporefilter gesaugt. Anschließend wurden Retinaexplantate mit sowohl nasalen als auch temporalen Anteilen in einem Streifen auf diesen sogenannten Teppichen wachsen gelassen. In der Kontrolle zeigten die temporalen Axone eine eindeutige Präferenz für die anterioren Membranstreifen aufgrund der repulsiven Aktivität der posterioren Membranen (Walter *et al.*, 1987, a und b).

Nasale Axone wuchsen entsprechend unbeeinflusst kreuz und quer über die Streifen hinweg. Bei Zugabe unterschiedlicher Mengen der Neogenin Extrazellulärdomäne wurde die Entscheidung der temporalen Axone mit steigender Konzentration immer weiter aufgehoben. Die Blindauswertung mit Benotung der Entscheidung nach der Methode von Walter *et al.*, 1987b, sowie Ciossek *et al.*, 1998 und anschließende Auftragung der Werte gegen die Konzentration führte zu dem gezeigten Graphen, aus dem ein vollständige Aufhebung der Entscheidung bei 400nM hervorgeht.

Dies entspricht den Beobachtungen die bei analogen Experimenten (Ciossek *et al.*, 1998) mit den Ephrinen durchgeführt wurden. Lediglich die benötigte Konzentration ist für das Neoge-

nin-RGM System höher, was sich zum einen dadurch erklären lässt, dass die Extrazellulärdomäne wie oben gezeigt eine verminderte Bindung aufweist. Zum anderen ist ein gewisses Clustering der Signalmoleküle notwendig, da die Effekte der Ephrine ebenfalls aufgehoben werden müssen. Die Bedeutung der *rafts* diesbezüglich wurde bereits an anderer Stelle (4.2) besprochen. Die GPI-verankerten Lenkungsmoleküle liegen demnach in den speziellen Mikrodomänen der Membran vor, wo die Moleküle dicht gepackt und somit lokal stark konzentriert vorkommen. Durch sterische Hinderung nach Bindung der Rezeptorkomponenten werden dann wahrscheinlich die anderen Signalwege ebenfalls ausgeschaltet. Dies erklärt auch die unterschiedlichen Konzentrationen bei den Experimenten von Ciossek und Kollegen (1998), bei denen die Rezeptorkomponente in höheren Konzentrationen eingesetzt werden musste als zum Beispiel die Ligandkomponente, die im Fall der Ephrine ebenfalls zu einer Entscheidungsaufhebung führte. Während die Liganden durch Bindung an den Rezeptor eine Blockierung der Entscheidung bewirkten, musste bei der Bindung der Rezeptorkomponente entsprechend mehr von dieser eingesetzt werden, um andere Signale ebenfalls auszuschalten. Es scheint bei der Signalverarbeitung somit die Bindung eines Moleküls an den Rezeptor auszureichen, um die entsprechende Signaltransduktion ein- oder auszuschalten. Dies würde gleichzeitig bedeuten, dass die intrazelluläre Signalverarbeitung auch dieselben Wege für unterschiedliche Signalmoleküle verwendet. Diese Verwendung gemeinsamer intrazellulärer Signalwege steht seit langem im Fokus der Untersuchungen und wurde bereits vielfach bestätigt, vor allem in Bezug auf die kleinen GTPasen der Rho-Familie (Ridley und Hall, 1992, Hall, 1998, Wahl *et al.*, 2000, Yuan *et al.*, 2003). Bei diesen handelt es sich um zentrale Schalt- und Verknüpfungspunkte, die vor allem beim Umbau des Zytoskeletts als Antwort auf attraktive oder repulsive Lenkungsmoleküle die von außen kommenden Signale integrieren und eine Antwort auf die Signale induzieren. So reguliert Rho die Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionsstellen in Fibroblasten, während Rac1 die Bildung von Lamellipodien und Cdc42 die Bildung von Filopodien reguliert (Nobes und Hall, 1995). Durch Expression von dominant-negativen Formen von Rac1 und Cdc42 wurden wesentliche Defekte in der Axonlenkung und Zellmigration in verschiedenen Systemen, etwa *Drosophila* und Maus induziert. Dementsprechend scheinen Rac1 und Cdc42 unter dem Einfluss von attraktiven Lenkungsmolekülen zu stehen, da die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien für den Wachstumskegel des wachsenden Axons charakteristisch ist. Die RhoA-Aktivierung steht nach dieser Theorie unter dem Einfluss von repulsiven Lenkungsmolekülen, da der Rückzug von Lamellipodien und Filopodien charakteristisch für den Kollaps des Wachstumskegels ist (Hall, 1998, Mueller, 1999). Allerdings entspricht eine isolierte Betrachtung einzelner Mole-

4. Diskussion

küle nicht den Gegebenheiten in der Zelle, da sich die Signalwege immer auch gegenseitig durch komplementäre Repression oder Aktivierung des jeweiligen anderen Signalwegs beeinflussen.

Dass die Inaktivierung eines einzelnen extrazellulären Signals nicht ausreicht, um die Entscheidung des Axons aufzuheben, lässt sich ebenfalls durch die Verwendung gemeinsamer Signalwege erklären. Wenn mehrere Signale vorhanden sind und von den Rezeptoren integriert werden, so bestehen bei Neutralisierung eines einzelnen Signals die anderen weiterhin. Erst durch die sterische Hinderung der anderen Signale und damit deren Blockierung bei höheren Konzentrationen gebundener Blockierungskomponente (in diesem Fall Neogenin-Ecto) wird dementsprechend eine Aufhebung der Entscheidung erreicht.

Es handelt sich hier wahrscheinlich um unabhängig voneinander aktive Systeme, die aufgrund der Ergebnisse aus den Ephrin *Knockout* Studien und den RGM *in vitro* Untersuchungen parallel bei der Ausbildung der retinotectalen Projektion beteiligt sind. Trotz der vermeintlichen Unabhängigkeit ergänzen sich die Systeme natürlich bei der Ausbildung der topographischen Karten. Die Ephrin *Knockout* Mäuse zeigten zwar eine teilweise gestörte Projektion und Verlagerung, aber dennoch war eindeutig die Beteiligung weiterer Moleküle zu erkennen, da es zu keiner vollständigen Fehlbildung kam. In diesen *Knockout* Mäusen waren viele Populationen retinaler Axone immer noch in der Lage, ihre jeweiligen Zielpositionen im Tectum zu erkennen.

Die Isolierung dieses neuen Ligand Rezeptor Systems trägt somit wesentlich zum Verständnis der Ausbildung topographischer Karten bei und fügt dem immer noch unvollständigen Gesamtbild ein weiteres Teilstück hinzu. Die Entdeckung, Isolierung und Charakterisierung von RGM und seinem potentiellen Rezeptor Neogenin werfen natürlich weitere Fragen auf und geben zugleich Anstoß für neue Ansätze zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

4.5 Zusammenfassung

Das parallele Wachstum einer Vielzahl von Geweben und Organen während der Embryonalentwicklung stellt eine große Herausforderung an eine exakte Ordnung und Koordination der stattfindenden Vorgänge dar. Neben zahlreichen anderen Systemen, die für den Körper unabdingbar sind, ist die korrekte Verschaltung des Nervensystems dabei essentiell. Diese Verschaltung von Ursprungs- und Zielgebiet durch die Axone erfolgt mittels vorgegebener Pläne, den sogenannten topographischen Karten. Für die Ausbildung dieser Karten bedient sich der Körper der Lenkungsmoleküle, Signalen die dafür sorgen, dass die Nervenfasern den richtigen Weg finden und im Zielgebiet auch zur jeweiligen Zielzelle geführt werden. Um ein Verständnis für die molekularen Mechanismen bei der Ausbildung der Karten mit Hilfe der Lenkungsmoleküle zu bekommen, wurde die retinotectale Projektion des Hühnerembryos als Modellsystem untersucht. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Moleküle und Mechanismen, die auch in anderen Systemen Gültigkeit besitzen, anhand dieser Projektion entdeckt. Dennoch war und ist das Gesamtbild noch unvollständig. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse tragen sehr viel zur Ergänzung des Gesamtbildes und zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Axonlenkung bei. Die Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Ligand-Rezeptor-Systems der retinotectalen Projektion stand dabei im Mittelpunkt der Arbeit.

So wurde erstens ein wesentlicher Beitrag zu genaueren Charakterisierung von RGM (dem 1990 biochemisch isolierten (Stahl *et al.*) und 1999 von PD Dr. B. K. Müller und Kollegen klonierten *repulsive guidance molecule*) geleistet. Nicht nur die Untersuchung der zeitlichen Expressionsmuster sowohl im retinotectalen System wie auch der entorhinalen Projektion im Hippocampus bestätigten eine mögliche Beteiligung von RGM bei der Ausbildung beider topographischer Karten während der Embryonalentwicklung. Auch die Expressionsmuster im Gewebe des Hühnerembryos zusammen mit den *in vitro* Daten konnten sowohl bezüglich der RNA- wie auch der Expression auf Proteinebene eine Beteiligung von RGM an der Ausbildung der retinotectalen Projektion bestätigen. Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit sind in die Publikation Monnier *et al.*, 2002 eingeflossen.

Weiterhin wurden geeignete Werkzeuge für die Isolierung von RGM-bindenden Proteinen in Form von RGM-AP-Fusionsproteinen entwickelt, die anschließend hergestellt, charakterisiert und erfolgreich eingesetzt wurden. Auch die Charakterisierung des RGM-AP führte zur Klärung eines wichtigen Teilaspekts bei der Charakterisierung des RGM. So konnte mit Hilfe dieses Konstrukts und seiner identischen Eigenschaften mit dem nativen RGM eine posttranslationale Spaltung gezeigt werden. Zudem wurde mit Hilfe des Fusionsproteins nicht nur ein

4. Diskussion

Bindungspartner für RGM gefunden, sondern auch die weitere Charakterisierung der Bindungsspezifität durchgeführt.

Schließlich gelang in einer Kooperation mit Prof. Dr. S. M. Strittmatter die Isolierung eines RGM-bindenden Moleküls in Form des Neogenin, von welchem aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen wissenschaftlichen Ergebnisse und der sich daraus ableitenden Spezifität, Aktivität und seiner Charakteristika mit höchster Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, dass es als RGM Rezeptor fungiert.

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse konnte ein neues Ligand-Rezeptor-System neben der Ephrin-Eph-Rezeptorfamilie als neue Familie von Axonlenkungsmolekülen, die wahrscheinlich maßgeblich an der Ausbildung des retinotectalen Systems im Huhn beteiligt ist, auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Dies bildet die Grundlage für weitreichende und über die Entwicklungsbiologie hinausgehende Forschungsaktivitäten, da neueste Ergebnisse darauf hinweisen, dass RGM zum einen an der Entwicklung anderer topographischer Karten und in anderen Spezies beteiligt ist, sowie zum anderen aber auch im adulten Tier nach Läsionen des ZNS erneut exprimiert wird und vermutlich als ein die Regeneration inhibierendes Molekül aktiv ist. Die Ergebnisse bezüglich der Rezeptoridentifizierung und -charakterisierung flossen in die Publikation Rajagopalan, Deitinghoff *et al.* ein, die derzeit für die Veröffentlichung vorbereitet wird.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Substanz	Abkürzung	Firma
Aceton, p.A.		Roth, Karlsruhe
Acrylamid/ Bisacrylamid Rotiphorese Gel 29:1		Roth, Karlsruhe
Agar, Select		Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose		Pharmacia, Freiburg
Albumin, bovine serum, Fraktion V	BSA	Sigma, Taufkirchen
Alexa Fluor 488 Phalloidin		Molecular Probes, über MoBiTec, Göttingen
Ammoniumacetat		Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Amp	Roth, Karlsruhe
Aprotinin		Sigma, Taufkirchen
Blockierungsreagen		Roche, Mannheim
Bradford Färbelösung Roti-Nanoquant	Bradford	Roth, Karlsruhe
Brillant Blue R 250	Comassie	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	BCIP	Roche, Mannheim
Bromphenolblau, Indikator pH 3,0-4,6		Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat	CaCl ₂ •2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	CHCl ₃	Sigma, Taufkirchen
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat	CHAPS	Biomol, Hamburg
Comassie Brillant Blue R 250		Merck, Darmstadt
complete, Protease Inhibitoren	complete	Roche, Mannheim
Concanavalin A	ConA	Sigma, Taufkirchen
CSPD-Lösung		Roche, Mannheim
4',6-Diamidino-2-Phenylindol	DAPI	Roth, Karlsruhe
Diethanolamin		Sigma, Taufkirchen
Diethylamin		Sigma, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Sigma, Taufkirchen
Dimethyl-adipimidate•2HCl	DMA	Pierce, Rockford, IL
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma, Taufkirchen
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Disuccinimidyl suberate	DSS	Pierce, Rockford, IL
Dithiothreitol	DTT	Sigma, Taufkirchen
Eisessig		Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid		Aldrich
Ethanol, p.A.	EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethanol, vergällt, 70%ige Lsg.	EtOH	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid, 10%ige Lsg.		Sigma, Taufkirchen

5. Material und Methoden

1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide	EDC	Pierce, Rockford, IL
Ethylendiamintetraessigsäure (Titriplex II)	EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, Di-Natriumsalz-Dihydrat (Titriplex III)	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400		Sigma, Taufkirchen
Fluorescein-Isothiocyanat		Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd, 37%		Merck, Darmstadt
Formamid		Merck, Darmstadt
D(+)-Glucose		Merck, Darmstadt
Glutamin		GibcoBRL, Karlsruhe
Glutardialdehyd		Merck, Darmstadt
Glycerin		Roth, Karlsruhe
Glycin	Gly, G	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt		Roth, Karlsruhe
HIS-Select HC Nickel Affinity Gel		Sigma, Taufkirchen
IGEPAL CA-630		Sigma, Taufkirchen
Imidazol		Merck, Darmstadt
Immu-Mount		SHANDON
Kanamycin		Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)-chlorid Dihydrat	CuCl ₂ •2H ₂ O	Merck, Darmstadt
Levamisol		Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Gln, Q	PAA, Linz
L-Homoarginin		Sigma, Taufkirchen
Lithiumchlorid	LiCl	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver		Lasana
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ •6H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure		Sigma, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol		Sigma, Taufkirchen
Methanol	MeOH	Roth, Karlsruhe
Methylcellulose	MZ	Sigma, Taufkirchen
2-Morpholinoethansulfonsäure	MES	Sigma, Taufkirchen
3-Morpholino-1-propansulfonsäure	MOPS	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Roth, Karlsruhe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	HEPES	GibcoBRL, Karlsruhe
Natriumacetat-Trihydrat	NaAc•3H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
Natriumazid	NaN ₃	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH ₂ PO ₄ •1H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat		Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat/ Natriumlaurylsulfat	SDS	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O	Merck, Darmstadt
Nickel(II)-sulfat Hexahydrat	NiSO ₄ •6 H ₂ O	Sigma, Taufkirchen
Ni-NTA-Agarose		QIAGEN, Hilden

5. Material und Methoden

4-Nitro-blue-tetrazolium-chloride	NBT	Roche, Mannheim
n-Propylgallate		Sigma, Taufkirchen
Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP		NEB, frankfurt
Paraformaldehyd	PFA	Merck, Darmstadt
Pepstatin A		Sigma, Taufkirchen
Peptone 140, Select		Gibco BRL, Karlsruhe
1, 10-Phenanthrolin-Monohydrat		Roth, Karlsruhe
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)		Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF	Sigma, Taufkirchen
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)	PIPES	Sigma, Taufkirchen
p-Nitrophenylphosphat	PNPP	Sigma, Taufkirchen
Polyvinylpyrrolidon	PVP	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S		Merck, Darmstadt
Primer		Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol, Isopropanol	Isoprop	Roth, Karlsruhe
Roti-Nanoquant		Roth, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose/ Sucrose		Merck, Darmstadt
Salmon testes DNA		Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	HCl	Roth, Karlsruhe
Spermidin		Sigma, Taufkirchen
Succinic acid		Sigma, Taufkirchen
Tissue-Tek		Sakura
Trichloressigsäure	TCA	Roth, Karlsruhe
Triethanolaminhydrochlorid		Sigma, Taufkirchen
tri-Natriumcitrat-Dihydrat		Roth, Karlsruhe
α, α, α -Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100		Roth, Karlsruhe
tRNA		Sigma, Taufkirchen
Trypton/Pepton aus Casein		Roth, Karlsruhe
Tween 20		Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid, 30%	H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt

5.1.2 Zellkulturreagenzien:

Dulbecco's modified Eagle Medium	DMEM	PAA, Linz
F12 Medium		PAA, Linz
Fötale Kälber Serum	FCS	PAA, Linz
Hank's balanced salt solution	Hank's	PAA, Linz
Hühnerserum	CS	PAA, Linz
Phosphate buffered saline	PBS	PAA, Linz
Glutaminlösung	GLU	PAA, Linz
Penicillin/ Streptomycin-Lösung	Pen/Strep	PAA, Linz
poly-L-Lysin		PAA, Linz
Laminin		Becton-Dickinson
Trypsin		PAA, Linz
Zeocin		Invitrogen, Karlsruhe

5. Material und Methoden

5.1.3 Kits

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I	peqlab, Erlangen
HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Silver Stain Plus Kit	Biorad, München
ThermoScript™ RT-PCR System	Life Technologies, Karlsruhe

5.1.4 Enzyme

<i>Pfx</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	NEB, Frankfurt
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt

5.1.5 Antikörper

5.1.5.1 Primärantikörper

Kaninchen-anti RGM R1	Peptidantikörper gegen RGM	MPI für Entwicklungsbiologie
Kaninchen-anti RGM C1	Peptidantikörper gegen RGM	Migragen, Tübingen
Kaninchen-anti RGM E1	Peptidantikörper gegen RGM	Migragen, Tübingen
Kaninchen-anti RGM F1	Peptidantikörper gegen RGM	Migragen, Tübingen
Maus-anti-AP IgG ₁		Seradyn, Indianapolis, IN
Maus-anti-HIS		QIAGEN, Hilden
Ziege-anti-Neogenin (C-20)	Peptidantikörper	Santa Cruz Biotechnology

5.1.5.2 Sekundärantikörper

Ziege-anti-Kaninchen IgG	AP konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG	Cy3-konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	AP konjugiert	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Cy3 konjugiert	Dianova, Hamburg

5.1.6 Plasmide, Vektoren und Bibliotheken

APtag-2		Cheng <i>et al.</i> , 1995
pSecTag2-B		Invitrogen, Karlsruhe
chRGM	volle Länge in pGEM-T Vektor; SP6-Polymerase: <i>antisense</i> , T7-Polymerase: <i>sense</i>	P. Macchi, MPI f. Entwicklungsbiologie, Tübingen
rRGM-A	EST-Klon UI-R-CA1-bbt-h-11-0-UI in pGEM-T Vektor; T7-Polymerase: <i>antisense</i> , SP6-Polymerase: <i>sense</i>	P. Monnier, Migragen, Tübingen
SMART	Human fetal brain	Clontech

5.1.7 Oligonukleotide (Primer)

vg bgl 2	GAAGATCTGCTGGATGGATGGGTATGG
VG-Rev2	GAAGATCTCAGCTTTTCCCTGCACTTGG
rgm-bglII-r-404	GAAGATCTCGGGGCTAGGGCCCGTGT
rgm-hindIII-f31	ACGAAGCTTCCATGCAAGATCCTCAAG
ap-ecori-r3685	GGAATTCCACCCGGGTGCGCGGCGTC
neo-kpni-f1	CGGGGTACCCGGAGCGGCCCCCGGAGC
neo-kpni-f400	CGGGGTACCATCCCAACATTACCTCCCCTT
neo-ecorv-r400	AGCGATATCCCGATGGCAACATCGAGGTCAAG
neo-ecorv-r1087	AGCGATATCCCGCTATCCAAGGGAGAAGTCGG
neo-ecorv-r1115	AGCGATATCCCACGACGAGTGCAGAAAACGGC
neo-ecorv-r1443	AGCGATATCCCTGCTGTAGTGATGGCATTAAAGGT

5.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Agarosegelkammer	Selbstbau, Werkstatt MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen
Apothekerwaage AG 204DR	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Schweiz
Apothekerwaage RG5002-S-DR	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Schweiz
Chromatography Paper, 3MM	VWR, Bruchsal
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Stuttgart
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Überlingen
Dounce-Homogenisator	über Multimed, Kirchheim/Teck
Einmal-Filterhalter, Rotrand	Schleicher & Schuell, Dassel
ELISA-Reader	SLT Labinstruments, Crailsheim
Entwicklermaschine	Kodak, Stuttgart
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Göttingen
Gefriermikrotom 2800 Frigocut E	Reichert-Jung, Wetzlar
Geldokumentationsanlage Imagemaster VDS	Amersham Biosciences, Freiburg
-80°C- Schrank HFU 586 Basic	Heraeus, Stuttgart
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge RC-5B Plus	Sorvall, Du Pont, Hamburg
Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0ml)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiovert 25 CFL	Zeiss, Göttingen
Mikroskopie-Farbkamera AxioCam	Zeiss, Göttingen
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München
Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München
Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckmann-Coulter, München
PAP PEN	SCI Science Services, München
pH Meter MP 225	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Pipetus akku	Eppendorf, Hamburg

Hybridisierungslösung:	5x SSC 5x Denhardt's 0,5% SDS in 50% Formamid denaturierte Sonde (30-50 ng/ml) in Prähybridisierungslösung
10x MOPS:	4,18 g MOPS, gelöst in 80ml H ₂ O 50mM Natriumacetat, pH 5,2 10mM EDTA, pH8 mit NaOH auf pH 7 einstellen ad 100ml H ₂ O
20x SSC:	3M Natriumchlorid 0,3M Natriumcitrat auf pH 7 einstellen
100x Denhardt's:	2% Ficoll 400 2% PVP 2% BSA
Standardpuffer:	0,1 M Maleinsäure 0,15M NaCl pH7,5 mit NaOH einstellen
Waschpuffer:	0,3% Tween-20 in Standardpuffer
Blockierungslösung:	1% Blockierungsreagenz (Roche) in Standardpuffer
Antikörperlösung:	1: 12.500 anti-Dig-Antikörper-AP-Konjugat in Blockierungslösung
Reaktionspuffer:	0,1M Tris 0,1M NaCl pH 9,5

In situ Hybridisierung

Grundsätze zu RNase freien Lösungen s.o.

Fixierungslösung:	4% Paraformaldehyd (PFA) PBS, durch Erhitzen lösen pH 7 nach Abkühlung einstellen
Acetylierungslösung:	6,19g Triethanolaminhydrochlorid 0,025 N NaOH (0,75 ml 10N) 295 ml H ₂ O kurz vor Inkubation 0,75ml Essigsäureanhydrid zugeben
PB (0,2M):	0,15M Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O 0,05M NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O
PBS:	0,15M NaCl 0,1M PB
Hybridisierungslösung:	50% Formamid 5x SSC (s.o.) 5x Denhardt's (s.o.) 0,25 mg/ml tRNA (E.coli) 0,5 mg/ml Salmon testes DNA
B1:	0,1M Tris, pH 7,5 0,15M NaCl
B2:	1% inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS) in B1

5. Material und Methoden

B3:	0,1M Tris, pH9,5 0,1M NaCl 50mM MgCl ₂
B4:	4,5µl/ml NBT (50 mg/ml) 3,5µl BCIP (50mg/ml) 0,24mg/ml Levamisol in B3
TE:	10mM Tris, pH 8 1mM EDTA

PCR

Primer:	100 mM Stocklösungen 20 mM Arbeitslösungen
dNTP-Mix:	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP

Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Agarosegel:	1x TAE-Puffer 1% Agarose 0,4 µg/ml Ethidiumbromid
50x TAE-Puffer (Stocklösung):	2M Tris-(hydroxymethyl)-methylamin (TRIS) 57,1 ml/l Eisessig 0,05 M EDTA (pH 8,0)

Transformation

SOC-Medium:	2% Tryptone 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
LB-(Luria Bertani) Medium:	1% Bakterien Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl ⇒ mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen, pH 7,0 einstellen (NaOH) und autoklavieren
Agar-Platten:	% Agar-Agar in LB-Medium + Antibiotikum

Transfektion und Genexpression

Medium für Cos7-Zellen:	10% Serum 1x Glutaminlösung 1x Penicillin/ Streptomycin-Lösung in DMEM
Medium für HEK293-Zellen:	10% Serum 1x Glutaminlösung

1x Penicillin/ Streptomycin-Lösung
DMEM

Zellulärer Bindungstest/ Screening cDNA Bank

HBHA: 0,5 mg/ml BSA
20mM HEPES, pH 7,0
Hank's

AP-Puffer: 10mM L-Homoarginin
0,1M Tris, pH 9,6
0,1M NaCl
5mM MgCl₂

AP-Substratlösung: 35µl/ 10ml BCIP (Roche)
45µl/ 10ml NBT (Roche)
AP-Puffer

Stopplösung: 50mM Na-Acetat
50mM EDTA, pH 5,0

AP-Test

2x AP-Substratlösung: 2M Diethanolamin
2mM MgCl₂
3,15 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (PNPP)
pH 9,15

Affinitätschromatographie

Elutionspuffer: 0,2M Imidazol
PBS

Bradford-Assay

Arbeitslösung: 20% Roti-Nanoquant (5x)
80% Wasser

Biochemischer Bindungstest

Blockierungslösung: 1% BSA
PBS

2x AP-Substratlösung: s.o.

Gewebeisolierung

Homogenisierungspuffer: 5mM Tris-HCl, pH 7,4
0,1M EDTA, 1x complete Protease Inhibitoren

Membranextrakte

Deoxycholat: 0,5-2% Natriumdeoxycholat
PBS

SDS: 0,1-1% SDS
PBS

Triton X-100: 0,5-2% Triton X-100
PBS

RIPA: 150mM NaCl
1% IGEPAL CA-630

5. Material und Methoden

50mM Tris, pH 8,0
 1mM PMSF
 0,5% Natriumdeoxycholat
 0,1% SDS

Crosslinking

DMA

Reaktionspuffer: 0,2M Triethanolamin, pH 8.0

Stopplösung: Eissessig

DSS

Konjugationspuffer: 20mM Natriumphosphat, pH 7,5
 0,15M NaCl

Quencherpuffer: 1M Tris•HCl, pH 7,5

EDC

Konjugationspuffer: 0,1M MES (2-[N-morpholino]ethansulfonsäure), pH 4,5-5

Cu-Phenanthrolin

Reaktionspuffer: 50mM Natriumphosphat, pH 7,3
 10% Glycerol

Crosslinkerlösung: 15mM CuCl₂
 45mM 1,10- Phenanthrolin
 in Reaktionspuffer

SDS-PAGE

Elektrophorese-Puffer (10x): 250 mM TRIS
 1,9 M Glycin

Arbeitslösung: 1x Puffer
 0,1% SDS

Gelzusammensetzung:

	Trenngel				Sammelgel
	5%	8%	10%	12%	5%
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	1,67 ml	2,67 ml	3,33 ml	4,0 ml	900 µl
1 M Tris-HCl, pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml	X
1M Tris-HCl, pH 6,8	X	X	X	X	650 µl
10% Natrium Dodecylsulfat (SDS)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	30 µl
Wasser	4,43 ml	2,43 ml	1,77ml	1,1 ml	3,4 ml
10% Ammonium Persulfat (APS)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	30 µl
Temed	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Comassie-Färbung

Färbelösung: 40% Methanol
 10% Eissessig
 50% Wasser
 1g/l Comassie Brillant Blue R

Entfärbelösung: 10% Eissessig
 90% Wasser

Silberfärbung

Fixierlösung: 50% Methanol

Färbelösung:	10% Eisessig 10% <i>Fixative Enhancer Concentrate</i> 30% Wasser 5% <i>Silver Complex Solution</i> 5% <i>Reduction Moderator Solution</i> 5% <i>Image Development Solution</i> 35% H ₂ O 50% <i>Development Accelerator Solution</i>
Stopplösung:	5% Essigsäure 95% H ₂ O

Western-Blot

10x Blotpuffer:	0,2 M TRIS 1,5 M Glycin 0,002% SDS
Blockierungslösung:	5% Milchpulver in PBS
Waschpuffer:	0,1 % Tween-20 in PBS
Antikörperlösung:	1% BSA Antikörper in Waschpuffer
AP-Färbelösung:	s. o.

Ponceau-Färbung

Ponceau-S-Lösung:	0,2% (w/v) Ponceau S 3% TCA (w/v)
-------------------	--------------------------------------

AP-Blot und Dot-Blot-AP-Färbung

Waschpuffer:	0,1% Triton X-100 PBS
AP-Puffer:	0,1 M TRIS (pH 9,6) 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂
AP-Färbelösung:	3,3 µl/ml BCIP 6,6 µl/ml NBT in AP-Puffer

Gewebeschnitte

Fixierlösung:	4% Paraformaldehyd PBS
Saccharoselösung:	30% Saccharose PBS

Immunfärbungen

Blockierlösung:	1% BSA in PBS
Antikörper- und Waschlösung:	0,1% BSA in PBS
DAPI-Lösung:	20 µl in 10 ml PBS

5. Material und Methoden

RAP *in situ*

Wasch- und Blockierungslösung: 20 mM HEPES (pH 7,0)
0,5 mg/ml BSA
in Hank's

AP-Puffer und Substratlösung: s.o.

Streifentest

Homogenisierungspuffer: 10mM Tris, pH 7,4
1,5mM CaCl₂
1mM Spermidin•3HCl
1x complete Protease Inhibitoren

Saccharoselösungen: 5% und 50 % Saccharose
in Homogenisierungspuffer

SDS-Lösung: 2% SDS
H₂O

Lamininlösung: 20µl Laminin
980µl Hank's

Agaroseplatten: 1% Agarose
PBS

ConA-Beschichtungslösung: 0,1mg/ml Concanavalin A
in Hank's

F12 Medium MZ: 1% Methylcellulose
1x F12
10% FCS
0,5% Hühnerserum (CS)
2mM L-Glutamin
1x Penicillin/ Streptomycin-Lösung

Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd
PBS

Permeabilisierungslösung: 0,1% Triton X-100
PBS

Färbelösung: 1% BSA
1:50 Alexa Phalloidinlösung
PBS

5.2 Methoden

5.2.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren aus Gewebe

Für die Isolierung von Ribonukleinsäure (englisch RNA) aus Geweben wurde das RNeasy Mini Kit von QIAGEN verwendet. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde das Gewebe in Lysepuffer mit 21-G Nadel und Spritze homogenisiert und nach Zugabe von Ethanol, zur Verstärkung der RNA-Bindung an die RNeasy Membran, wurde die RNA im Zentrifugations-sälchen binden gelassen. Im Anschluss an mehrfaches Waschen mit RW1 und RPE Puffer, wurde die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert und nach Abnahme eines Aliquots für die Konzentrationsbestimmung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert, um eine Degradation möglichst auszuschließen. Alle Schritte wurden ebenfalls aus dem zuletzt genannten Grund in schneller zeitlicher Abfolge und unter RNase freien Bedingungen durchgeführt.

5.2.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte jeweils UV-spektrometrisch durch die Messung der Absorption von verdünnten (in der Regel 1:50 in RNase freiem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) RNA-Lösungen bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine Absorption von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einer RNA Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Entsprechend dieser Beziehung können die Konzentrationen der isolierten RNA berechnet werden. Außerdem wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und durch Division der gemessenen Werte von $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ das Verhältnis bestimmt. Dieses Verhältnis gibt eine Aussage über die Reinheit der gemessenen Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

5.2.3 Herstellung von Sonden

Die codierenden Regionen für chRGM und rRGM-A lagen bereits in entsprechenden Vektoren vor (hergestellt von P. Macchi, und P. Monnier). Nach Linearisierung der Vektoren durch spezifischen Restriktionsverdau, wurde die DNA Phenol-Chloroform extrahiert, mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen Na-Acetat, pH 5,2 für 30 min bei -80°C gefällt und nach Waschen mit 70%igem Ethanol in Wasser aufgenommen. Zur in vitro Transkription wurden je nach den in den Vektoren vorliegenden Sequenzen RNA Polymerase Kits von Roche mit T3, T7 oder SP6 RNA Polymerase verwendet. Die so hergestellten Sonden besitzen eine sogenannten Dig-Markierung, das heißt UTP des Reaktionsmixes ist mit Digoxigenin konjugiert und wird als solches in die Nukleotidkette eingebaut. Dies ermöglicht eine Detektion dieser Sonden mittels spezifischer anti-Digoxigenin Antikörper.

Für die Synthese wurden 1 μg der linearisierten DNA mit 2 μl 10x Dig-RNA Markierungsmix, 2 μl Transkriptionspuffer, 1 μl RNasin (40U/ μ) , 2 μl RNA Polymerase und dem zu 20 μl fehlenden Anteil RNase freiem Wasser zusammen pipettiert und für 2h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 2 μl 0,2 M EDTA, pH8 gestoppt und die Nukleotidfragmente mittels Ethanol/ LiCl (4M) für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in RNase freiem Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der erfolgreichen Synthese wurde 1 μl Sonde in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Die restliche Sonde wird zur weiteren Verwendung in Northern Blots oder in situ Hybridisierungen bei -80°C gelagert.

5.2.4 Northern Blot

Für die Northern Blot Analyse wurde die aus Hühnertecten und Ratten Hippocampus isolierte RNA nach ihrer Größe in einem 1%-igen, denaturierenden Agarosegel (2,5 $\mu\text{g}/\text{Spur}$) aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran (Hybond N) geblottet. Die Blots wurden mit DIG-

5. Material und Methoden

markierten antisense Sonden von RGM (jeweils aus Huhn beziehungsweise Ratte) über Nacht bei 60°C in Hybridisierungspuffer hybridisiert. Die Stringenz beim Waschen betrug 0,1% SSC, 0,1 % SDS bei 60°C. Nach Blockierung in Blockierungslösung (1% Blockierungsreagenz in Standardpuffer), wurden die Blots mit anti-DIG Antikörper-AP-Konjugat inkubiert, gewaschen, konditioniert und mit CSPD-Lösung inkubiert. Nach Aktivierung für 10 min bei 37°C, wurden Filme mit den Blots exponiert und entwickelt. Als Kontrollen wurden sense Sonden des jeweiligen RGM (für die Spezifität) sowie antisense Sonden des β -Actin (für die gleichmäßige Konzentration in allen Spuren) verwendet.

5.2.5 In situ Hybridisierung

Zur Bestimmung der Gewebeexpression von RGM wurden in situ Hybridisierungen an Gewebsschnitten von Hühnertecten beziehungsweise ganzen Köpfen durchgeführt. Die gesamte Prozedur wurde unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden jeweils direkt vorher von frisch eingefrorenem Gewebe angefertigt und nach 20-minütiger Trocknung bei RT für 10 min mit 4% PFA/ PBS fixiert, dreimal mit PBS gewaschen, für 10 min acetyliert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in eine feuchte Hybridisierungsbox überführt, mit Hybridisierungspuffer für 2 h bei RT prähybridisiert und dann über Nacht mit Hybridisierungspuffer inklusive Sonde bei 72°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach diversen Waschstufen (10 min bei 68°C mit 5x SSC, 2 x 30 min bei 68°C mit 0,2x SSC, 5 min bei RT mit 0,2x SSC und 5 min mit B1) wurden die Schnitte mit 10% FCS/ B1 Puffer bei RT blockiert. Es folgte die Inkubation mit anti-Dig Antikörper-AP-Konjugat (1:7.500 in 1% Serum/ B1) über Nacht bei 4°C. Schließlich wurde nach dreimaligem Waschen für 30min mit B1 bei RT und 5minütiger Konditionierung mit B3 die AP-Reaktion durch Zugabe von B4 Substratlösung gestartet, und die Objektträger dazu im Dunkeln inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Signalintensität wurde mit TE Puffer abgestoppt und die Gewebe mit Immumount eingedeckt. Die Untersuchungen wurden mit *antisense* und zur Kontrolle der Spezifität mit *sense* Proben durchgeführt.

5.2.6 Reverse Transkription

Durch das Enzym Reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) überschrieben. Die cDNA kann anschließend wie klassische DNA für molekularbiologische Methoden eingesetzt werden. Die Reaktion wurde mit dem ThermoScript RT-PCR System von Life-Technologies durchgeführt.

Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurden 10pg – 5µg RNA, 50ng/µl random Primer oder 50µM Oligo(dT)₂₀ Primer auf Eis gemischt und zu einem Gesamtvolumen von 10 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 65°C denaturiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Dann wurden 10 µl einer Masterlösung (4µl 5x cDNA Synthesepuffer, 1µl 0,1 M DTT, 1µl RNaseOUT (40U/µl), 1µl RNase freies H₂O, 2µl 10 mM dNTP Mix, 1µl ThermoScript RT (15 U/µl)) hinzu pipettiert und je nach Primer wurde der Ansatz für 30-60 min bei 50°C (Oligo(dT)₂₀-Primer) oder für 10 min bei 25°C, gefolgt von 20-50 min bei 50°C (*Random Hexamer* Primer) inkubiert. Die Reaktion wurde durch fünfminütige Inkubation bei 85°C beendet. Optional kann nach Zugabe von 1µl RNase H die RNA durch Inkubation bei 37°C für 20 min abgebaut werden.. Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

5.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis und Saiki (1985) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR von *polymerase chain reaction*) wird zur Amplifizierung von Desoxyribonukleinsäure- (DNA) Fragmenten verwendet. Dabei werden zu der zu amplifizierenden DNA, z. B. in Form von Plasmiden, spezifische Primer mit einer Länge von 18-20 Basen und einer freien 3'-OH-Gruppe gegeben,

die sich an die komplementäre Sequenz anlagern und als Startpunkt für die DNA Polymerase dienen. Der 5'-Primer liegt in Richtung des Sinn-Stranges (*sense*), der 3'-Primer entgegengesetzt dazu (*antisense*). Nach Denaturierung der DNA bei 95°C wird die somit einzelsträngige DNA auf die entsprechende *annealing*- (sprich Anlagerungs-) Temperatur abgekühlt, die aus der Basenzusammensetzung der Primer nach folgender Faustregel errechnet wird: für jedes Guanosin/ Cytidin beträgt die Schmelztemperatur 4°C und für jedes Adenosin/ Thymidin 2°C; die Summe ergibt die *annealing*-Temperatur. Anschließend wird die optimale Temperatur der temperaturbeständigen DNA Polymerase, wie zum Beispiel der *Taq* DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder der *Pfu* DNA Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, eingestellt und somit der erste Strang bzw. Gegenstrang synthetisiert. Durch zyklische Wiederholung, in deren Verlauf auch die neusynthetisierten Stränge amplifiziert werden, kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung der Nucleotidsequenz. Einige Polymerasen besitzen zusätzlich noch eine Proofreading-Aktivität (3'-5'-Exonuclease), wodurch die Fehlerrate bei der Synthese wesentlich reduziert wird. Zusätzlich werden Kontrollen mit nur einem Primer angesetzt, um zu zeigen, dass spezifische PCR-Produkte erhalten werden.

Reaktionsansatz:

Substanz	Menge	Endkonzentration
DNA	variabel	<0,5 µg
DNTP-Mix, je 10mM	1 µl	je 200 µM
Primer, upstream	40 pmol	0,8 µM
Primer, downstream	40 pmol	0,8 µM
10x Polymerase Puffer mit MgSO4	5 µl	1x
Pfu DNA Polymerase	0,5 µl	1,45 u
H ₂ O	ad 50 µl	

Schritte:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	5	1
Denaturierung	95	1	25-35
<i>Annealing</i>	xx	0,5	
Kettenverlängerung	72	2	
Finale Kettenverlängerung	72	5	1
Abschluss	4	halten	

Die amplifizierten DNA-Fragmente werden anschließend nach Mischen mit Ladepuffer in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 0,5 bis 2%-igen Agarosegel aufgetrennt und mittels einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

5.2.8 Restriktionsverdau

Bei dieser Methode werden Endonucleasen, sogenannte Restriktionsenzyme, für das spezifische Schneiden von DNA verwendet. Der Mechanismus der Reaktion beruht auf einer hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindungen der DNA. Die verwendeten Enzyme gehören meist zum Typ II der Restriktionsenzyme, sind also reine Endonucleasen ohne Methylierungsaktivität und besitzen als Erkennungsstelle eine palindrome Sequenz von vier bis acht Basen. Die Spaltstelle befindet sich dabei meist innerhalb dieser Erkennungssequenz und kann, enzyspezifisch, entweder glatt sein (*blunt end*) oder einen 3'- bzw. 5'- Überhang (*sticky end*) besitzen. Für die Reaktion selbst sind lediglich ein entsprechender Puffer (Tris, MgCl₂, DTT), eine enzyspezifische Reaktionstemperatur (meist 37°C), sowie Enzym und DNA notwendig. Nach eineinhalb bis zwei Stunden ist die DNA meist vollständig verdaut und kann weiter verwendet werden. Viele Restriktionsenzyme lassen sich vorher noch bei 65°C oder 80°C (Enzym-abhängig) inaktivieren.

5. Material und Methoden

Ansatz:

	Volumen [μ l]
DNA	5
10x Puffer	1
Restriktionsenzym	1
H ₂ O	ad 10

5.2.9 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die Gelextraktion wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wird dabei die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel mit einem Skalpell möglichst eng ausgeschnitten, ausgewogen und in einem Mikroreaktionsgefäß (2 ml) mit dem dreifachen Volumen (100 mg ~ 100 μ l) an QG Puffer versetzt. Das Gefäß wird zum Lösen des Gels im QG Puffer im Wasserbad bei 50°C für 10 Minuten erhitzt. Um das Lösen zu erleichtern, wird während dieser Inkubationszeit alle 2-3 Minuten gevortext. Nach Zugabe von 1 Volumen Isopropanol wird die Lösung auf die QIAquick Zentrifugations säule gegeben und die DNA durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 13.000 Upm in einer Tischzentrifuge an das Säulenmaterial gebunden. Nach Waschen mit PE Puffer wird das Säulchen trocken zentrifugiert (1 min bei 13.000Upm) und die DNA nach 1-minütiger Inkubation mit 50 μ l H₂O_{bidest} eluiert.

5.2.10 Ligation

Zum Einfügen eines DNA Fragments in einen Vektor wird die Ligationsreaktion verwendet. Die DNA-Ligase zum Beispiel aus *E. coli* oder dem Phagen T4, verknüpft dabei die Doppelstränge. Man unterscheidet bei der Ligation *blunt end* und *sticky end ligation*, je nachdem ob man einen glatten Abschluss oder Überhänge an den Enden von Plasmid/ Fragment hat. Um eine Selbstligation des Vektors zu vermeiden, kann das Plasmid vor der Ligation noch mit Phosphatase behandelt werden. Für die Reaktion ist ein entsprechender Vektor, das Fragment, ein geeigneter Puffer sowie die Ligase notwendig. Die Konzentration der eingesetzten Fragmente und Vektoren lassen sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{ng Fragment} = (\text{ng Vektor} \times \text{Größe Insert}) / \text{Größe Vektor}$$

Dabei kann man zur Optimierung der Reaktion das Verhältnis von Vektor zu Insert zwischen 4:1 und 1:4 variieren. Meist wird ein Verhältnis von 1:3 verwendet. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 12-14 °C.

Ansatz:

Insert	s.o.
Vektor	s.o.
Ligase	20-400 u
Puffer	1x
H ₂ O _{bidest.}	ad 10 μ l

5.2.11 Klonierungen

Die folgenden Klonierungen wurden durchgeführt:

RGM:

Name	Template	Nukleotide	AS	Primer	Restriktion	Vektor
pDM11	cDNA	1-1044	1-348	VGbgl2 Vgrev2	BglIII	Aptag2
pDM12	cDNA	1-1206	1-402	VGbgl2 rgm-bglII-r-404	BglIII	Aptag2

Name	Template	Nukleotide	AS	Primer	Restriktion	Vektor
pDM15	pDM11	81-1044 + AP	27-348 + AP	rgm-hindiii-f31 rgm-ecori-r3685	HindIII EcoRI	pSecTag2-B
pDM16	pDM12	81-1206 + AP	27-402 + AP	rgm-hindiii-f31 rgm-ecori-r3685	HindIII EcoRI	pSecTag2-B

Neogenin:

Name	Template	Nukleotide	AS	Primer	Restriktion	Vektor
pDMNeogA	cDNA	1-1200	1-400	neo-kpni-f1 neo-ecorv-r400	KpnI EcoRV	pSecTag2-B
pDMNeogB	cDNA	1200-3261	400-1087	neo-kpni-f400 neo-ecorv-r1087	KpnI EcoRV	pSecTag2-B
pDMNeogD	cDNA	1-3261	1-1087	neo-kpni-f1 neo-ecorv-r1087	KpnI EcoRV	pSecTag2-B
pDMNeogE	cDNA	1-3345	1-1115	neo-kpni-f1 neo-ecorv-r1115	KpnI EcoRV	pSecTag2-B
pDMNeogF	cDNA	1-4329	1-1443	neo-kpni-f1 neo-ecorv-r1443	KpnI EcoRV	pSecTag2-B
pDMNeogG	cDNA	1200-3345	400-1115	neo-kpni-f400 neo-ecorv-r1115	KpnI EcoRV	pSecTag2-B
pDMNeogH	cDNA	1200-4329	400-1443	neo-kpni-f400 neo-ecorv-r1443	KpnI EcoRV	pSecTag2-B

5.2.12 Transformation

Zur Vermehrung der in der Ligation erhaltenen Plasmide, werden diese in kompetente Bakterien eingeschleust. Mit Kompetenz bezeichnet man hierbei die Fähigkeit der Bakterien, die Plasmide durch Membran und Zellwand aufzunehmen. Durch Behandlung mit CaCl₂ werden Membran und Zellwand kurzzeitig durchlöchert, so dass die Plasmide eindringen können. In der Arbeit wurden kompetente Zellen verschiedener Hersteller verwendet. Diese wurden jeweils nach dem Auftauen auf Eis mit 5 - 10µl Ligationsreaktionslösung versetzt und nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis einem 30 Sekunden dauernden Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach dem Abschrecken für zwei Minuten auf Eis wurden SOC oder LB Medium hinzugegeben und die Zellen für 30 - 60 min bei 180 Upm und 37°C wachsen gelassen. Anschließend wurden 100 µl auf Agarplatten mit Antibiotika (entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien standen dann für die weitere Verwendung zur Verfügung.

5.2.13 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur schnellen und einfachen Isolierung und Reinigung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit von peqlab verwendet. 2-5 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, das Pellet in Lösung I/RNase A durch Vortexen resuspendiert, die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer (Lösung II) aufgeschlossen und anschließend genomische DNA und Zellproteine durch Zugabe von Neutralisationspuffer (Lösung III) ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren des Präzipitats (13.000 UPM, RT) wurde der Überstand auf eine HiBind-Miniprep-Zentrifugationssäule gegeben und die Plasmid-DNA an die Säule bei der Zentrifugation gebunden. Nach dem Waschen mit HB- und Waschpuffer wurde die Säule trocken zentrifugiert und anschließend die Plasmid DNA mit 50 - 100 µl Wasser oder TE-Puffer eluiert.

5. Material und Methoden

5.2.14 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden QIAfilter™ Plasmid Maxi und HiSpeed Maxi Kits verwendet. Bakterien aus 200- 400 ml Übernachtskulturen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 6000 Upm in der Sorvall RC5 Zentrifuge pelletiert, in Puffer 1 resuspendiert, mittels Puffer 2 lysiert und anschließend mit Puffer 3 neutralisiert. Das entstehende Präzipitat aus genomischer DNA und den Zellproteinen wurde über eine QIAfilter Cartridge abgetrennt und der Durchlauf auf eine DEAE-Anionen-Austauschersäule (QIAGEN-tip 500) gegeben. Nach dem Binden der DNA und zweimaligem Waschen mit QC wurde diese mit Elutionspuffer QF eluiert. Anschließend erfolgte eine Fällung mit 0,7 Volumen Isopropanol. Beim QIAfilter Plasmid Maxi Kit folgte eine Zentrifugation, Reinigung des Pellets mit 70%igem Ethanol und Lösen des Pellets nach Trocknen in 200µl Wasser. Beim HiSpeed Kit wurde die Lösung mit der gefällten DNA durch einen Filter gepresst, an dem die DNA bindet, nach Waschen dieses Filters mit 70%igem Ethanol erfolgte die Elution mit H₂O.

5.2.15 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte jeweils UV-spektrometrisch durch die Messung der Absorption von verdünnten (in der Regel 1:50 in H₂O_{bidest.}) DNA-Lösungen bei einer Wellenlänge von 260nm. Eine Absorption von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einer DNA Konzentration von 50 µg/ml. Entsprechend dieser Beziehung können unter Einbeziehung der Verdünnung die Konzentrationen der isolierten DNA berechnet werden. Außerdem wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und durch Division der gemessenen Werte von $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ das Verhältnis bestimmt.

5.2.16 Transfektion und Genexpression

Für die Expression von Proteinen wurden sowohl Cos7- als auch HEK293-Zellen in Kultur gehalten und transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine 2000 von Invitrogen. Für die Durchführung wurden eine der Größe der Zellkulturschalen entsprechende Menge an Zellen (6-well: 100.000) am Tag vorher ausgesät und in Zellkulturmedium über Nacht wachsen gelassen. Je nach Größe der Zellkulturschalen wurden dann DNA (6-well: 3µg) und Transfektionsreagenz (5µl) getrennt in Medium (je 200µl für 6-well) verdünnt, anschließend wurden diese Verdünnungen vereinigt, für zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben. Nach zwei bis fünftägiger Inkubation konnten die Überstände und/ oder Zellen geerntet werden.

5.2.17 Zellulärer Bindungstest/ Screening cDNA Bank

Der zelluläre Bindungstest sowie das Screening der cDNA Banken erfolgte nach einem Protokoll von Cheng et al. (1994, Cell 79, 157-168). Dabei werden am Tag zuvor 6-well Platten mit 0,1 mg/ml poly-L-Lysin für 2h bei 37°C beschichtet, einmal mit PBS gewaschen und anschließend werden 100.000 Zellen pro Well ausgesät. Entsprechend dem Protokoll für die Transfektion mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) werden die Zellen mit 3µg DNA transfiziert und für 48h wachsen gelassen. Dann wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit konditioniertem Medium (20nM AP-Fusionsprotein) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit HBHA innerhalb von 10 min werden die Zellen für 5 min mit 4% PFA/ PBS Lösung fixiert, zweimal mit HBHA gewaschen und über Nacht mit 3ml HBHA pro well bei 67°C inkubiert, wobei die 6-well Platten mit Deckel jeweils in Aluminiumfolie eingewickelt werden. Nach mindestens 12-stündiger Inaktivierung der endogenen Phosphatasen werden die Zellen mit AP-Puffer für 5 min konditioniert und anschließend wird die AP-Reaktion durch Substratzugabe gestartet. Je nach gewünschter Signalintensität wird die Reaktion durch Austausch der Substratlösung gegen Stopplösung gestoppt.

5.2.18 AP-Test

Zur Bestimmung der AP-Aktivität und der sich anschließenden Berechnung der AP oder AP-Fusionsprotein Konzentration wurde der AP-Test durchgeführt. Dabei werden in Hanks verdünnte Proteinlösungen (gereinigte Proteine oder Hitze-inaktivierte Zellkulturüberstände) 1:1 mit 2x AP-Substratlösung versetzt und die Absorption bei 405nm im Photometer über eine Minute gemessen. Sofern sich die gemessene Reaktion im Steady-state befindet (linearer Anstieg der Absorptionsänderung) lässt sich durch Referenzmessungen die Proteinkonzentration des AP-Fusionsproteins bestimmen.

5.2.19 Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine wurde im sogenannten Batch Verfahren durchgeführt. Dazu wurden zu je 50 ml Zellkulturüberstand, sofern es sich um sekretierte, lösliche Proteine handelte, nach Abtrennung der Zellen 2 ml Ni-NTA Agarose (50% Suspension) gegeben und diese im 50 ml Falcon-Röhrchen für 1-2 h bei 4°C über Kopf rotiert. Danach wurde die Agarose durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 500 x g pelletiert und zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluß wurden die gebundenen Proteine mit zweimal 0,9ml Elutionspuffer eluiert und die Agarose wieder durch Zentrifugation abgetrennt. Alternativ wurde nach dem Binden die Lösung über eine Säule mit Fritte laufen gelassen, in der die Agarose zurückgehalten wurde. Die Wasch- und Elutionsschritte erfolgten dann auf der Säule, mit dem Vorteil, dass sich anschließend keine Agarose im Eluat wiederfand. Anschließend wurden die Eluate in Dialyseschläuche überführt und über Nacht gegen PBS dialysiert.

5.2.20 Bradford-Assay

Der 1976 von Bradford entwickelte Test beruht auf einer Komplexbildung zwischen dem sauren Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau G250 und Proteinen und dient der Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine, wodurch die unprotonierte, anionische Sulfonatform stabilisiert wird. Es erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm.

Es wurde für den Bradford-Assay die Roti-Nanoquant-Lösung der Firma Roth verwendet. Je 50 µl von verdünnten Proteinlösungen (1:20 bis 1:100) wurden in Mikrotiterplatten pipettiert (Doppelbestimmung) und mit 200 µl der Arbeitslösung Roti-Nanoquant versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbintensität im ELISA-Reader bestimmt. Durch die Verwendung einer BSA-Eichgeraden, die ebenfalls auf die Mikrotiterplatte pipettiert und mit der Arbeitslösung versetzt wurde, und deren Werte im entsprechenden Programm des ELISA-Reader gespeichert sind, wurden die Proteinkonzentrationen der Proben direkt vom ELISA-Reader ausgerechnet und sowohl die Eichgerade wie auch die Konzentrationswerte ausgedruckt. Für die Eichgerade wurden folgende Konzentrationen (in µg/ml) verwendet: 0, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100.

5.2.21 Biochemischer Bindungstest

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten und somit der Bindungsstärke von Protein-Protein Interaktionen wurde in Anlehnung an die Affinitätsbindung im zellulären Test ein biochemischer Bindungstest in ELISA-Platten entwickelt. Hierzu wurden rekombinant exprimierte, affinitätschromatographisch gereinigte Proteine (sekretierte Neogenin-Fragmente A, B, D) an Highbind-Platten über Nacht bei 4°C binden gelassen (5,0-1µg oder 10-100nM). Nach Waschen mit PBS wurden nicht abgesättigte Bindungsstellen auf der Platte mit 1%iger BSA-Lösung für eine Stunde bei RT blockiert und dann Verdünnungsreihen von RGM-AP (≤100nM) für zwei Stunden bei RT binden gelassen. Es folgten intensive Waschschr

5. Material und Methoden

anschließend der Start der AP-Reaktion durch Zugabe von 2xAP-Substratlösung. Die Reaktion wurde im ELISA-Reader (Triplicates) bei 405nm verfolgt und die Werte anschließend nach Übertragung in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel durch Vergleich mit Eichreaktionen ausgewertet. Die Darstellung der Bindungskurven und die Berechnung Dissoziationskonstanten durch Scatchard Plot erfolgte mit Hilfe der Software Prism 3.0 (GraphPad).

5.2.22 Gewebeisolierung

Die Hühnerembryonen wurden den Eiern mit einer Pinzette am flachen Pol entnommen und sofort dekaptiert. Anschließend wurden entweder die Tectum oder das Gesamthirn mit einer dünnen Pinzette herauspräpariert und nach Entfernung der Haut wurde das Gewebe in Homogenisierungspuffer im Dounce-Homogenisator oder Potter und anschließend mit 27-G Nadel und Spritze homogenisiert. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis. Das Homogenat wurde anschließend der differentiellen Zentrifugation unterworfen.

5.2.23 Differentielle Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation ist eine klassische Methode zur Zellfraktionierung und nutzt die unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellbestandteile aus. Das Tectum- oder Gesamthirn-Homogenat wird 15 min bei 16.000 x g und 4°C (Eppendorf Kühlzentrifuge) zentrifugiert. Dadurch erfolgt eine Trennung in Sediment (P16), das aus der Zelldebris und Kernen sowie größeren Organellen besteht, und Überstand (S16). Der Überstand wird anschließend in einem zweiten Zentrifugationsschritt von 60 min bei 100.000 x g und 4°C (TLA 100.3) weiter getrennt in Sediment (P100), in dem sich die Hirnmembranen wiederfinden, und Überstand (S100).

5.2.24 Herstellung von Membranextrakten

Das Sediment (P100) aus der differentiellen Zentrifugation wurde mit 27-G Nadeln und Spritzen in unterschiedlichen Detergenzlösungen (0,1-2% Triton X-100, 0,5-2%ige Deoxycholat-Lösung, RIPA Puffer) resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C unter Rotation wurden nicht gelöste Membranen für 20 min bei 20.000 x g in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert.

5.2.25 Immunpräzipitation

Zum spezifischen Herausfischen von RGM-bindenden Molekülen wurden Immunpräzipitationen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Membranextrakte oder in PBS resuspendierte Membranen wurden mit RGM-AP oder AP Lösung für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach dem Clearing mit Protein-G-Sepharose zum Entfernen unspezifischer Bindungspartner, wurden Antikörperlösungen (anti-RGM oder anti-AP-Antikörper (Seradyn) hinzugegeben, inkubiert und nach Zugabe von Protein-G-Sepharose erneut inkubiert, jeweils unter Rotation. Durch Zentrifugation wurde die Protein-G-Sepharose pelletiert und nach Waschen erfolgte entweder eine Schrittweise Elution mit Elutionspuffer oder die direkte Denaturierung nach Zugabe von SDS-Ladepuffer bei 100°C.

5.2.26 Crosslinking

Eine Methode zur kovalente Verknüpfung von interagierenden Molekülen stellt das Crosslinking dar. Im Rahmen der Arbeit wurden verschiedene Reagenzien getestet.

DMA: Proteinlösungen bestehend aus einer Mischung von Membranextrakten/ -suspensionen und RGM-AP/ AP, wurden in einer Konzentration von circa 1mg/ml in Reaktionspuffer hergestellt. Dann wurde der Crosslinker in einer Endkonzentration von 10 mM hinzugegeben und die Reaktionszeit zwischen 30 und 60 min bei RT variiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eisessig in einem Verhältnis 1:4 im Vergleich zur Probenlösung abgestoppt.

DSS: DSS wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in DMSO gelöst (Verdünnungsreihe: 100, 50, 25, 12,5 mM). Dann wurden diese zu Proteinlösungen aus Membranextrakten/-suspensionen und RGM-AP/ AP hinzugegeben, so dass die Endkonzentrationen von DSS zwischen 0,25 und 5mM lagen. Nach Inkubation für 2h auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von Quenchlösung (Endkonzentration 20-50mM) abgestoppt.

EDC: 2mM Crosslinker wurde zu Mischungen aus Membranextrakten/ -suspensionen und RGM-AP/ AP gegeben und der Reaktionsmix für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 1M Glycin (Endkonzentration: 50mM) die Reaktion gestoppt.

Cu-Phenanthrolin: Mischungen aus Membransuspensionen und RGM-AP/ AP, in Reaktionspuffer angesetzt, wurden mit $\frac{1}{4}$ Volumen Crosslinkerlösung versetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten (0-15 min) wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA und SDS-Ladepuffer sowie Denaturierung für 5 min bei 100°C gestoppt.

Alle Proben wurden durch Zugabe von SDS-Ladepuffer und Inkubation bei 100°C für 10 min denaturiert und durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Detektion im Western Blot durch spezifischen Antikörper (anti-RGM, anti-AP).

5.2.27 SDS-PAGE

Die von Laemmli (1970) entwickelte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen. Dabei lagert sich Natrium-Dodecylsulfat (englisch sodium-dodecylsulfate, SDS) an die Proteine an und verleiht diesen eine negative Nettoladung. Das Gel besteht aus zwei Bereichen; mit dem oben liegenden Sammelgel, das eine niedrigere Acrylamidkonzentration besitzt zur Fokussierung der Proteine, und dem darunter liegenden, höher konzentrierten Trenngel zur Auftrennung. Fokussierung und Trennung werden aufgrund unterschiedlicher pH-Werte von Sammel- und Trenngel erreicht, wobei im elektrischen Feld des Sammelgels unterschiedliche Leit- und Folgeionen jeweils für das Abbremsen und Beschleunigen der Proteine verantwortlich sind. Dabei entsteht ein Spannungsgradient, an dem sich die Proteine ausrichten. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung durch das Abbremsen der Proteine aufgrund der Porengröße, bzw. der Größe der Proteine. Dabei wandern kleinere Proteine schneller durch das Gel als größere.

In der Arbeit wurden Konzentrationen von 8, 10 und 12% für das Trenngel verwendet, sowie ein 5%iges Sammelgel. Beim 12%igen Gel können auch noch Proteine von 25 kD aufgetrennt werden, während diese bei 10 oder 8%igen Gelen bereits aus dem Gel mit der Farbstoffbande rauslaufen. Die Gele wurden anschließend entweder geblottet, um spezifische Banden zu identifizieren oder Comassie- bzw. Silber-gefärbt, um Unterschiede zwischen verschiedenen Proben zu bestimmen. Die Apparatur war eine die Mini PROTEANTM II Cell von Biorad.

5.2.28 Comassie-Färbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Comassie-Färbelösung für zwei Stunden geschüttelt und anschließend in Entfärbelösung bis zur Gelentfärbung inkubiert. Dabei blieben die Proteinbanden gefärbt. Die Auflösungsgrenze liegt zwischen 100 ng und 1 µg.

5.2.29 Silberfärbung

Für eine Detektion von geringeren Mengen Protein (Nanogramm-Bereich) wird die wesentlich sensitivere (30-50fach) Silberfärbung angewendet. Hierzu wurde das Biorad Silver Stain Plus Kit verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die Gele in der Fixierlösung für 20 min fixiert, zweimal für 20 min mit Wasser gewaschen und anschließend mit Färbelösung bis zur gewünschten Bandenintensität entwickelt. Die Reaktion wurde durch Austausch der Reaktionslösung gegen Stopplösung beendet.

5. Material und Methoden

5.2.30 Gelrocknung

Nach der Färbung wurden die Gele in Wasser gewaschen. Dann wurden sie in Trockenpuffer eingelegt und anschließend zwischen Cellophanfolie in einem Trockenrahmen für 2-3 Tage zur Trocknung aufgespannt.

5.2.31 Western-Blot

Durch das 1979 von Renart und Towbin entwickelte Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert und immobilisiert. Anschließend lassen sich die Proteine mit spezifischen Antikörpern direkt auf der Membran nachweisen.

Der Elektrotransfer erfolgte in 2 h bei 200 mA und RT oder über Nacht bei 4°C und 12-20V in einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell von Biorad und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die verwendete Nitrocellulosemembran hatte eine Porengröße von 0,2 µm. Vor dem Aufbau wurden alle Komponenten in Blotpuffer eingelegt. Der Aufbau der Apparatur sah dabei von der Kathode zur Anode folgendermaßen aus: Fasermatte, Whatman-Paper, Trenngel, Blotmembran, Whatman-Paper, Fasermatte. Dieses "Sandwich" wurde in die mitgelieferte Kassette gegeben und diese dann in die Blotkammer gesteckt.

Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in 5% Milchpulver in PBS blockiert. Im Anschluss wurde die Membran im ersten Antikörper (Verdünnungen: anti-AP: 1:4.000, anti-HIS: 1:2.000, gereinigter anti-RGM-AK: 1:100) in PBST für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für zehn Minuten mit PBST, wurde für 90 Minuten mit dem Zweitantikörper-AP-Konjugat bei RT (Verdünnungen: je 1:4.000) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für fünf Minuten und fünfminütiger Konditionierung in AP-Puffer wurde das Bandenmuster mit AP-Färbelösung bis zur gewünschten Farbintensität entwickelt.

5.2.32 Ponceau Färbung

Bei der Ponceaufärbung dient der reversiblen Färbung von immobilisierten Proteinen. Die Blotmembran wird in der Färbelösung für 10 min inkubiert, wodurch die gesamte Membran gefärbt wird, und anschließend wird der Hintergrund durch Waschen mit Wasser entfernt. Langes Waschen führt schließlich wieder zu einer Entfärbung (unter anderem auch durch den Blockierungsschritt beim Western Blot).

5.2.33 AP-Blot

Der AP-Blot wurde in Anlehnung an die zellulären und biochemischen Bindungstests zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen verwendet. Dabei wird das AP-Fusionsprotein an immobilisierte Proteine auf der Membran binden gelassen und nach intensivem Waschen mit 0,1% Triton X-100/PBS und der Konditionierung der Membran in AP-Puffer wird das Bandenmuster mit AP-Substratlösung entwickelt.

5.2.34 Dot-Blot-AP-Färbung

Um die Expression der AP-Konstrukte zu kontrollieren, wurden je 5 µl Zellkulturüberstand auf eine Nitrocellulosemembran aufgebracht; diese wurde 1-2 Stunden mit HBSS oder PBS bei 65°C zur Inaktivierung endogener Phosphatasen inkubiert, dann für 5 Minuten in AP-Puffer konditioniert und mit AP-Färbelösung bis zur gewünschten Farbintensität entwickelt.

5.2.35 Gewebsschnitte

Für die Lokalisation von Rezeptoren und Liganden war es notwendig, Gewebepreparate anzufertigen. Hierfür wurden entweder unfixiertes oder vorfixiertes Gewebe verwendet. Die Ge-

webe (ganze Köpfe von Hühnerembryonen oder Teilgewebe, z. B. Tecten) wurden zum einen direkt aus dem Ei entnommen, in Tissue-Tek eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Sobald das Tissue-Tek fest war, wurden die eingebetteten Gewebe bei -20°C durchgefroren. Zum anderen wurden bei Vorfixierung ganze Embryonen aus den Eiern entnommen und in phosphatgepufferter 4%iger PFA- (Paraformaldehyd) Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen in 30%ige Saccharoselösung transferiert und dort solange belassen, bis sie auf den Boden des Gefäßes gesunken waren (ca. 2-3 Tage). Anschließend wurden sie entsprechend den nicht vorfixierten Geweben eingebettet und tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Klötzchen mit den Geweben wurden dann am Gefriermikrotom in $14\ \mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger gebracht. Darauf wurden sie entweder direkt verwendet oder zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

5.2.36 Immunfärbungen

Für die Immunfärbungen wurden vorfixierte Gewebeschnitte verwendet. Dazu wurden die Objektträger mit den Schnitten auf Raumtemperatur gebracht und getrocknet. Nach der Umrandung der Objektträger mit dem PAP PEN (einem Fettstift, der verhindert, dass Flüssigkeit vom Objektträger runterläuft) wurden die Schnitte für fünf Minuten mit 1% BSA (englisch *bovine serum albumine*, Rinderserum-Albumin) in PBS (englisch *phosphate buffered solution*, phosphatgepufferte Lösung) blockiert. Anschließend wurden $500\ \mu\text{l}$ mit PBS 1:10 bis 1:1.000 verdünnte Antikörperlösung pro Objektträger aufgetragen und entweder für 3-4 Stunden bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde viermal fünf Minuten mit PBS gewaschen und dann 30 Minuten mit dem Zweitantikörper bei RT inkubiert. Nach diesem Schritt wurde erst zweimal fünf Minuten mit PBS gewaschen, dann für zehn Minuten mit DAPI-Färbelösung inkubiert und anschließend wieder zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Moviol eingedeckt.

5.2.37 In situ Färbungen mit AP-Fusionsproteinen (receptor affinity probe, RAP)

Für die Affinitätsfärbungen mit AP-Konstrukten wurden entweder vorfixierte oder unfixierte Gewebe verwendet. Dabei wurden die vorfixierten Schnitte nach kurzem Waschen mit HBSS (*Hank's balanced salt solution*) direkt mit HBSS, 20 mM Hepes (pH 7,0), 0,5 mg/ml BSA für fünf Minuten blockiert. Die nicht vorfixierten Schnitte wurden kurz mit HBSS gewaschen, zwei Minuten in Methanol (-20°C) fixiert und dann mit HBSS, 20 mM Hepes (pH 7,0), 0,5 mg/ml BSA für fünf Minuten blockiert. Anschließend wurden die Schnitte entweder 90 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Überständen von transfizierten Zellen behandelt, danach sechsmal für eine Minute mit HBSS, 20 mM Hepes (pH 7,0), 0,5 mg/ml BSA gewaschen und in 4% PFA in PBS für eine Minute erneut fixiert. Die Schnitte wurden dann für ein bis zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei 65°C mit HBSS, 20 mM HEPES (pH 7,0), 0,5 mg/ml BSA inkubiert, um endogene alkalische Phosphatase zu inaktivieren. Nach fünfminütiger Behandlung mit AP-Puffer wurden die Schnitte mit Färbelösung im Dunkeln bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert. Zum Stoppen der Farbreaktion wurden die Schnitte mit PBS behandelt und anschließend mit Moviol eingedeckt.

5.2.38 Streifentest

Membranpräparation. Die Membranen aus Hühnertecten (gedrittelt, davon wurde der anteriore und posteriore Teil getrennt verarbeitet und der mittlere Teil verworfen) wurden entsprechend dem Protokoll von Walter *et al.* (1987a, b) präpariert. Alle Lösungen waren steril und mit Protease Inhibitoren (complete, Roche, PEFA-Block)) versetzt. Nach Homogenisierung des Gewebes in Homogenisierungspuffer mittels blauer Pipettenspitze und 27-G Nadeln und Spritzen (10mal, auf Eis), wurde das Homogenat auf einen Stufengradienten aus 5 und 50% Saccharose gegeben und für 10 min bei $28.000\ \text{x g}$ in einem Ausschwingrotor

5. Material und Methoden

(Optima Ultrazentrifuge, Beckmann) zentrifugiert. Zytoplasmatische und mitochondriale Membranen bilden dabei eine trübe Schicht zwischen 5 und 50%iger Saccharose, die mit Nadel und Spritze vorsichtig herausgesogen wurde, während die Zellkerne pelletieren. Nach einmaligem Waschen mit PBS, wurden die Membranen resuspendiert und die OD bei 220nm einer 1:50 Verdünnung in 2% SDS gemessen. Für die weitere Verwendung wurde die Suspension auf eine OD von 0,1 verdünnt.

Streifenteppichpräparation. Zurechtgeschnittene und an einer Ecke markierte Nucleoporefilter wurden auf 1% Agaroseplatten gelegt und von jeder Seite für 3 min unter UV-Licht sterilisiert. Nach dem Überführen in eine Zellkulturschale wurden pro Filter 150 µl Lamininlösung aufgetropft und die Schale steril im Inkubator für 2 h bei 37°C zur Beschichtung der Filter inkubiert. Anschließend wurde die Schale mit PBS zum Waschen aufgefüllt. Die Teppiche wurden dann in der ersten Runde auf die gereinigten, sterilen Matrizen mit Streifenmuster aufgelegt, 150µl der ersten Membransuspension (in der Regel posteriore mit Fluoreszenzkügelchen) wurden aufgetropft und ein Vakuum von mindestens 600 mbar für 90 sec angelegt. Nach Waschen mit PBS wurden die membranbeschichteten Filter auf Agaroseplatten zwischengelagert. Anschließend wurden die zweiten Matrizen mit durchgängiger homogener Saugfläche auf die Saugapparatur gelegt, die Filter aufgelegt, die zweite Membransuspension (in der Regel anteriore) aufgetropft und erneut das Vakuum angelegt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Membranteppiche erneut bis zur Fertigstellung der anderen auf Agaroseplatten unter Kühlung zwischengelagert. Nach Abschluss des Saugvorgangs wurden die Teppiche in 12-well Platten überführt, seitlich mit Klötzchen fixiert und in Hank's oder PBS bis zur Aufbringung der Explantatstreifen bei 4°C gelagert.

Retinaexplantae. Die Explantate wurden von R. Nordin präpariert und auf die Membranteppiche aufgelegt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen. Embryonen aus dem Stadium E6 oder E7 wurden aus den Eiern entnommen und sofort dekaptiert. Die Augen wurden herauspräpariert und nach Entfernung des Pigmentepithels wurde die Retina auf einem ConA Filter ausgebreitet und leicht am Rand fixiert. Auf einem Gewebehacker wurde die Retina in 275 µm breite Streifen gehackt, dergestalt dass in einem Streifen sowohl temporale als auch nasale Bereiche der Retina vorhanden waren. Anschließend wurden die Explantatstreifen mit der Retina nach unten auf die Streifenteppiche gelegt und mit den Klötzchen fixiert. Das Wachstum erfolgte in 2 ml F12 Medium mit Methyl-cellulose ohne oder mit Zusätzen (z. B. gereinigtes Neogenin-Ecto Protein).

Fixierung und Färbung. Nach 48h Wachstum wurden 2 ml 4%ige PFA Lösung pro well vorsichtig zugegeben und die Platten über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und 10minütiger Permeabilisierung mit Triton X-100 wurden die Teppiche für 30 min bei RT in einer Alexa-Phalloidin Färbelösung inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit Moviol auf Objektträgern eingedeckt.

Auswertung. Die Auswertung geschah nach Verblindung anhand von Aufnahmen der Teppiche am Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop und nach Zusammensetzen der Aufnahmen der Streifenexplantate mittels Adobe Photoshop. Es wurde nach den Kriterien von Walter *et al.* (1987) sowie Ciossek *et al.* (1998) verfahren mit der Modifikation, dass ganze und halbe Werte (sieben Stufen: 3, 2,5, 2, 1,5, ...) verwendet wurden.

6. Literatur

- Ackerman SL, Kozak LP, Przyborski SA, Rund LA, Boyer BB, Knowles BB. 1997
The mouse rostral cerebellar malformation gene encodes an UNC-5-like protein.
Nature. Apr 24;386(6627):838-42.
- Anderson RG. 1998
The caveolae membrane system.
Annu Rev Biochem. 67:199-225. Review.
- Behar O, Golden JA, Mashimo H, Schoen FJ, Fishman MC. 1996
Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart.
Nature. Oct 10;383(6600):525-8.
- Berridge MJ. 1998
Neuronal calcium signaling.
Neuron. Jul;21(1):13-26. Review.
- Bonhoeffer F, Gierer A. 1984
How do retinal axons find their targets on the tectum?
Trends Neurosci. 7:378-381
- Bradford M. 1976
Anal Biochem. 72, 248-254
- Brennan C, Monschau B, Lindberg R, Guthrie B, Drescher U, Bonhoeffer F, Holder N. 1997
Two Eph receptor tyrosine kinase ligands control axon growth and may be involved in the creation of the retinotectal map in the zebrafish.
Development. Feb;124(3):655-64.
- Brown DA, London E. 1998
Functions of lipid rafts in biological membranes.
Annu Rev Cell Dev Biol. 14:111-36. Review.
- Brückner K, Pasquale EB, Klein R. 1997
Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors.
Science. Mar 14;275(5306):1640-3.
- Brückner K, Pablo Labrador J, Scheiffele P, Herb A, Seeburg PH, Klein R. 1999
EphrinB ligands recruit GRIP family PDZ adaptor proteins into raft membrane microdomains.
Neuron. Mar;22(3):511-24.
- Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. 1997
Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III.
Neuron. Sep;19(3):547-59. Erratum in: Neuron 1997 Sep;19(3):559.

6. Literatur

- Cheng HJ, Flanagan JG. 1994
Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases.
Cell. Oct 7;79(1):157-68.
- Cheng HJ, Nakamoto M, Bergemann AD, Flanagan JG. 1995
Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map.
Cell. Aug 11;82(3):371-81.
- Chisholm A, Tessier-Lavigne M. 1999
Conservation and divergence of axon guidance mechanisms.
Curr Opin Neurobiol. Oct;9(5):603-15. Review.
- Ciossek T, Monschau B, Kremoser C, Loschinger J, Lang S, Muller BK, Bonhoeffer F, Drescher U. 1998
Eph receptor-ligand interactions are necessary for guidance of retinal ganglion cell axons in vitro.
Eur J Neurosci. May;10(5):1574-80.
- Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJ. 1998
Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1.
Curr Biol. Jan 1;8(1):26-33.
- Corset V, Nguyen-Ba-Charvet KT, Forcet C, Moysé E, Chedotal A, Mehlen P. 2000
Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor
Nature. Oct 12;407(6805):747-50.
- Cox EC, Muller B, Bonhoeffer F.
Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina.
Neuron. 1990 Jan;4(1):31-7.
- Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N. 1997
Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system.
Nat Genet. Nov;17(3):346-9.
- Davis S, Gale NW, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Lhotak V, Pawson T, Goldfarb M, Yancopoulos GD. 1994
Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity.
Science. Nov 4;266(5186):816-9.
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW. 1997
Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia.
Neuron. Sep;19(3):575-89.

- Deitinghoff L. 2001
Lokalisation von RGM (repulsive guidance molecule) und seinem Rezeptor im retinotectalen System des Hühnerembryos.
Diplomarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Demyanenko GP, Maness PF. 2003
The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons.
J Neurosci. Jan 15;23(2):530-8.
- Doherty P, Barton CH, Dickson G, Seaton P, Rowett LH, Moore SE, Gower HJ, Walsh FS. 1989
Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms.
J Cell Biol. Aug;109(2):789-98.
- Doherty P, Rowett LH, Moore SE, Mann DA, Walsh FS. 1991a
Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM and N-cadherin reveals fundamental differences in neuronal responsiveness to CAMs.
Neuron. Feb;6(2):247-58.
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS. 1991b
Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels.
Cell. Oct 4;67(1):21-33.
- Drescher U, Kremoser C, Handwerker C, Loschinger J, Noda M, Bonhoeffer F. 1995
In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases.
Cell. Aug 11;82(3):359-70.
- Drescher U, Bonhoeffer F, Müller BK. 1997
The Eph family in retinal axon guidance.
Curr Opin Neurobiol. Feb;7(1):75-80. Review.
- Drescher U. 1997
The Eph family in the patterning of neural development.
Curr Biol. Dec 1;7(12):R799-807. Review.
- Engelkamp D. 2002
Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation.
Mech Dev. Oct;118(1-2):191-7.
- Eph Nomenclature Committee. 1997
Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins.
Cell. Aug 8;90(3):403-4.
- Feiner L, Webber AL, Brown CB, Lu MM, Jia L, Feinstein P, Mombaerts P, Epstein JA, Raper JA. 2001
Targeted disruption of semaphorin 3C leads to persistent truncus arteriosus and aortic arch interruption.
Development. Aug;128(16):3061-70.

6. Literatur

Feldheim DA, Vanderhaeghen P, Hansen MJ, Frisen J, Lu Q, Barbacid M, Flanagan JG. 1998
Topographic guidance labels in a sensory projection to the forebrain.
Neuron. Dec;21(6):1303-13.

Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG. 2000
Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping.
Neuron. Mar;25(3):563-74.

Flanagan JG, Leder P. 1990
The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts.
Cell. Oct 5;63(1):185-94.

Flanagan JG, Chan DC, Leder P. 1991
Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant.
Cell. Mar 8;64(5):1025-35.

Foster DC, Wedel BJ, Robinson SW, Garbers DL. 1999
Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases.
Rev Physiol Biochem Pharmacol.;135:1-39. Review.

Friedrichson T, Kurzchalia TV. 1998
Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking.
Nature. Aug 20;394(6695):802-5.

Frisen J, Barbacid M. 1997
Genetic analysis of the role of Eph receptors in the development of the mammalian nervous system.
Cell Tissue Res. Nov;290(2):209-15. Review.

Frisen J, Yates PA, McLaughlin T, Friedman GC, O'Leary DD, Barbacid M. 1998
Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system.
Neuron. Feb;20(2):235-43.

Fujiwara A, Ohozone Y, Naito J. 2000
The developmental study on lamination of the optic tectum in relation to the retinotectal projection in chicks and chick embryos.
J Vet Med Sci. May;62(5):511-6.

Gale NW, Yancopoulos GD. 1997
Ephrins and their receptors: a repulsive topic?
Cell Tissue Res. Nov;290(2):227-41. Review.

Geisbrecht BV, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ. 2003
Netrin binds discrete subdomains of DCC and UNC5 and mediates interactions between DCC and heparin.
J Biol Chem. Aug 29;278(35):32561-8. Epub 2003 Jun 16.

Gierer A. 1981

Development of projections between areas of the nervous system.
Biol Cybernet. 42, 69-78

Goodman CS. 1996

Mechanisms and molecules that control growth cone guidance.
Annu Rev Neurosci.;19:341-77. Review.

Gomez TM, Spitzer NC. 1999

In vivo regulation of axon extension and pathfinding by growth-cone calcium transients.
Nature. Jan 28;397(6717):350-5.

Guan W, Condic ML. 2003

Characterization of Netrin-1, Neogenin and cUNC-5H3 expression during chick dorsal root ganglia development.
Gene Expr Patterns. Jun;3(3):369-73.

Hall A. 1994

Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton.
Annu Rev Cell Biol.;10:31-54. Review.

Hall A. 1998

Rho GTPases and the actin cytoskeleton.
Science. Jan 23;279(5350):509-14. Review.

Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K. 1998

Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components.
J Cell Biol. May 18;141(4):929-42.

Harris R, Sabatelli LM, Seeger MA. 1996

Guidance cues at the Drosophila CNS midline: identification and characterization of two Drosophila Netrin/UNC-6 homologs.
Neuron. Aug;17(2):217-28.

Haug LS, Jensen V, Hvalby O, Walaas SI, Ostvold AC. 1999

Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ.
J Biol Chem. Mar 12;274(11):7467-73.

Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH, Stern BD. 1987

Genetics of cell and axon migrations in Caenorhabditis elegans.
Development. Jul;100(3):365-82. Review.

Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. 1990

The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans.
Neuron. Jan;4(1):61-85.

6. Literatur

- Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R. 1996
Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system.
Cell. Jul 12;86(1):35-46.
- Holland SJ, Peles E, Pawson T, Schlessinger J. 1998
Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta.
Curr Opin Neurobiol. Feb;8(1):117-27. Review.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. 1999
A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion.
Cell. Jun 25;97(7):927-41.
- Hong K, Nishiyama M, Henley J, Tessier-Lavigne M, Poo M. 2000
Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1.
Nature. Jan 6;403(6765):93-8.
- Hornberger MR. 1999
Die retinotektale Projektion: Charakterisierung von Mitgliedern der Eph-Familie hinsichtlich der axonalen Lenkung.
Dissertation, Universität Tübingen, Fakultät für Biologie.
- Hornberger MR, Dutting D, Ciossek T, Yamada T, Handwerker C, Lang S, Weth F, Huf J, Wessel R, Logan C, Tanaka H, Drescher U. 1999
Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons.
Neuron. Apr;22(4):731-42.
- Hortsch M. 1996
The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks.
Neuron. Oct;17(4):587-93. Review.
- Huber AB, Kolodkin AL, Ginty DD, Cloutier JF. 2003
Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance.
Annu Rev Neurosci.;26:509-63. Epub 2003 Mar 28.
- Isbister CM, Tsai A, Wong ST, Kolodkin AL, O'Connor TP. 1999
Discrete roles for secreted and transmembrane semaphorins in neuronal growth cone guidance in vivo.
Development. May;126(9):2007-19.
- Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM. 1992
UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans.
Neuron. Nov;9(5):873-81.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. 1996
Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor.
Cell. Oct 18;87(2):175-85.

- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. 1994
Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord.
Cell. Aug 12;78(3):425-35.
- Kenwrick S, Doherty P. 1998
Neural cell adhesion molecule L1: relating disease to function.
Bioessays. Aug;20(8):668-75. Review.
- Klostermann A, Lohrum M, Adams RH, Puschel AW. 1998
The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization.
J Biol Chem. Mar 27;273(13):7326-31.
- Koppel AM, Feiner L, Kobayashi H, Raper JA. 1997
A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members.
Neuron. Sep;19(3):531-7.
- Koppel AM, Raper JA. 1998
Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity.
J Biol Chem. Jun 19;273(25):15708-13.
- Kolodkin AL, Matthes DJ, O'Connor TP, Patel NH, Admon A, Bentley D, Goodman CS. 1992
Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo.
Neuron. Nov;9(5):831-45.
- Labrador JP, Brambilla R, Klein R. 1997
The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling.
EMBO J. Jul 1;16(13):3889-97.
- Laemmli UK. 1970
Nature. 227;680
- Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J. 1996
Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes.
EMBO J. Feb 1;15(3):510-9.
- Lauderdale JD, Davis NM, Kuwada JY. 1997
Axon tracts correlate with netrin-1a expression in the zebrafish embryo.
Mol Cell Neurosci.;9(4):293-313.
- LaVail JH, Gowan WM. 1971a
The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development.
Brain Res. May 21;28(3):391-419.

6. Literatur

- LaVail JH, Cowan WM. 1971b
The development of the chick optic tectum. II. Autoradiographic studies.
Brain Res. May 21;28(3):421-41.
- Lee GF, Burrows GG, Lebert MR, Dutton DP, Hazelbauer GL. 1994
Deducing the organization of a transmembrane domain by disulfide crosslinking.
J Biol Chem. Nov 25;269(47):29920-7.
- Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. 1997
Vertebrate homologues of C. elegans UNC-5 are candidate netrin receptors.
Nature. Apr 24;386(6627):833-8.
- Livesey FJ, Hunt SP. 1997
Netrin and netrin receptor expression in the embryonic mammalian nervous system suggests roles in retinal, striatal, nigral, and cerebellar development.
Mol Cell Neurosci.;8(6):417-29.
- Lodish H *et al.* 2000
Molecular cell biology - 4th edition.
ISBN: 0-7167-3136-3. W. H. Freeman and Company.
- Lottspeich F, Zorbas H. 1998
Bioanalytik
ISBN: 3-8274-0041-4. SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG
- MacLennan AJ, McLaurin DL, Marks L, Vinson EN, Pfeifer M, Szulc SV, Heaton MB, Lee N. 1997
Immunohistochemical localization of netrin-1 in the embryonic chick nervous system.
J Neurosci. Jul 15;17(14):5466-79.
- Martin GR, Timpl R. 1987
Laminin and other basement membrane components.
Annu Rev Cell Biol.;3:57-85. Review.
- Mellitzer G, Xu Q, Wilkinson DG. 2000
Control of cell behaviour by signalling through Eph receptors and ephrins.
Curr Opin Neurobiol. Jun;10(3):400-8. Review.
- Mey J, Thanos S. 2000
Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis.
Brain Res Brain Res Rev. Apr;32(2-3):343-79. Review.
- Meyer SU, Henke-Fahle S. 1995
Antibodies against the T61 antigen inhibit neuronal migration in the chick optic tectum.
Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 21;92(24):11150-4.
- Meyerhardt JA, Look AT, Bigner SH, Fearon ER. 1997
Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene.
Oncogene. Mar 13;14(10):1129-36.

- Menzel P, Valencia F, Godement P, Dodelet VC, Pasquale EB. 2001
Ephrin-A6, a New Ligand for EphA Receptors in the Developing Visual System.
Dev Biol. Feb 1;230(1):74-88.
- Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne M, Poo MM. 1997
cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1.
Neuron. Dec;19(6):1225-35.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. 1996
Genetic analysis of Netrin genes in Drosophila: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons.
Neuron. Aug;17(2):203-15.
- Monnier PM, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK. 2002
RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons.
Nature. Sept 26;419(6905):392-5.
- Monschau B, Kremoser C, Ohta K, Tanaka H, Kaneko T, Yamada T, Handwerker C, Hornberger MR, Loschinger J, Pasquale EB, Siever DA, Verderame MF, Muller BK, Bonhoeffer F, Drescher U. 1997
Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons.
EMBO J. Mar 17;16(6):1258-67.
- Mueller BK. 1997
RGM, a repulsive guidance molecule, is involved in retinal axon guidance in vitro
in Molecular Basis of Axon Growth and Nerve Pattern Formation. Edited by H. Fujisawa. Japan Scientific Societies Press. 215 – 229.
- Mueller BK. 1999
Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding.
Annu Rev Neurosci.;22:351-88. Review.
- Mueller BK, Ledig MM, Wahl S. 2000
The receptor tyrosine phosphatase CRYPalpha affects growth cone morphology.
J Neurobiol. Aug;44(2):204-18. Review.
- Müller B, Stahl B, Bonhoeffer F. 1990
In vitro experiments on axonal guidance and growth-cone collapse.
J Exp Biol. Oct;153:29-46. Review.
- Müller BK, Bonhoeffer F, Drescher U. 1996
Novel gene families involved in neural pathfinding.
Curr Opin Genet Dev. Aug;6(4):469-74. Review.
- Müller BK, Jay DG, Bonhoeffer F. 1996
Chromophore-assisted laser inactivation of a repulsive axonal guidance molecule.
Curr Biol. Nov 1;6(11):1497-502.

6. Literatur

- Nakamoto M, Cheng HJ, Friedman GC, McLaughlin T, Hansen MJ, Yoon CH, O'Leary DD, Flanagan JG. 1996
Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo.
Cell. Sep 6;86(5):755-66.
- Nakamoto M. 2000
Eph receptors and ephrins.
Int J Biochem Cell Biol. Jan;32(1):7-12. Review.
- Nobes CD, Hall A. 1995
Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.
Cell. Apr 7;81(1):53-62.
- O'Connor KL, Shaw LM, Mercurio AM. 1998
Release of cAMP gating by the alpha6beta4 integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells.
J Cell Biol. Dec 14;143(6):1749-60.
- Orioli D, Henkemeyer M, Lemke G, Klein R, Pawson T. 1996
Sek4 and Nuk receptors cooperate in guidance of commissural axons and in palate formation.
EMBO J. Nov 15;15(22):6035-49.
- Pandey A, Liu X, Dixon JE, Di Fiore PP, Dixit VM. 1996
Direct association between the Ret receptor tyrosine kinase and the Src homology 2-containing adapter protein Grb7.
J Biol Chem. May 3;271(18):10607-10.
- Park S, Frisen J, Barbacid M. 1997
Aberrant axonal projections in mice lacking EphA8 (Eek) tyrosine protein kinase receptors.
EMBO J. Jun 2;16(11):3106-14.
- Petersen OH, Cancela JM. 2000
Attraction or repulsion by local Ca(2+) signals.
Curr Biol. Apr 20;10(8):R311-4. Review.
- Placzek M, Tessier-Lavigne M, Jessell T, Dodd J. 1990
Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant.
Development. Sep;110(1):19-30.
- Przyborski SA, Knowles BB, Ackerman SL. 1998
Embryonic phenotype of Unc5h3 mutant mice suggests chemorepulsion during the formation of the rostral cerebellar boundary.
Development. Jan;125(1):41-50.
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM. 2003
Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule.
in preparation

- Raper JA, Kapfhammer JP. 1990
The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain.
Neuron. Jan;4(1):21-9.
- Raper JA. 2000
Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates.
Curr Opin Neurobiol. Feb;10(1):88-94. Review.
- Renart J *et al.* 1979
Proc Nat Acad Sci. 76, 3116
- Ridley AJ, Hall A. 1992
The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.
Cell. Aug 7;70(3):389-99.
- Rohm B, Ottemeyer A, Lohrum M, Puschel AW. 2000
Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A.
Mech Dev. May;93(1-2):95-104.
- Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, Mann DM, Sunshine J. 1988
The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions.
Science. Apr 1;240(4848):53-7. Review.
- Rutishauser U. 1998
Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity.
J Cell Biochem. Sep 1;70(3):304-12. Review.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science. Dec 20;230(4732):1350-4.
- Scatchard G. 1949
The attractions of protein for small molecules and ions.
Ann NY Acad Sci. 51, 660-672
- Schlessinger J, Ullrich A. 1992
Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases.
Neuron. Sep;9(3):383-91. Review.
- Semaphorin Nomenclature Committee. 1999
Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins.
Cell. May 28;97(5):551-2.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. 1994
The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6.
Cell. Aug 12;78(3):409-24.

6. Literatur

- Simons K, Ikonen E. 1997
Functional rafts in cell membranes.
Nature. Jun 5;387(6633):569-72. Review.
- Sonderegger P. 1997
Axonin-1 and NgCAM as "recognition" components of the pathway sensor apparatus of growth cones: a synopsis.
Cell Tissue Res. Nov;290(2):429-39. Review.
- Song HJ, Ming GL, Poo MM. 1997
cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones.
Nature. Jul 17;388(6639):275-9.
- Song H, Ming G, He Z, Lehmann M, McKerracher L, Tessier-Lavigne M, Poo M. 1998
Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides.
Science. Sep 4;281(5382):1515-8.
- Song HJ, Poo MM. 1999
Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors.
Curr Opin Neurobiol. Jun;9(3):355-63. Review.
- Sperry RW. 1963
Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections.
Proc Natl Acad Sci U S A. Oct;50:703-10.
- Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L. 2003
Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis.
Dev Cell. Mar;4(3):371-82.
- Stahl B, Müller B, von Boxberg Y, Cox EC, Bonhoeffer F. 1990
Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system.
Neuron. Nov;5(5):735-43.
- Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M. 2001
Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation.
Science. Mar 9;291(5510):1976-82.
- Suter DM, Forscher P. 2000
Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance.
J Neurobiol. Aug;44(2):97-113. Review.
- Tashiro K, Sephel GC, Greatorex D, Sasaki M, Shirashi N, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y. 1991
The RGD containing site of the mouse laminin A chain is active for cell attachment, spreading, migration and neurite outgrowth.
J Cell Physiol. Mar;146(3):451-9.

- Thanos S, Mey J. 2001
Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance.
Brain Res Brain Res Rev. Jul;35(3):205-45. Review.
- Tear G. 1999
Neuronal guidance. A genetic perspective.
Trends Genet. Mar;15(3):113-8. Review.
- Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessell TM. 1988
Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system.
Nature. Dec 22-29;336(6201):775-8.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. 1996
The molecular biology of axon guidance.
Science. Nov 15;274(5290):1123-33. Review.
- Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O, Romeo PH. 2002
A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response.
Nat Immunol. May;3(5):477-82. Erratum in: Nat Immunol. 2003 Apr;4(4):394..
- Towbin H *et al.* 1979
Proc Nat Acad Sci. 76, 4350
- Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM Jr. 2002
Lipid rafts in neuronal signaling and function.
Trends Neurosci. Aug;25(8):412-7. Review.
- Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ. 1994
Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer.
J Cell Biol. Dec;127(6 Pt 2):2009-20.
- Varma R, Mayor S. 1998
GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface.
Nature. Aug 20;394(6695):798-801.
- von Boxberg Y, Deiss S, Schwarz U. 1993
Guidance and topographic stabilization of nasal chick retinal axons on target-derived components in vitro.
Neuron. Mar;10(3):345-57.
- Wadsworth WG, Bhatt H, Hedgecock EM. 1996
Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in C. elegans.
Neuron. Jan;16(1):35-46.
- Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK. 2000
Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase.
J Cell Biol. Apr 17;149(2):263-70.

6. Literatur

Walsh FS, Doherty P. 1997

Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance.

Annu Rev Cell Dev Biol.;13:425-56. Review.

Walter J, Henke-Fahle S, Bonhoeffer F. 1987a

Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons.

Development. Dec;101(4):909-13.

Walter J, Kern-Veits B, Huf J, Stolze B, Bonhoeffer F. 1987b

Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro.

Development. Dec;101(4):685-96.

Walter J, Muller B, Bonhoeffer F. 1990

Axonal guidance by an avoidance mechanism.

J Physiol (Paris). 84(1):104-10. Review.

Wang H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Tessier-Lavigne M. 1999

Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors.

J Neurosci. Jun 15;19(12):4938-47.

Watanabe C, Kumanogoh A, Shi W, Suzuki K, Yamada S, Okabe M, Yoshida K, Kikutani H. 2001

Enhanced immune responses in transgenic mice expressing a truncated form of the lymphocyte semaphorin CD100.

J Immunol. Oct 15;167(8):4321-8.

Wong JT, Yu WT, O'Connor TP. 1997

Transmembrane grasshopper Semaphorin I promotes axon outgrowth in vivo.

Development. Sep;124(18):3597-607.

Xia Z, Storm DR. 1997

Calmodulin-regulated adenylyl cyclases and neuromodulation.

Curr Opin Neurobiol. Jun;7(3):391-6. Review.

Xu Q, Alldus G, Holder N, Wilkinson DG. 1995

*Expression of truncated *Sek-1* receptor tyrosine kinase disrupts the segmental restriction of gene expression in the *Xenopus* and zebrafish hindbrain.*

Development. Dec;121(12):4005-16.

Xu Q, Alldus G, Macdonald R, Wilkinson DG, Holder N. 1996

*Function of the *Eph*-related kinase *rtkl* in patterning of the zebrafish forebrain.*

Nature. May 23;381(6580):319-22.

Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S. 2003

Signalling and crosstalk of Rho GTPases in mediating axon guidance.

Nat Cell Biol. Jan;5(1):38-45.

Anhang**Verzeichnis der Abkürzungen**

a	anterior
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
cAMP	<i>3', 5' cyclic adenosine monophosphate</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cGMP	<i>3', 5' cyclic guanosine monophosphate</i>
CALI	<i>chromophore assisted laser inactivation</i>
Ctrl	<i>control</i>
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FN	Fibronectin
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	<i>guanosine diphosphate</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
Ig	Immunglobulin
INL	<i>inner nuclear layer</i>
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphat
IPL	<i>inner plexiform layer</i>
k _D	Dissoziationskonstante
p	posterior
PI-PLC	Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G
PSA	<i>polysialic acid</i>
MAG	<i>myelin-associated glycoprotein</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
ONL	<i>outer nuclear layer</i>
OPL	<i>outer plexiform layer</i>
RAP	<i>receptor affinity probe</i>
RGC	<i>retinal ganglion cell</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPTP	Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SGFS	<i>Stratum griseum et fibrosum superficiale</i>
SO	<i>Stratum Opticum</i>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um denen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Bernhard K. Müller für die Stellung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, vor allem aber für sein großes persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. J. Schmidt möchte ich für seine Bereitschaft, die Vertretung der Arbeit gegenüber der Fakultät zu übernehmen, danken.

Ich danke Dr. Martin Hornberger und Dr. Philippe Monnier für die nette Zusammenarbeit und Betreuung im Labor, sowie Dr. Alfred Stiefel für seine wertvollen Tipps.

Renate Nordin danke ich insbesondere für die exzellente technische Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei den Kooperationspartnern Prof. Dr. Stephen Strittmatter und Prof. Dr. Thomas Skutella für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken.

Der Firma Migragen danke ich für die Unterstützung der Arbeit, sowie den Kollegen der Firma Migragen für die gute Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken für ihre ständige Unterstützung und Ermunterung sowie ihr großes Interesse an meiner Arbeit.

Lebenslauf

Lutz A. Deitinghoff

Geburtsdatum: 18.11.1973
 Geburtsort: Frankfurt/ M. - Höchst
 Nationalität: Deutsch
 Familienstand: verheiratet, ein Kind

Ausbildung

04/2001 - 09/2003 Promotionsstudiengang Biologie an der Eberhard Karls Universität Tübingen
 01/2001 - 09/2003 Migragen AG, Spemannstrasse 34, 72076 Tübingen
 07/2000 - 12/2000 Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Arbeitsgruppe von PD Dr. B. K. Mueller, Abteilung 1 (Prof. Dr. F. Bonhoeffer)
 10/1997 - 03/2001 Diplomstudiengang Biochemie an der Eberhard Karls Universität Tübingen; Diplom: 02.03.2001, Vordiplom: 13.10.1998
 10/1994 - 09/1997 Diplomstudiengang Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; Vordiplom: 13.10.1997
 07/1984 - 06/1993 Gymnasium, Bischof-Neumann-Schule, Königstein;
 Allgemeine Hochschulreife: 14.06.1993
 07/1980 - 06/1984 Grundschule, Pestalozzischule, Kelkheim

Wehrdienst

07/1993 - 06/1994 Grundwehrdienst

Publikationen

- Deitinghoff L. 2001
Lokalisation von RGM (repulsive guidance molecule) und seinem Rezeptor im retinotectalen System des Hühnerembryos.
 Diplomarbeit, Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie.
- Monnier PM, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK. 2002
RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons.
 Nature. Sept 26;419(6905):392-5.
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, *et al.*. 2003
Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule.
 in Vorbereitung

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Deitinghoff, Lutz Alexander

Danziger Straße 21

D-72072 Tübingen