

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Rolle von E-Cadherin an zentralen GABAergen Synapsen in primär kultivierten kortikalen Neuronen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Roman Ewert

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Gottmann

Koreferent: Prof. Dr. Schnitzler

Danksagung

Für die erfolgreiche Durchführung der vorliegenden Arbeit zeichnen sich viele Menschen aus unterschiedlichen Bereichen verantwortlich. Gerne würde ich jedem persönlich danken, was aber leider den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde. Deshalb möchte ich zumindest einige Leute besonders herausstellen, weil sie in besonderem Maße an meiner Arbeit beteiligt waren.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Kurt Gottmann danken, der meine Arbeitsgruppe im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie leitete, und mein erster Ansprechpartner war. Für die Auswahl eines für mich während des Semesters zu bewältigenden Themas, sowie die zahlreichen Subgroup-Meetings und Besprechungen gebührt ihm Dank. Durch die enge Supervision fühlte ich mich gut betreut. Probleme wurden identifiziert und ausgeräumt, sowie Fragen in angemessenem Zeitrahmen erörtert. Schließlich möchte ich mich noch für das Vertrauen bedanken, dass ich das Projekt wirklich semesterbegleitend zu Ende bringen könne.

Weiterhin muss ich mich herzlich bedanken bei Dr. Gesche Born, die maßgeblich zu meinem Erfolg beitrug, obwohl sie nur vergleichsweise kurz in der Arbeitsgruppe gastierte. Ohne ihr Protokoll zur Zellkultur von HEK/TSA-Zellen auf Glas-Coverslips wäre ich noch sehr viel länger nicht von der Stelle gekommen mit meinen Experimenten. Sie steuerte den letzten Baustein dazu bei, dass ich endlich Ergebnisse produzieren konnte.

Dr. Andreas Fiederling arbeitete mich als seinen Nachfolger in die Materie und die Neuronenpräparation ein und stand mir auch danach mit Rat und Tat zur Seite, wann immer ich es brauchte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Adriana Stan, die mich auf freundliche und kompetente Weise bei der Auswahl von Antikörpern und entsprechenden Färbe-Protokollen unterstützte und immer ein offenes Ohr für mich hatte, wenn es bei mir mal wieder nicht funktionieren wollte.

Dr. Aksana Andreyeva steuerte gegen Ende meiner Zeit im Labor Western Blots zur Vervollständigung dieser Arbeit bei, obwohl die von mir gelieferten Kulturen wirklich nicht mehr die besten waren. Martina Bohndorf unterstützte mich ebenfalls bei meiner Arbeit im Labor und fügte die PCR und Gelelektrophoresen dieser Arbeit bei.

Für das herzliche Klima möchte ich weiterhin Dipl.-Biol. Bernd van Steegen, Dipl.-Biol. Bernhard Fleischer, Dipl.-Biol. Kim Pielarski, Dipl.-Biol. Jessica Johnen und Dipl.-Biol. Jörg Müller danken.

Für die Fortführung des Projekts wünsche ich dem gesamten Team viel Erfolg.

Zusammenfassung

Klassischen Cadherinen aus der Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle werden Funktionen in der Formation von Synapsen, synaptischer Übertragung und synaptischer Plastizität zugeschrieben. Fragestellungen zu diesem Komplex wurden bisher hauptsächlich anhand von N-Cadherin an glutamatergen Synapsen untersucht[46]. Andere Cadherine, die auch an zentralen Synapsen exprimiert werden können, blieben dabei jedoch weitestgehend unberücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden kortikale Neurone von 17 Tage alten Mausfeten (Stadium E17) kultiviert, und ein postpartaler konditionaler Knockout durch das Cre-Lox-System herbeigeführt. Die Mauslinie trug dabei als Voraussetzung homozygot "gefloxte" E-Cadherin-Allele, die zunächst die Entwicklung des Organismus nicht beeinträchtigten. Ein konstitutioneller Knockout hätte im Gegensatz dazu zu Reifungsstörungen bis hin zu Aborten der Feten geführt.

Nach der Transfektion und anschließenden Expression des EGFP-Cre-Fusionsproteins wurde der Knockout schließlich hergestellt. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die Organismen sich bis zum Zeitpunkt der Experimente korrekt und normal entwickelten. Im Anschluss konnte an einzelnen Neuronen der sonst unmögliche E-Cadherin Knockout dennoch untersucht werden.

Um also den Einfluss des Knockouts auf die Zahl der Synapsen zu untersuchen, wurde zunächst an DIV4 mit einem Vektor für das Knockout induzierende EGFP-Cre, beziehungsweise als Kontrolle mit EGFP, transfiziert. Folgend wurden immunzytochemische Antikörperfärbungen spezifischer Vesikelmarker durchgeführt: Vesikulärer GABA- (VGAT) versus Glutamat- (VGLUT1) Transporter, jeweils an DIV7 und DIV14.

Es zeigte sich ein reduzierter Anstieg der Dichte dendritischer GABAerger Synapsen nach E-Cadherin Knockout an den betreffenden Neuronen: An DIV7 war der quantitative Unterschied noch nicht signifikant nachweisbar, wandelte sich aber im Lauf der folgenden 7 Tage in eine hohe Signifikanz. Dennoch kam es, wenn auch träger als in der Kontrollgruppe, zu einer gewissen Neuausprägung GABAerger Synapsen. Der Knockout beeinträchtigte also *nicht global* deren Neubildung. Die glutamatergen Synapsen blieben von dem Effekt vollständig unberührt.

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass E-Cadherin eine wichtige Rolle in der Formation eines speziellen Subsets GABAerger Synapsen auf funktioneller Ebene in kortikalen Neuronen spielt. Weitere elektrophysiologische Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe unterstützen dieses Modell[25].

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Zusammenfassung	iv
1 Einleitung	1
1.1 Das GABAerge System	1
1.1.1 Die GABAerge Synapse	1
1.1.2 Der Vesikuläre GABA Transporter	5
1.2 Die Glutamaterge Synapse	5
1.2.1 Der Vesikuläre Glutamat Transporter 1	6
1.2.2 Langzeitpotenzierung	6
1.3 Zelladhäsionsmoleküle	8
1.3.1 Cadherine	8
1.3.2 Klassische Cadherine	8
1.3.3 E-Cadherin	9
1.4 Konditionaler Knockout	11
1.4.1 Das Cre-Lox System	11
1.4.2 loxP Sites	12
1.4.3 Die Cre-Rekombinase	12
1.5 Ziele der medizinischen Dissertation	12
2 Materialien und Methoden	14
2.1 Lösungen zur Zellkultur von Neuronen	14
2.1.1 Neurobasalmedium	14
2.1.2 BME Basalmedium	14
2.1.3 Polyornithin in Boratpuffer	14
2.1.4 Weitere zur Zellkultur notwendige Chemikalien	15
2.2 Die gentechnisch veränderte Mauslinie EcadFlox	15
2.3 Herstellung von neuronalen Massenkulturen	16
2.3.1 Vorbehandlung der Coverslips	16
2.3.2 Poly-L-Ornithin beschichtete Coverslips	16
2.3.3 Präparation der Mausföten an E17	17
2.4 Transfektion	18
2.4.1 Transfektionschemikalie - Lipofectamine 2000	18

2.4.2	Vektoren - pEGFP-N1	19
2.4.3	Vektoren - pBS598 EF1alpha-EGFPcre	19
2.4.4	Vektoren - pDsRed2-N1	20
2.4.5	Transfektionsvorgehensweise	20
2.5	Antikörperfärbung	23
2.5.1	Antikörper - anti VGLUT1	23
2.5.2	Antikörper - anti VGAT (zytoplasmatische Domäne)	23
2.5.3	Sekundärer Antikörper	23
2.5.4	Vorgehensweise der Antikörperfärbung	23
2.6	Fluoreszenzmikroskopische Datensammlung	24
2.6.1	Bildgewinnung	24
2.6.2	Postprozessierung in ImageJ	25
2.6.3	Automatisierung	27
2.7	Auswertung und Statistik	30
2.7.1	Quantifizierung von somatischen Synapsen	31
2.7.2	Quantifizierung von dendritischen Synapsen	32
2.7.3	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Genotypisierung der EcadFlox Mäusföten	34
3.2	Ermittlung des Vektorenverhältnisses zur Kotransfektion	36
3.3	Somatische Expression	39
3.3.1	VGLUT1 positive Synapsen am Soma	39
3.3.2	VGAT positive Synapsen am Soma	46
3.4	Dendritische Expression	51
3.4.1	VGLUT1 positive Synapsen an den Dendriten	51
3.4.2	VGAT positive Synapsen an den Dendriten	54
4	Diskussion	58
4.1	Transfektion kultivierter kortikaler Neurone	58
4.2	Die Expression des CreGFP Protein in kortikalen Neuronen	59
4.3	Konditionaler E-Cadherin Knockout in kortikalen Neuronen	60
4.4	Auswirkungen des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf Synapsen	62
4.5	Ausblick	66
A	Tabellen	69
B	Abkürzungen	72
	Literaturverzeichnis	74
	Eidesstattliche Versicherung	82

1 Einleitung

1.1 Das GABAerge System

γ -Aminobuttersäure (*Gamma AminoButyric Acid*, GABA) ist chemisch gesehen eine Aminosäure, aber unterscheidet sich von den proteinogenen Aminosäuren in der γ -Carboxylierung, weshalb sie häufig von diesen getrennt geführt wird. Sie ist der wichtigste inhibitorische neuronale Transmitter im Zentralnervensystem von Säugetieren und wird an etwa 20% der kortikalen Synapsen ausgeschüttet[21]. Dabei gibt es einen Wechsel von exzitatorischer Wirkung in der Entwicklung und der wichtigen inhibitorischen Funktion im adulten Gehirn[54].

Weitere zugeschriebene Funktionen sind die Depolarisation und damit Regulierung von neuronalen Progenitorzellen in der Entwicklung[56][36], der Migration[6], Differenzierung [4][28] und Neuritenelongation[59], sowie der Bildung von Synapsen[8].

GABAerge Synapsen werden von den Interneuronen ausgebildet[74], die je nach Morphologie und spezifischer Funktion unterschiedliche Namen bekommen haben: Korbzellen, kortikale Martinottizellen, Kandelaberzellen, Double-bouquet Zellen, Bitufted Zellen, oder neurogliaforme Zellen.

Sie modifizieren die ankommenden Informationen durch das Zusammenwirken mit anderen inhibitorischen Neuronen und ihren exzitatorischen Gegenstücken. Erst dadurch wird eine differenzierte Integration und die Ausbildung von komplex regulierten Neuronenkreisen und auch die wichtige Gedächtnisbildung möglich.

Die Lokalisation der Synapsen spielt dabei eine wichtige Rolle: Proximal oder distal, in verschiedener Expressionsstärke, dabei abhängig von der subzellulären Organisation.

1.1.1 Die GABAerge Synapse

Synapsen, die GABA ausschütten, gehören in die Klasse der chemischen Synapsen. Hierbei wird das ankommende elektrische Potential in der Präsynapse in ein chemisches Signal in Form von Neurotransmittern umgewandelt und an der Postsynapse durch

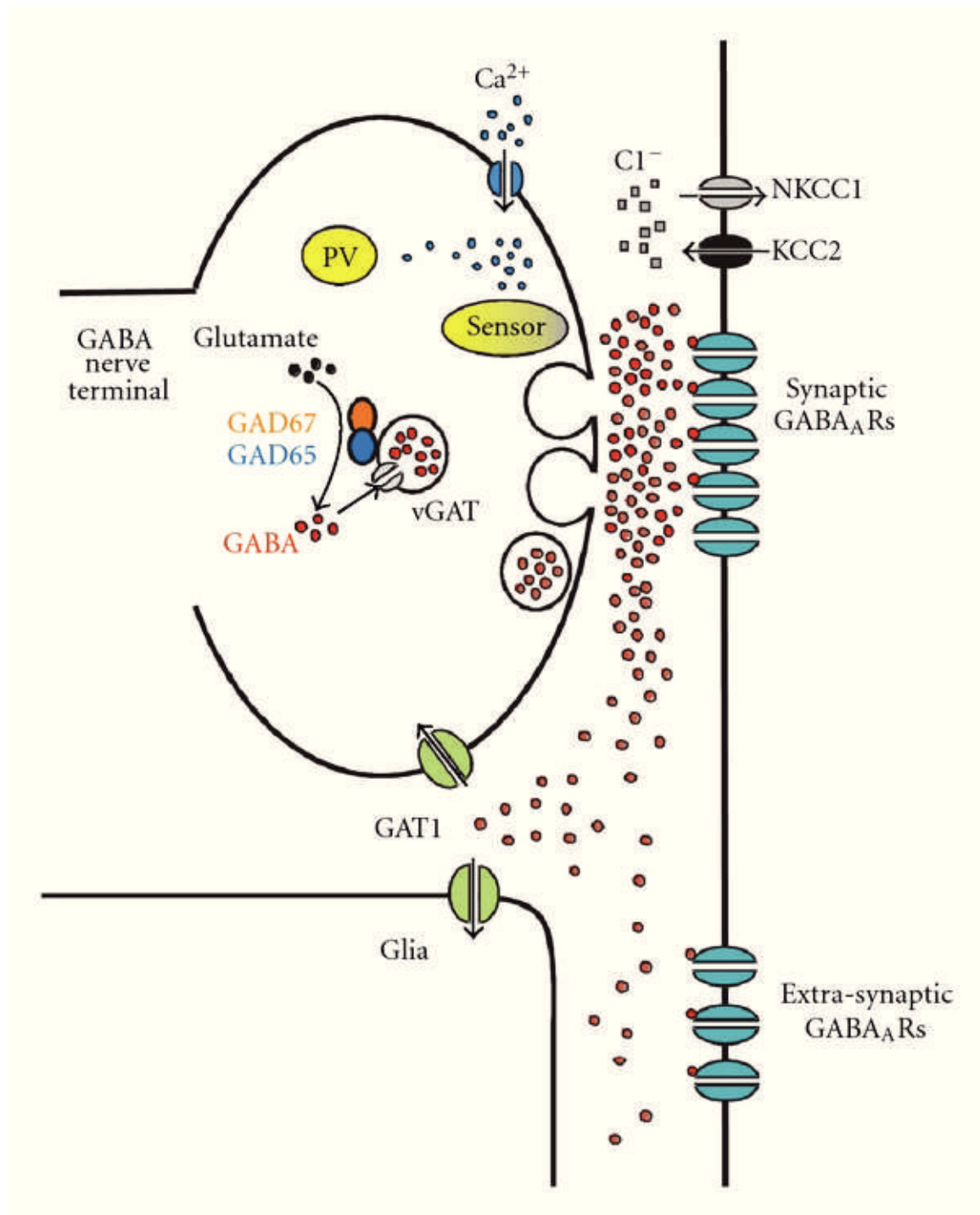


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Parvalbumin-positiven GABAergen Synapsen-
 terminals, kurz nachdem ein Aktionspotential Ca^{2+} -abhängig zu einer GABA
 Freisetzung geführt hat; vGAT: Vesikulärer GABA Transporter, GAD65/67:
 Glutamatdecarboxylase 65/67, GAT1: GABA Transporter 1, NKCC1: Na^+ - K^+ -
 Cl^- -Kotransporter 1, KCC2: K^+ - Cl^- -Symporter 2, PV: Parvalbumin; *Gonzalez-
 Burgos et al.*[30]

Rezeptorbindung neu generiert (Abb. 1.1). Der Abstand des synaptischen Spalts beträgt etwa 20nm.

Präsynaptisch wird GABA aus L-Glutamat hergestellt; das dafür notwendige Enzym ist die L-Glutamat-Decarboxylase (GAD), die mit Pyridoxalphosphat (aktive Form des Vitamin B6) als Cofaktor zu einer Decarboxylierung des Glutamat an C1 führt[71]. Die für das ZNS wichtigen Isoformen sind dabei die GAD1 (GAD₆₇, Molekulargewicht 67kDa) und GAD2 (GAD₆₅, Molekulargewicht 65kDa)[23].

Das dafür notwendige Glutamat kann dabei aus dem Citratzyklus durch α -Ketoglutarat gewonnen werden (durch die Glutamat Dehydrogenase, GDH); oder durch Desaminierung von Glutamin durch die Glutaminase.

Über den Vesikulären GABA Transporter (VGAT) gelangt das so produzierte GABA in durch Protonenpumpen angesäuerte synaptische Vesikel und wird dort für den Einsatz vorgehalten. Ein Teil der Vesikel wird bei einem Aktionspotential in die aktive Zone der Synapse transportiert und andockt; an diesem Ort ist eine Konzentration von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen zu finden, wie auch weitere Moleküle, die für die Exozytose der Vesikel wichtig sind, zum Beispiel Syntaxin, UNC-13[35], Munc18-1[31] und Rab3a[18].

Es folgt das sogenannte Priming zur Bereitstellung schnell ausschüttbarer Vesikel. Dabei formiert sich ein SNARE Kernkomplex zwischen zuvor andocktem Vesikel und der präsynaptischen Membran. Dieser besteht aus Syntaxin, Synaptobrevin und SNAP-25[81]. Erst jetzt sind die Vesikel zu einer Freisetzung befähigt.

Dabei können die vorhandenen Vesikel in verschiedene Pools eingeteilt werden. Zunächst den Readily Releasable Pool, der die Summe an freisetzungskompetenten Vesikeln umfasst. Darüberhinaus der Recycling Pool, aus dem neue, geprimete Vesikel hervorgehen, und der selbst dabei aus einem Reserve Pool befüllt wird. Ein weiterer Pool ist der Resting Pool, in dem zu dem Zeitpunkt ruhende Vesikel enthalten sind (Abb. 1.2).

Gelangt ein Aktionspotential in die Präsynapse, werden in der Membran zunächst spannungsabhängige Kalzium-Kanäle geöffnet, die einen lokalen Kalzium-Ionen-Einstrom (Ca^{2+}) in das synaptische Terminal bewirken. Die Ionen interagieren mit dem SNARE Komplex, vor allem Synaptotagmin 1 und 2[29, 63]. Die Bindung von Ca^{2+} an die C2A Site vermittelt dabei die Exozytose, Bindung von Inositolpolyphosphaten (IP4, IP5, IP6) an die C2B Site eine Hemmung der Exozytose. Infolge dessen fusionieren Vesikel und präsynaptische Membran und es kommt zu einer Freisetzung des gespeicherten GABA.

Nach Überquerung des synaptischen Spaltes bindet es an die GABA-Rezeptoren der Postsynapse und löst dabei ein postsynaptisches Potential aus.

GABA_A und GABA_C Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle für Chlorid (Cl^-),

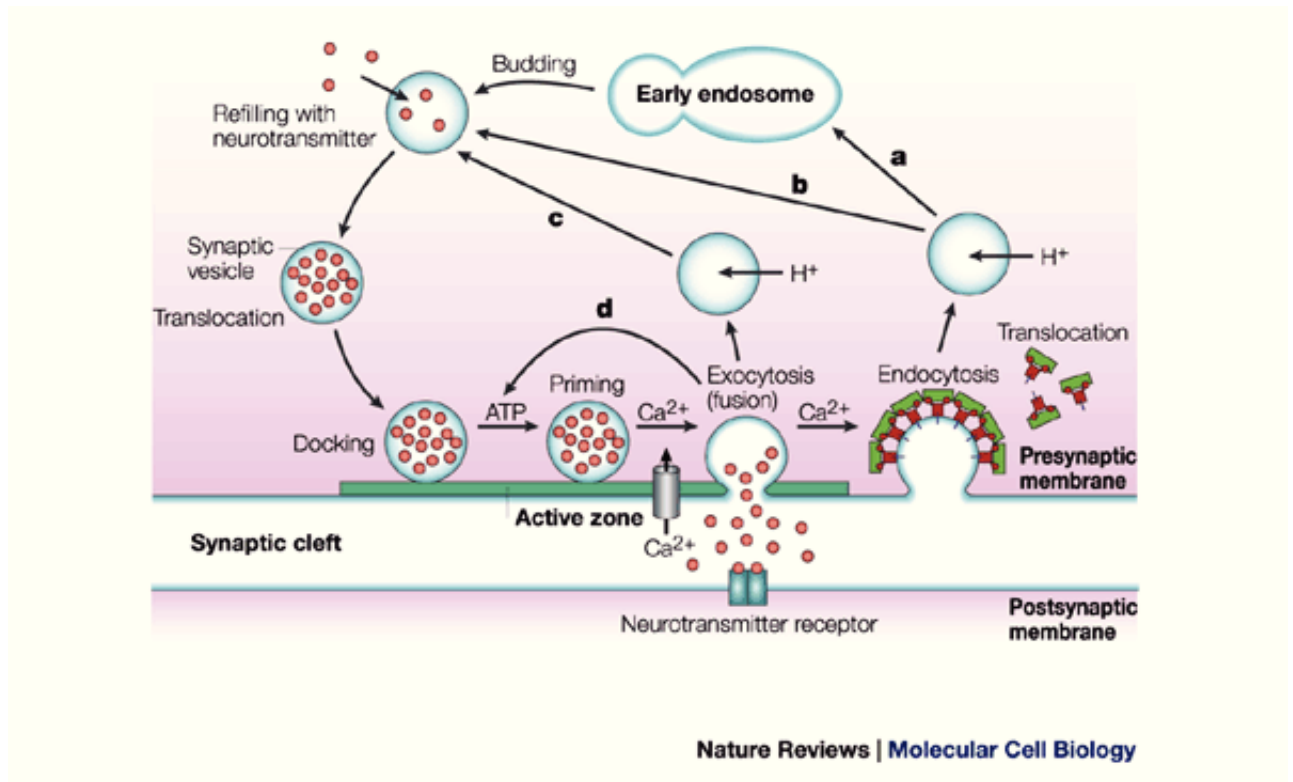


Abb. 1.2: **a** Synaptische Vesikel können komplett fusionieren, mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und mittels Clathrin Endozytose zurückgewonnen werden. Sie können dann über ein endosomales Kompartiment in den Kreislauf zurückgegeben werden. **b** Clathrin vermittelte Endozytose kann sofort von einer Wiederherstellung gefolgt sein, ohne die Passage durch die frühen Endosomen. **c** Alternativ müssen die synaptischen Vesikel nicht komplett mit der Zellmembran verschmelzen, sondern können schnell zurückgeholt und wieder aufgefüllt werden, nachdem sie ihre Neurotransmitter durch eine Fusionspore in der Membran freigesetzt haben. Der molekulare Mechanismus für dieses “Kiss-and-Run” Prinzip ist unbekannt. **d** Zuletzt kann ein “Kiss-and-Stay” Modus erfolgen. In diesem Fall verlassen die synaptischen Vesikel niemals die aktive Zone der Membran, sondern werden sofort nach dem Schluss der Fusionspore neu befüllt; Gundelfinger *et al.*[32]

sogenannte ionotrope Kanäle. Die GABA_B Rezeptoren werden ebenfalls ligandengesteuert aktiviert, führen jedoch zu einer G-Protein Aktivierung und über diesen Weg zu einer indirekt gekoppelten Öffnung von Ionenkanälen; sogenannte metabotrope Kanäle.

Nach einer gewissen Zeit nimmt die Astroglia das GABA aus dem synaptischen Spalt auf und wandelt es in ihren Mitochondrien mittels GABA Transaminase in Glutamat und Succinatsemialdehyd um. Das Glutamat wird durch die Glutamin Synthase in Glutamin umgewandelt und von den Astrozyten in das Neuron zurücktransportiert[80]. Damit ist der Kreis geschlossen und die synaptischen Vesikel können erneut beladen werden.

1.1.2 Der Vesikuläre GABA Transporter

Dieser Transporter ist in der Membran synaptischer Vesikel GABAerger Synapsen-terminals lokalisiert und übernimmt den Transport von GABA. Er besteht aus 10 Transmembrandomänen[62] und ist auf dem SLC32A Gen lokalisiert. Er scheint auch für den Transport von Glycin verantwortlich zu sein[17].

1.2 Die Glutamaterge Synapse

Glutamat ist eine der 20 proteinogenen Aminosäuren. Sie ist nicht essentiell und kann aus α -Ketoglutarat oder Glutamin hergestellt werden. Es ist der vorherrschende exzitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Säugetieren. Es vermittelt primär die schnelle synaptische Übertragung über Glutamat Rezeptoren vom AMPA Typ. Aber gerade die Menge unterschiedlicher Rezeptoren ist für die vielfältigen Funktionen von Glutamat Synapsen im Gehirn verantwortlich: Rezeptoren von AMPA-, NMDA-, Kainat-Typ, sowie metabotrope Rezeptoren, die mit der IP3 Kaskade assoziiert sind (Klasse 1 mGluR), oder dem cAMP Pathway (Klasse 2 und 3 mGluR).

Synaptische Vesikel halten das Glutamat in der Präsynapse vor, bis ein elektrischer Impuls die Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Membran anstößt. Hier kommt derselbe Mechanismus zum Tragen, wie bereits für die GABAergen Synapsen geschildert: SNARE-Komplex und Synaptotagmin I und II. So werden die Neurotransmitter in den präsynaptischen Spalt freigesetzt.

Auf der postsynaptischen Membran gibt es im Wesentlichen zwei Rezeptorklassen, die für die Funktion von Glutamat zuständig sind: AMPA/Kainat und NMDA-Rezeptoren. Das Glutamat bindet an diese, führt zu einem Ionen-Einstrom, und löst sich wieder. Danach wird es von den umliegenden Glia-Zellen, vor allem Astrozyten, resorbiert, und somit aus dem synaptischen Spalt eliminiert. Das Glutamat wird nun entweder präsynaptisch

neu synthetisiert, oder von den Gliazellen abgegeben, damit die Präsynapse es wieder aufnehmen kann.

Über die Vesikulären Glutamat Transporter 1 und 2 werden die synaptischen Vesikel beladen und sind so für eine erneute Freisetzung bereit.

1.2.1 Der Vesikuläre Glutamat Transporter 1

Dieser Transporter ist in der Membran synaptischer Vesikel glutamaterger Synapsen-terminals lokalisiert. Er wird codiert durch das SLC17A7 Gen[65, 1]. Der Transport ist abhängig von sowohl dem Natrium- als auch dem Kaliumgradienten; entweder wird dabei anorganisches Phosphat oder Glutamat ins Innere des Vesikels befördert[7].

1.2.2 Langzeitpotenzierung

Dicht assoziiert mit dem glutamatergen System sind die Langzeitpotenzierung (*LTP*, *Long term potentiation*) und Langzeitdepression (*LTD*, *Long term depression*), die die Grundlage für die Fähigkeit zu lernen darstellen.

LTP wurde von Terje Lømo 1966 das erste Mal beschrieben[55]. Sie findet hauptsächlich im Hippocampus statt, und spielt hier eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Informationen vom Kurz- ins Langzeitgedächtnis. Aber auch in anderen Hirnregionen findet sie statt; so auch im Cerebralen Kortex, dem Cerebellum und der Amygdala.

Je nach Alter des Organismus und Lokalisation unterscheidet sich der Mechanismus. Manche sind auf den NMDA Rezeptor angewiesen, andere auf spezifische mGluR[58].

Die Phasen der Langzeitpotenzierung sind dabei: Kurzzeitpotenzierung, frühe LTP, späte LTP[82]. Über die Kurzzeitpotenzierung ist relativ wenig bekannt. Die frühe und späte Langzeitpotenzierung jedoch laufen nach einem ähnlichen Schema ab: *Induktion* - der Prozess der LTP wird gestartet. *Aufrechterhaltung* - begonnene biochemische Vorgänge werden von der Zelle generalisiert und übernommen. *Expression* - die initiierten Veränderungen im Zellmetabolismus führen zu einer Änderung im Expressionsmuster auf Gen-Ebene der betroffenen Zellen und die LTP wird abgeschlossen.

Da die CA1 Hippocampus Neuronen der Prototyp für NMDA-abhängige LTP-Studien sind, soll hier nur auf deren Mechanismus eingegangen werden.

Zunächst binden an den tetrameren AMPA Rezeptor 2 Moleküle Glutamat, was zu dessen Aktivierung führt. Durch eine Konformationsänderung öffnet sich der Kanal und

Natrium-Ionen fließen entsprechend ihres Gradienten in die Zelle. Die resultierende Depolarisation der Zelle ist gering und nur auf die Konzentrationsgefälle der Ionenverteilungen zurückzuführen.

Nun kommt der NMDA Rezeptor ins Spiel, welcher ebenfalls ein Tetramer ist. Bei einer präsynaptischen Freisetzung von Glutamat kommt es auch hier zu einer Konformationsänderung und Öffnung des Kanals. Jedoch setzt sich sofort ein Mg^{2+} -Ion in die Pore, die der Kanal freigegeben hat. Somit ist der Transport von Ionen aus dem synaptischen Spalt in die Zelle unterbunden, und wird als *Magnesium-Block* bezeichnet. Nach einer gewissen Zeitspanne löst er sich wieder und wird nach einer mehr oder minder langen Pause durch ein weiteres Ion ersetzt. Dies ist durch die zweifach positive Ladung des Magnesiums bedingt. Die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals ist somit zum einen von der Bindung des Glutamat abhängig, Liganden gesteuert; desweiteren ist die effektive Durchgängigkeit des Kanals, auch bei geöffneter Konformation, von dem Magnesium-Block abhängig - es besteht also ebenfalls eine Spannungsabhängigkeit, wegen der beteiligten Ionen und deren Ladungen[22].

Entsprechend dem intrazellulären Potential sind diese Wechsel zwischen den Bindungen verschiedener Mg^{2+} -Ionen mehr oder minder lang. Bei einer Hyperpolarisation der Zelle ist die Bindung an die Pore länger und die Pause mit einem offenen Kanal kürzer. Bei einer Depolarisation, wie durch Glutamat-Aktivierung des AMPA Rezeptors, ist die Bindungsdauer geringer und die Pausen zwischen den Bindungen länger – es können also länger positiv geladene Ionen (Na^+ , Ca^{2+}) in den Intrazellularraum fließen. Damit der Block signifikant entfernt wird und zu einem großen Einstrom von extrazellulären Ionen führen kann, muss eine entsprechend starke Depolarisation durch AMPA vermittelte Ioneneinströme vorliegen. Wenn dies allerdings gegeben ist, erhöht sich der Kationen-Einstrom in die Zelle zusätzlich durch die NMDA Rezeptoren nochmals erheblich.

Wenn nun gleichzeitig Anionen durch GABA vermittelte Potentiale zu einer Hyperpolarisation führen, kommt die Effizienz des Magnesium-Blocks auf die räumliche und zeitliche Summation der Aktivierungen an. Die LTP kann also nicht nur induziert, sondern auch in ihrer Effektivität moduliert werden. Darin liegt der Schlüssel für die Wichtigkeit von inhibitorischen Synapsen.

Durch die konsequenten CaMKII und PKC induzierten Phosphorylierungen und Einleitung von intrazellulären Signalkaskaden wird der Zellmetabolismus verändert. Phosphorylierte AMPA Rezeptoren weisen eine erhöhte Ionen-Leitfähigkeit auf und es werden vermehrt AMPA Rezeptoren in die Zellmembran transloziert, was bei folgenden Glutamat-Ausschüttungen zu stärkeren postsynaptischen Antworten führt.

In der folgenden späten LTP wird Gentranskription und Proteinbiosynthese verstärkt. Als Folge vervielfacht sich die Zahl an dendritischen Spines, vergrößert sich die Zelloberfläche und ein weiteres Mal die postsynaptische Sensitivität gegenüber Glutamat[57].

1.3 Zelladhäsionsmoleküle

Für den Zusammenhalt von Zellverbänden werden in sämtlichen Geweben und an Oberflächen Zelladhäsionsmoleküle (CAM) ausgebildet. Bindungspartner für die Moleküle sind zumeist ein gleichartiges Molekül der Partnerzelle (homophile Bindung), andere Bindungspartner sind aber auch möglich (heterophile Bindung).

Typischerweise sind die Moleküle dabei aufgeteilt in Extrazellulardomänen, die die eigentliche Bindung vermitteln; eine Transmembrandomäne/Juxtamembrandomäne und eine Intrazellulardomäne, die für die Verankerung am Zytoskelett verantwortlich ist.

Durch ein ungleiches Verteilungsmuster der Moleküle wird die Zelloberfläche polarisiert in apikal und basal. Aus demselben Grund spielen sie eine große Rolle in der Embryogenese, wo es auf räumlich und zeitlich exakte Verbindung und Lösung von Zellverbänden ankommt. Dabei können Kalzium abhängige- von Kalzium unabhängigen Molekülen unterschieden werden[11].

Integrine und der Lymphozyten Homing Rezeptor sind zum Beispiel Teil der Kalzium unabhängigen Gruppe. Zu den Kalzium abhängigen Molekülen gehört die Immunglobulin Superfamilie (IgSF CAM): Ihre Mitglieder zeichnen sich größtenteils durch Adhäsion an Geweben und immunkompetenten Zellen untereinander aus (NCAM, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, Nektine und Nektin-artige Moleküle). Schließlich binden auch Selektine und Cadherine Kalzium abhängig.

1.3.1 Cadherine

Diese stellen eine Superfamilie homophil bindender Adhäsionsmoleküle dar, die Kalzium abhängig eine Bindung vermitteln. Mitglieder sind Protocadherine, atypische Cadherine und die sogenannten klassischen Cadherine (Typ I- und II Cadherine). Die größte Bedeutung kommt dabei den klassischen Cadherinen zu.

1.3.2 Klassische Cadherine

Klassische Cadherine sind nach dem Hauptausprägungsort und der Erstbeschreibung benannt: M-Cadherin (Muskel), N-Cadherin (Neurone), P-Cadherin (Plazenta), E-Cadherin (Epithel). Die Moleküle bestehen aus 5 Extrazellulardomänen (EC1-5), einer Transmembrandomäne (TM) und einer Intrazellulardomäne (IC) (Abb. 1.3). Die Extrazellulardomänen bestehen dabei aus 7 β -Strängen, wobei 2 β -Faltblätter eine Fass-Struktur bilden. Bindungen können homophil zwischen Cadherinen derselben Zelle ausgeprägt

werden, *cis*-Bindung, oder zwischen Cadherinen gegenüberliegender Zellmembranen, *trans*-Bindung[83]. Das N-terminale Ende der Extrazellulardomänen stellt dabei das distale Ende, der C-Terminus das proximale Ende dar. Die Domänen sind von distal nach proximal durchnummeriert, mit EC1 am distalen und EC5 am proximalen Ende.

Für die eigentliche Adhäsion ist die EC1 Domäne unerlässlich, nachdem zwei E-Cadherine einer Zelle einen Dimer gebildet haben, der als funktionelle Grundeinheit gilt[70]. Im Rahmen des *linear zipper* Modells[73][79] wird angenommen, dass EC1 Domänen nur andere EC1 Domänen binden können; was jedoch wahrscheinlicher ist, ist das *deep intercalation* Modell, nachdem EC1 auch EC4/5 binden kann und so auch engere Bindungen vermittelt[73].

Bindungen zwischen Domänen kommen zustande, weil jede Domäne sowohl einen Akzeptor-Arm, als auch eine hydrophobe Bindungstasche besitzt. Beim Bindungsvorgang wird der Akzeptor-Arm in die Bindungstasche der jeweils anderen Domäne verbracht und es kommt zu einer nicht kovalenten Bindungsbildung, die ohne Kalzium jedoch nicht möglich ist. Es gibt Bindungsstellen dafür an jeder Konnektinosstelle zwischen den Extrazellulardomänen, je nach Literatur 2-3 Stück. Es verstärkt die interzelluläre Bindung und ist sogar für eine gewisse Trypsin Resistenz verantwortlich[42].

1.3.3 E-Cadherin

Es handelt sich um ein klassisches Cadherin mit Hauptausprägungsort in Epithelien. Andere Namen sind Cadherin-1 (Cdh1) und Uvomorulin. Es ist unerlässlich für die Implantation von Mäuseembryonen und die Ausprägung epithelialer Gewebe[85].

Kodiert wird es auf Genlocus 16q22.1, dem CDH1 Gen[41], mit 16 Exons und 15 Introns. Das Präkursor Peptid ist 135kD schwer, nach der Prozessierung nur noch 120kD. Danach wird es im Golgi-Apparat der Zelle weiter posttranslational modifiziert und auf den Weg Richtung Zellmembran geschickt. Nach Verlassen des Golgi-Apparates bindet sofort β -Catenin an die intrazelluläre Domäne und wird zusammen damit an die Zelloberfläche transportiert[20].

Sobald E-Cadherin in der Zellmembran verankert ist, sieht das Bindungsmuster wie folgt aus: Die EC1 Domäne bindet andere gleichartige Cadherine an EC1. An die Transmembrandomäne bindet exklusiv das p120 Catenin[87]. Das β -Catenin ist an die Intrazellulardomäne gebunden, γ -Catenin lose damit assoziiert. Am β -Catenin bindet α -Catenin und vermittelt darüber eine Verbindung des Cadherins mit dem Aktin-Zytoskelett. β -Catenin ist darüberhinaus mit dem WNT-Pathway assoziiert über die Glycogen Synthase Kinase β [76] und den EGF-Rezeptor [39].

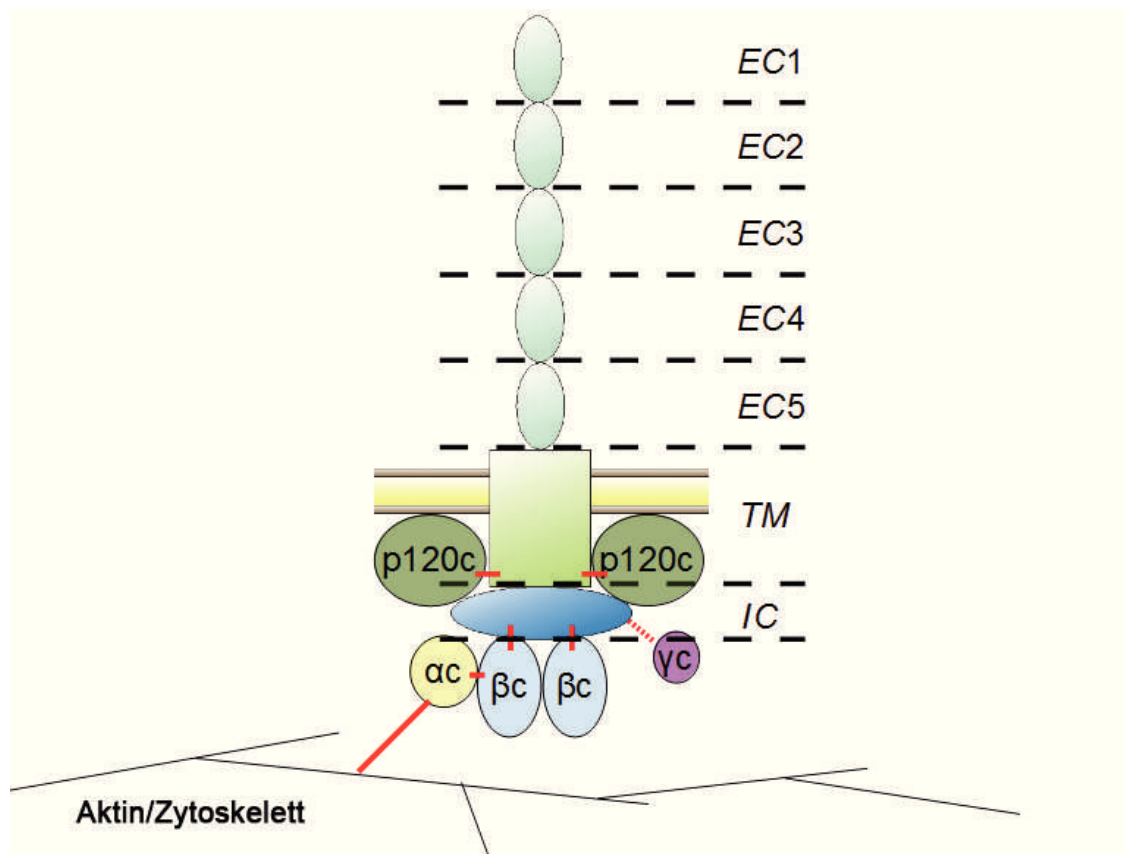


Abb. 1.3: E-Cadherin, schematisierte Darstellung; EC1-5: Extrazellulärdomäne 1-5; TM: Transmembrandomäne; IC: Intrazellulärdomäne; p120c: p120-Catenin; α c: alpha-Catenin; β c: beta Catenin; γ c: gamma-Catenin; Rote Striche: Bindungsrichtungen; gestrichelte rote Linie: lose Assoziation; Abbildung erstellt durch Roman Ewert, Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

E-Cadherin in dieser Form wird in allen epithelialen Geweben des Organismus exprimiert. Wie das Expressionsmuster im Kortex aussieht, und was dessen Funktion ist, ist jedoch relativ unerforscht. Coleman und Fannon konnten eine Ausprägung in Schicht CA3 des Hippokampus an Dendriten von Pyramidenzellen nachweisen[24]. Auch wurde im Bereich CA1 E-Cadherin Expression gezeigt, welches teilweise mit Synapsin I kolokalisierte; außerdem schien die synaptische Übertragung Einfluss auf die Stabilität der interzellulären Bindung zwischen den Synapsen und bei Blockade eine Reduktion der Langzeitpotenzierungseffekte zu haben[84]. Außerdem scheint es in der Ausbildung und Abschottung gewisser Hirnregionen während der Embryogenese eine Rolle zu spielen[60].

1.4 Konditionaler Knockout

Unter einem solchen versteht man die Ausschaltung eines Gens erst nach Setzen einer speziellen Bedingung. Das ist nötig, wenn das untersuchte Gen eine zentrale Rolle in der Embryogenese des Organismus spielt, und ein Fehlen desselben zu einem Abort, beziehungsweise atypischen Entwicklung, führen würde. Somit kann das Gen auch zu einem späteren Zeitpunkt noch ausgeschaltet werden und Untersuchungen und Experimente ermöglichen.

Folglich kommt es zunächst zur Expression des Wildtyps ohne Setzen der spezifischen Bedingung. Später wird diese dann gesetzt und der Organismus exprimiert das entsprechende Gen nicht mehr; der Knockout hat stattgefunden, jedoch im Gegensatz zu gewöhnlichen Knockouts nicht primär, sondern erst sekundär, *post partum*.

1.4.1 Das Cre-Lox System

Zum Ausschalten bestimmter Gene kann man das Cre-Lox System benutzen, welches eine Möglichkeit für einen Konditionalen Knockout darstellt (s.o.) . Für die Verwendung des Cre-Lox Systems müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. In das konditional auszuschaltende Gen müssen erstens loxP Sites (*locus of X-over P*) eingeführt, und zweitens die *Cre-Rekombinase* in die Zelle gebracht worden sein. Die Cre-Rekombinase führt dann mithilfe der loxP Sites den Knockout herbei. Gene mit eingeführten loxP Sites werden als *gefloxt* bezeichnet, “flankiert von loxP Sites”.

Die Cre-Rekombinase (also die zweite Bedingung), kann auf mehreren Wegen in die Zielzellen gebracht werden. Entweder werden Cre-Reporter Mäuse mit gefloxtten Mäusen gekreuzt, oder Zellen werden mit dem Plasmid transfiziert[49, 67]. Dieser Weg war nötig, weil ein konventioneller Knockout von E-Cadherin zu einem Absterben der Embryonen zum Zeitpunkt der Implantation führt, bedingt durch eine fehlende Anlage des

Trophoektoderms, einer Blastozystenhöhle und Epithels[50].

1.4.2 loxP Sites

Diese bestehen aus 34 Basenpaaren; dabei zwei zueinander palindromischen Sequenzen von je 13 Basenpaaren Länge und einer asymmetrischen Sequenz von 8 Basenpaaren als Verbindungsstück (Abb. 1.4).

ATAACTTCGTATA - ATGTATGC - TATACGAAGTTAT

Abb. 1.4: loxP Site, Sequenz[38]

Durch das asymmetrische Mittelstück der Sequenz ergibt sich eine Richtung der loxP Sites, die entscheidend für die Prozessierung durch die Cre-Rekombinase ist: Abschnitte zwischen zwei gleich ausgerichteten loxP Sites werden exzidiert und in ein zirkuläres Plasmid überführt; Im Falle von entgegengesetzten Sites wird dagegen der umspannte DNS Bereich invertiert und wieder integriert[2].

1.4.3 Die Cre-Rekombinase

Die Cre-Rekombinase (kurz: *Cre*) ist eine Integrase des Bakteriophagen P1, die 38kDa schwer und 343 Aminosäuren lang ist. Sie katalysiert die namensgebende Rekombination zwischen zwei loxP Sites[34]. Abgesehen davon benötigt Cre keine weiteren Cofaktoren oder Sequenzelemente zur erfolgreichen Funktion.

In den Zellkern gelangt das Molekül durch eine Nukleus-Lokalisierungs-Sequenz (NLS), also aktiv, und nicht durch Diffusion[52]. Dabei bindet an jede palindromische Hälfte einer loxP Site eine Cre Rekombinase, also insgesamt vier am DNS-Doppelstrang, die sich zu einem Tetramer verbinden und die loxP Sites zusammenführen[86]. Die eigentliche Rekombination findet dann in der Spacer-Region der Site statt. Die Effektivität der Rekombination von geflochten, mit Cre-Rekombinase transfizierten Zellen wird im Bereich von 80-100% angegeben[78].

1.5 Ziele der medizinischen Dissertation

Die Struktur und Organisation der neuronalen Schaltkreise ist interessant, aber auf der anderen Seite auch höchst komplex. Die Regulation im adulten, wie auch die Entwicklung

im juvenilen Organismus sind in ihrer Komplexität bisher nur approximativ erfasst und bedürfen noch weiterer tiefgreifender Untersuchungen, um ein besseres Verständnis dafür zu schaffen.

Den Zelladhäsionsmolekülen wird dabei eine Rolle zugedacht, die für das gegenseitige Auffinden der Neurone und Ausbildung der bekannten Schaltkreise notwendig sein soll. Aber auch die transsynaptische Regulation von synaptischer Stabilität und Plastizität sind denkbar. Für bestimmte CAMs konnte bereits ein Effekt in der Synaptogenese gezeigt werden[68][3][43].

Aufgrund von Hinweisen, dass N-Cadherin auf glutamatergen Synapsen anzutreffen ist, auf GABAergen Neuronen jedoch ein oder mehrere andere Cadherine[9], entstand die Hypothese, dass hier eventuell E-Cadherin eine solche Rolle übernehmen könnte. Ein konstitutioneller Knockout für den Organismus ist jedoch nicht mit dem Leben vereinbar, weshalb wir uns für einen konditionalen Knockout in *in vitro* gezüchteter primärer kortikaler Massenkulturen entschieden.

Aufgrund früherer Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnte eine Beteiligung von E-Cadherin an GABAergen Synapsen angenommen werden. A. Fiederling hatte elektrophysiologisch an Knockout-Neuronen eine Reduktion der Aktivität von GABAergen Synapsen zeigen können[25].

Ziel der Dissertation war es nun, nachzuweisen, ob neben der funktionellen Einschränkung in E-Cadherin defizienten Neuronen auch ein quantitativer Aspekt zum Tragen kommt. Dazu wurden diverse immunzytochemische Experimente auf Basis des Versuchsaufbaus meines Vorgängers durchgeführt. Damit wurde die Fragestellung aus einem weiteren Blickwinkel beleuchtet, bei gleichzeitiger Möglichkeit, die Ergebnisse beider Arbeiten in Bezug zueinander setzen zu können.

Die Messungen wurden in zwei Ansätzen zu jeweils zwei Zeitpunkten durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob der E-Cadherin Knockout einen Effekt auf glutamaterge Synapsen aufwies, was aufgrund der Datenlage jedoch nicht wahrscheinlich war. Danach wurden explizit die GABAergen Neurone untersucht, und auch hier die Synapsenzahlen quantifiziert.

2 Materialien und Methoden

2.1 Lösungen zur Zellkultur von Neuronen

2.1.1 Neurobasalmedium

Neurobasalmedium (s. A.2)	500ml	Gibco; Cat. No. 21103-049
B27 (s. A.1)	2%	Gibco; Cat. No. 17504-044
Glutamax	1mM	Gibco; Cat. No. 35050-038
Penicillin	100U/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122
Streptomycin	100µg/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122

2.1.2 BME Basalmedium

BME Medium (s. A.3)	500ml	Gibco; Cat. No. 21370-028
FCS (hitzeinaktiviert)	10%	Gibco; Cat. No. 10500-064
Glucose 40%	20mM	J. T. Baker; Cat. No. 0114
Insulin-Transferrin-Selenium A	6,5µM	Gibco; Cat. No. 5130-044
L-Glutamin	2mM	Gibco; Cat. No. 25030-024
Penicillin	100U/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122
Streptomycin	100µg/ml	Gibco; Cat. No. 15140-122

2.1.3 Polyornithin in Boratpuffer

Boric Acid	0,15M	Sigma-Aldrich; Cat. No. 083K0055
NaOH		Sigma-Aldrich; Cat. No. 22,146-5
Poly-L-Ornithin	40mg	Sigma-Aldrich; Cat. No. P3655

Mit NaOH auf einen pH von 8,35 puffern, danach 40mg Poly-L-Ornithin in 40ml des hergestellten Boratpuffers lösen.

2.1.4 Weitere zur Zellkultur notwendige Chemikalien

Trypsin	Gibco; Cat. No. 25050-014
PBS(+)	Gibco; Cat. No. 14040-091
Cytosin-b-Arabinofuranosid- hydrochlorid (ARA-C)	Sigma-Aldrich; Cat. No. C-6645

2.2 Die gentechnisch veränderte Mauslinie EcadFlox

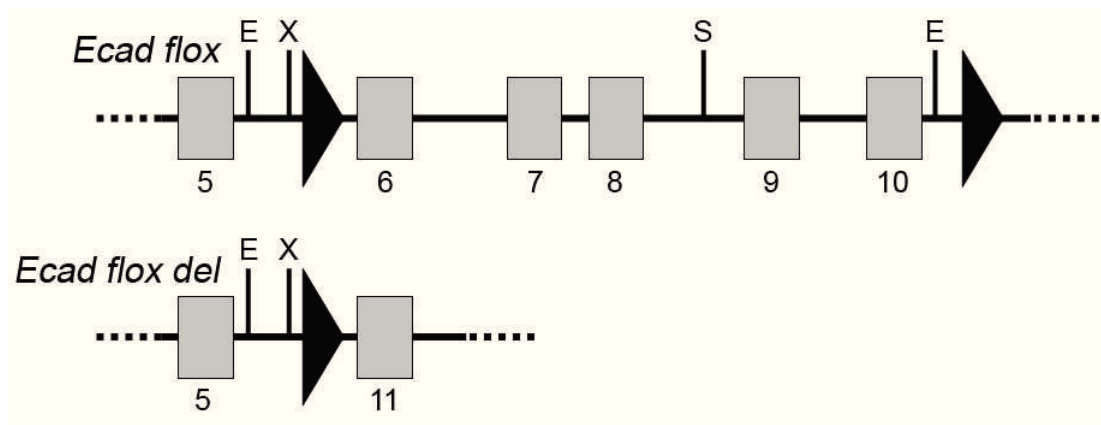


Abb. 2.1: CDH1 Gen, Ecad flox und Ecad flox-del; Graue Kästen: Exons, Schwarze Pfeile: loxP Sites mit Ausrichtung entsprechend der Pfeilrichtung; Buchstaben: Restriktions-Sites; E: EcoRI, X: XbaI, S: SspI; Abbildung erstellt auf Basis von Boussadia et al.[10]

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente wurde ein gentechnisch hergestellter homozygoter Ecad flox Mäusestamm verwendet, der uns freundlicherweise vom Max-Planck Institut für Immunbiologie in Freiburg, Abteilung Molekulare Embryologie, zur Verfügung gestellt wurde. Die Veränderung bestand in der Einführung von loxP Sites in das CDH1 Gen, damit ein konditionaler Knockout mit der Cre Rekombinase durchgeführt werden konnte (s. 2.4.3).

Die Mauslinie wurde in der Tierversuchsanstalt zwecks Organentnahme unter der internen Organisationsnummer O20/04 geführt.

Im vorliegenden Mäusestamm wurden die loxP Sites in gleicher Ausrichtung in die Introns 5 und 10 des CDH1 Gens eingefügt (Abb. 2.1), und somit nach Prozessierung durch die

Cre Rekombinase die enthaltenen Exone 6 bis 10 exzidiert und in ein zirkuläres Plasmid überführt[10]. Der daraus resultierende Genotyp, der aus dem Rest des belassenen CDH1 Gens entsteht, wird als Ecad flox-del bezeichnet. Es handelt sich dabei um ein Nullallel[10], das homozygot exprimiert wird, da der zugrunde liegende Mäusestamm bereits homozygot Ecad flox war. Die Cre Rekombinase führt deshalb auf beiden Allelen zur Bildung eines Nullallels für CDH1. Der Stamm trägt die interne Tierversuchsanstaltsnummer 1162.

2.3 Herstellung von neuronalen Massenkulturen

2.3.1 Vorbehandlung der Coverslips

Vor einer Beschichtung der 12mm im Durchmesser betragenden Coverslips aus Glas mussten diese vorbehandelt werden. Ohne dies käme es zu keiner zufriedenstellenden Haftung des Poly-L-Ornithins und nachfolgend auch nicht der Neuronen. Zunächst wurden deshalb circa 50 Coverslips einzeln kurz in ein mit Leitungswasser gefülltes Falcon Röhrchen getaucht und danach in zwei 10cm Petrischalen aus Kunststoff überführt. Dies sollte den ersten groben Schmutz von deren Oberfläche entfernen. Danach wurden die Petrischalen mit 1 molarer HCl Lösung aufgefüllt, bis die gesamte Oberfläche davon bedeckt war. Nach 30 Minuten wurde die HCl Lösung verworfen und die Coverslips in den Petrischalen 4 Mal mit Aqua dest. gewaschen. Im Anschluss wurde annähernd 100 prozentiger Ethanol für 30 Minuten flächendeckend aufgebracht. Nach Ablauf der Zeit wurden die Coverslips aus der Schale entfernt und auf Filterpapier unter dem Abzug trocknen gelassen. Sobald der Ethanol sich verflüchtigt hatte, wurden die Coverslips in eine große Petrischale aus Glas überführt, mit Folie verschlossen, und in den Hitzesterilisator verbracht. Die Sterilisation wurde für 3 Stunden bei 180°C vorgenommen.

2.3.2 Poly-L-Ornithin beschichtete Coverslips

Sobald die Coverslips abgekühlt waren, der Sicherheit halber am darauf folgenden Morgen, konnten sie unter der Sterilen Arbeitsbank in Zellkulturschalen der Größe 35x10mm überführt werden. Dabei wurden jeweils 5 Coverslips in einer Zellkulturschale platziert. Anschließend wurden pro Coverslip jeweils 90µl Poly-L-Ornithin aufgegeben. Nach Verschluss der Schalen wurden diese 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Hier fand die eigentliche Beschichtung statt. Am nächsten Morgen wurden die Blasen des Poly-L-Ornithin von den Coverslips abgesogen und anschließend 3 Mal mit autoklaviertem Wasser gewaschen, um den Boratpuffer, der Bestandteil der Lösung und zytotoxisch war, möglichst komplett davon zu entfernen. Nach einer Trockenzeit von 24-48 Stunden

konnte eine Kolonisierung mit primären kortikalen Neuronen für die folgenden 7-10 Tage vorgenommen werden.

2.3.3 Präparation der Mausföten an E17

Eine trächtige Maus, *Mus musculus*, wurde im Entwicklungsstadium E17 ihrer Embryonen präpariert. Sie war dabei Teil des Inzuchtstammes EcadFlox, in dem homozygot das EcadFlox Allel ausgeprägt war. Zunächst wurde sie in eine Kammer verbracht und danach 1 Minute mit CO₂ begast. 2 weitere Minuten wurde die entstandene Atmosphäre wirken gelassen und danach die nun tote Maus auf die Präparationsbank gebracht. Den Richtlinien entsprechend wurde sie nun zuerst dekapitiert. Danach wurden mit unsteriler Pinzette und Schere die Bauchhöhle eröffnet. Dabei kam ein kleiner sagittaler Einschnitt zu Beginn zum Einsatz und wurde dann nach transversal rechts und links erweitert, um eine bestmögliche Sicht auf den dahinterliegenden Situs zu erlangen. Um Sterilität zu wahren, wurden die Instrumente gegen sterile Pinzette und Schere eingetauscht und nun das Peritoneum eröffnet. Mit vorsichtigen Schnitten und Griffen der Instrumente wurden die Uteri mobilisiert und in größtmöglichen Einheiten direkt von der Maus in eine sterile Petrischale überführt, die geschlossen wurde, sobald der letzte Uterus mit enthaltenem Embryo darin seinen Platz gefunden hatte.

Die weitere Präparation fand unter der Sterilen Arbeitsbank statt, um einer Kontamination durch Luftkeime beziehungsweise Hautkeime vorzubeugen. Ein großer Uterus wurde ausgewählt und mit zwei sterilen Pinzetten vorsichtig aufgerissen. Der darin enthaltene Embryo wurde daraufhin überprüft, ob makroskopisch sichtbare Anomalien vorlagen, beispielsweise ein Hydrozephalus. Wenn diese Prüfung erfolgreich war und keine Anomalie vorlag, wurde der Fötus nun zuerst mit einer Schere dekapitiert. Mit zwei Pinzetten wurde die Haut von dem knorpeligen Schädel skelett abgezogen, beginnend okzipital, fortschreitend nach frontal, in sagittaler Richtung und möglichst median. Sobald die durchsichtig schimmernde Schädelkalotte mit darunterliegendem Gehirn zufriedenstellend zu sehen war, wurde nun auch der Schädelknorpel von okzipital beginnend in gleicher Weise abgezupft. Ein guter Startpunkt für diesen Schritt war die Schnittstelle, wo der Kopf seine Schnittkante zum Körper hatte. Mittels eines Gehirnlöffels wurde das Gehirn aus dem Schädel aufgeladen und in eine 35x10mm Zellkulturschale verbracht, die mit eiskühlem 2ml PBS(+) gefüllt war, um hypoxische Zellschäden zu vermeiden. Dabei lag das Gehirn auf der ventralen Seite.

Die folgenden Schritte wurden aufgrund der kleinen Größe des Gehirns und der Differenzierung wichtiger Strukturen unter einem Lichtmikroskop fortgesetzt. Das Cerebellum wurde mit Keilschnitt durch ein Einwegskalpell vom Rest des Gehirns getrennt und verworfen. Der folgende sagittale Schnitt trennte die beiden Hemisphären voneinander. Um bei der späteren Dissoziation der Zellen keine Probleme in Form mangelnder Auflö-

sung der Zellverbände zu bekommen, mussten nun die Meningen vom Gehirn abgetrennt werden. Hierzu wurden zwei spitze sterile Pinzetten verwendet. Im nächsten Schritt wurden Kortex und Medulla mit Pinzette und Skalpell voneinander getrennt. Dabei wurde zunächst von medial ein oberflächlicher Schnitt in der Grenzzone gesetzt und danach versucht, das Mark aus dem ummantelnden Kortex herauszuschälen, um so viele Zellen wie möglich zu erlangen.

Die abgetrennten Stücke Kortex wurden in eine weitere Zellkulturschale, die ebenfalls mit eisgekühlten 2ml PBS(+) gefüllt war, überführt, um eine Kontamination mit störenden Abfallprodukten der bisherigen Präparation zu vermeiden. Hier wurde das gesamte Material mit dem Skalpell in kleine Kortextblöcke geschnitten, um sie Pipetten gängig zu machen und die folgende Dissoziation zu erleichtern. Die Stücke wurden nun in 1ml PBS(+) mit einer Pipette aufgenommen und in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß gegeben. 200µl 0.25% Trypsin kamen noch hinzu und alles wurde für 5 Minuten bei 37°C und 5% O₂ in einem Brutschrank inkubiert.

Die Lysewirkung des Trypsin musste danach beendet werden: Der Überstand wurde verworfen und mit 1ml auf 37°C angewärmtem BME Medium aufgefüllt. Einen kurzen Augenblick später wurde dies ebenfalls wieder verworfen und 200µl eisgekühltes PBS(+) hinzugegeben. Nun konnten die Zellverbände mechanisch dissoziiert werden durch vorsichtiges Pipettieren zunächst mit einer 1ml Pipette und später mit einer 200µl Pipette. Dies wurde so lange durchgeführt, bis die Zellsuspension homogen milchig und frei von Stücken war. Die sehr hohe Zelldichte in dieser Lösung wurde verdünnt mit 4ml BME Medium und vorsichtig durchmischt, und in einer Neubauer Zählkammer kontrolliert. Dies geschah, um eine ähnliche Zellzahl auf jedem Coverslip zu erreichen.

Entsprechend der Zelldichte in der Lösung wurden ~90.000 Zellen auf je ein vorbereitetes Coverslip aufgebracht und danach für 1 Stunde im Inkubator aufbewahrt. Die Zellen konnten sich so am Grund verankern und es wurde nur noch 2ml Neurobasalmedium hinzugegeben, um eine ordnungsgemäße Ernährung der Zellen zu gewährleisten. Die weitere Aufbewahrung über die Zeit fand wiederum im Inkubator statt.

2.4 Transfektion

2.4.1 Transfektionschemikalie - Lipofectamine 2000

Zur Transfektion der Neurone wurde Lipofectamine 2000 von Invitrogen (Cat. No. 11668-027) benutzt. Es bildet kationische Lipidvesikel aus, die Vektor-DNS durch die Lipiddoppelschicht der Zielzellen in das Zytosol transportieren, was auch als Lipofektion bezeichnet wird.

2.4.2 Vektoren - pEGFP-N1

Der verwendete Vektor codiert für eine verbesserte Version des ursprünglich aus der Tiefseequalle *Aequoria victoria* geklonten GFP (*EGFP* = *Enhanced Green Fluorescent Protein*). Dabei sind die ursprünglichen günstigen Eigenschaften beibehalten worden: Problemlose Expression in der Zielzelle bei geringsten Effekten auf den restlichen Metabolismus.

Die Verbesserungen gründen sich auf den Bedürfnissen der modernen Zellbiologie. Für eine höhere Lichtemission und Expression in Säugerzellen wurde eine vom Spektrum her leicht ins Rot verschobene Variante des GFP als Grundlage genommen[15, 72, 45]. Das Exzitationsmaximum liegt hier nun bei 488nm und das Emissionsmaximum bei 507nm (wtGFP: Exz=395/475nm;Em=509nm). Weitere wichtige Änderungen sind Austausch von zwei Aminosäuren an Schlüsselpositionen des eigentlichen Fluorophors (65-67): Phenylalanin-64-nach Leucin und Serin-65 nach Threonin, was in der Literatur als *GFPmut1* Variante bezeichnet wird[19]. Mehr als 190 stumme Basenpaaranpassungen wurden zur Humanisierung des Vektors vorgenommen[33] und weitere Sequenzen geändert mit Zielsetzung einer erhöhten Translationseffizienz[48]. Zur Initiierung der Transkription wird ein CMV Promotor verwendet P(CMV IE).

Ergebnis dieser Veränderungen ist eine etwa viermal schnellere posttranslationale Modifikation und Funktionsfähigkeit, die Helligkeit ist um den Faktor 100 gesteigert[37]. Es wird angenommen, dass EGFP keinen Einfluss auf Formation und Funktion von Synapsen hat.

Bezogen wurde der Vektor über <http://www.addgene.org>

2.4.3 Vektoren - pBS598 EF1alpha-EGFPcre

Bezogen wurde dieser Vektor über <http://www.addgene.org> (Plasmid 11923, PMID 10334853).

Mit einer Länge von 8418bp steht er unter dem EF1alpha Promotor und codiert mit 1800bp für das Fusionsprotein EGFP-Cre (im folgenden CreGFP genannt). Es besteht aus dem bereits vorgestellten EGFP und der Cre Rekombinase[53]. Diese ist eine Topoisomerase I des Bakteriophagen P1, die spezifisch an loxP Sites angreift und dort, entsprechend der Orientierung der Sites, verschiedene Effekte haben kann.

In der vorliegenden Arbeit waren die loxP Sites in gleicher Richtung orientiert, was in einem Ausschneiden des Bereiches dazwischen und der Bildung eines zirkulären DNS Konstrukts aus dem Exzidat führte. Das flankierte Gen war damit ausgeschaltet (s. auch

2.2). Mittels des Fusionsproteins im speziellen war es nun möglich, durch die grüne Fluoreszenz auf eine erfolgreiche Expression der Cre Rekombinase zu schließen, und eine durch sie hervorgerufene Ausschaltung des mit loxP Sites erweiterten Gens anzunehmen.

2.4.4 Vektoren - pDsRed2-N1

Der Vektor mit der Cat. No. 632406 basiert auf einem von der Scheibenkoralle (*Disco-soma* sp.) exprimierten Fluorophor und von dort erstmals klonierten Plasmid als Rot Fluoreszierendes Protein, drFP583[61]. Clontech verbesserte den ursprünglichen Vektor: Aufgrund der Erfahrungen mit dem Vorgänger DsRed1 wurden 6 Aminosäureaustausche vorgenommen: V105A, I161T und S197A, die zu einer beschleunigten Expression führen und R2A, K5E und K9T, die eine Aggregation des Proteins größtenteils verhindern.

Wie auch bei pEGFP-N1 wurden stumme Basenpaaraustausche vorgenommen, die in einer Humanisierung von Codons des Vektors resultierten und eine höhere Expressionsrate in Säugetierzellen zur Folge haben[33]. Ebenfalls wie bei pEGFP-N1 steht der kodierende Bereich unter einem CMV Promotor $P_{(CMV\ IE)}$, der eine hohe Expressionsrate zur Folge hat.

Das Exzitationsmaximum liegt bei 558nm, das Emissionsmaximum bei 583nm und liegt somit im namensgebenden roten Bereich des Spektrums.

2.4.5 Transfektionsvorgehensweise

An DIV4 wurden die primären kortikalen Neuronenkulturen transfiziert mit für EGFP bzw. CreGFP codierenden Vektoren (Abb. 2.2). Zunächst wurden die auf 1µg/µl Konzentration vorbereiteten Vektoren aufgetaut und in der Zwischenzeit 50µl angewärmtes Neurobasalmedium in jeweils 2 Eppendorfgefäße pro Ansatz/Zellkulturplatte gegeben.

In das erste Gefäß wurden 10µl Lipofectamine 2000 gegeben. Im zweiten Gefäß sollten die Vektoren mit dem Neurobasalmedium vermischt und verdünnt werden. Bei Transfektion eines einzelnen Vektors wurden hier 5µl hinzugegeben. Bei Kotransfektionen betrug das Mengenverhältnis der gewünschten Vektoren 5:1, wobei 5µg CreGFP codierender Vektor und 1µg Vektor für DsRed2 oder EGFP hinzugegeben wurde, abhängig vom aktuellen Experiment.

Die Vektoren und das Lipofectamine wurden nun 5 Minuten lang in ihren respektiven Gefäßen belassen, um eine homogene Verteilung und Verdünnung zu gewährleisten. Danach wurden die Inhalte beider Gefäße vereinigt, mit einer Pipette sachte durchmischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit fand die Aufnahme

der Vektoren in die Lipidvesikel des Lipofectamines statt.

Nach Abschluss dieses Vorgangs wurden 800µl Medium aus der zugehörigen Zellkulturschale dem Transfektionsmedium hinzugegeben und die restlichen 1200µl konditioniertes Medium in einem Eppendorfgefäß gesichert. Dies geschah, da die Neuronen über den Lauf von 5 Tagen einige Stoffwechselprodukte und Neurotrophine in ihr umgebendes Medium abgaben, die für ein weiteres vitales Wachstum essentiell waren [40], zum Beispiel Brain derived neurotrophic factor (BDNF) und Neurotrophin 3 (NT3) [16].

Das Transfektionsmedium wurde nun vorsichtig tropfenweise auf die Zellkulturschale gebracht und nach Verschluss derselben in den Inkubator, zusammen mit dem gesicherten konditionierten Medium, verbracht. Bei 37°C, 5% O₂ wurden die Zellen für 6 Stunden inkubiert. Diese Zeitspanne stellt das Optimum dar, in der eine gute Transfektionseffizienz erreicht wird und gleichzeitig die Zellen durch das zytotoxische Lipofectamine nicht allzu sehr geschädigt werden. Eine Transfektionszeit von ein oder zwei Stunden mehr wirkte sich deutlich negativ auf das Zellüberleben aus.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Transfektionsmedium von den Zellkulturschalen entfernt und verworfen; stattdessen wurde das vorher gesicherte Medium hinzugegeben und die Schale mit angewärmtem Neurobasalmedium wieder auf 2ml Volumen aufgefüllt. Die weitere Lagerung der Zellen fand im Inkubator statt.

Zwecks Vergleichbarkeit wurde für jedes Experiment an DIV4 (ko)transfiziert. Für die Ermittlung eines geeigneten Vektoren-Mischverhältnisses, bei dem eine sichere Kotransfektion gewährleistet ist, wurde mit pDsRed2-N1 und pBS598 im Verhältnis 5:1 kotransfiziert. Resultierend exprimierten die transfizierten Zellen dsRed2 im gesamten Zellsoma und Nukleus, sowie im Falle einer erfolgreichen Kotransfektion das CreGFP-Fusionsprotein vornehmlich im Nukleus (Abb. 2.2a) .

Das Ziel der weiteren Experimente war die Identifikation von Knockout-Zellen nach Kotransfektion, und folgend Antikörperfärbungen von synaptischen Proteinen. Im Rahmen der Antikörperfärbung musste eine Fixierung mit Paraformaldehyd durchgeführt werden. Lediglich EGFP, nicht jedoch dsRed2, wies eine Stabilität dagegen auf. Dementsprechend musste die Kotransfektion mit pEGFP-N1 und pBS598 durchgeführt werden. Da eine visuelle Kontrolle der Kotransfektion bei zeitgleicher Exprimierung von EGFP und CreGFP jedoch nicht möglich ist, musste sich auf das im vorigen Schritt ermittelte Mischverhältnis verlassen werden. Die Antikörperfärbung der nun rein grün erscheinenden Zellen fand an DIV7 bzw. DIV14/15 statt (Abb. 2.2b/c).

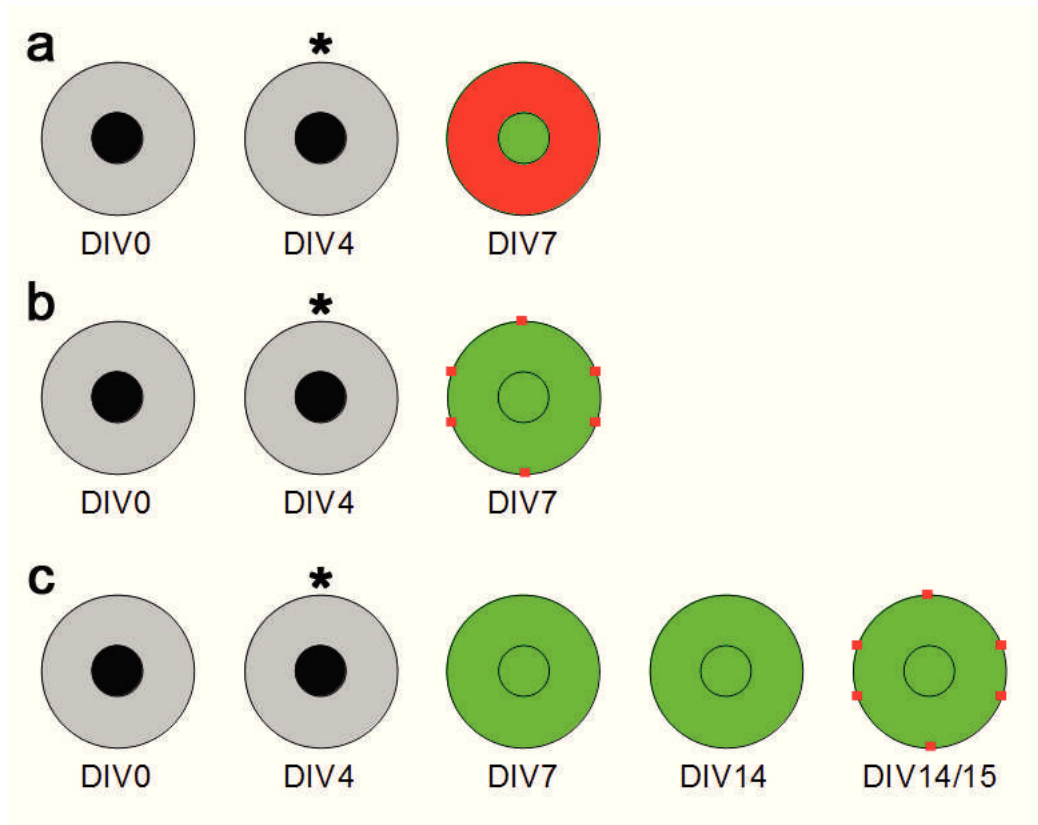


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Transfektionsprotokolls; * Transfektionszeitpunkt, Messung am jeweils letzten Tag der Reihe; die roten Punkte in b und c stellen die Antikörperfärbung dar; a: CreGFP/DsRed2 Kotransfektions-Kontrolle; b: VGAT/VGLUT1 Experiment DIV7; c: VGAT/VGLUT1 Experiment DIV14

2.5 Antikörperfärbung

2.5.1 Antikörper - anti VGLUT1

Bezogen wurde der Antikörper über Synaptic Systems (Cat. No. 135 303). Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper vom Kaninchen, der gegen VGLUT1 (Vesicular Glutamate Transporter 1) gerichtet ist. Damit war eine sensitive Anfärbung von neuronalen glutamatergen Synapsen an der Präsynapse möglich.

2.5.2 Antikörper - anti VGAT (zytoplasmatische Domäne)

Auch dieser Antikörper wurde von Synaptic Systems bezogen (Cat. No. 131 003). Er ist gegen die zytoplasmatische Domäne des präsynaptischen vesikulären GABA Transporters gerichtet und ermöglicht so eine Darstellung GABAerger Präsynapsen. Es handelt sich hierbei ebenfalls um einen polyklonalen Antikörper, hergestellt im Kaninchen.

2.5.3 Sekundärer Antikörper

Zur Detektion der Antikörperfärbung wurde in jedem Fall ein gegen Hase gerichteter sekundärer Antikörper benutzt, der mit Cy3 als rotem Fluorophor gekoppelt war (Exzitationsmaximum=550nm, Emissionsmaximum=570nm). Bezogen wurde er von Chemicon (Cat. No. AP132C) und war dabei selbst in Ziegen produziert.

2.5.4 Vorgehensweise der Antikörperfärbung

Die zuvor transfizierten Zellen wurden zur Auswertung der Synapsenzahlen an DIV7 und DIV14 mit Antikörpern gegen VGAT und VGLUT1 markiert und fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht.

Jeweils eine Zellkulturschale wurde dabei mit folgendem Protokoll behandelt. Mengenangaben der einzelnen Substanzen/Lösungen, die verwendet wurden, entsprechen 1ml, soweit nicht anders angegeben. Wichtig war hier die komplette Bedeckung der Schale, nicht die absolute Menge des Stoffes (sehr wohl aber die Verhältnisse). Inkubationszeiten wurden - bei Raumtemperatur - sachte auf einem Shaker verbracht, was eine homogene Verteilung der Stoffe gewährleisten sollte.

Es musste zunächst das gesamte Medium abgesogen und verworfen werden. Danach

wurde die Schale 3 Mal mit PBS(+) für jeweils 1 Minute gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen fixiert mit einer 4% Lösung Paraformaldehyd (PFA) in PBS(+). Dies geschah nach Zugabe für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Um die Zellmembran für die Antikörper permeabel zu machen, wurde folgend 2 Mal mit einer 0,2% Lösung TritonX100 in PBS(+) (im folgenden: PBST) für 5 Minuten gewaschen. Danach wurde der Blocking-Buffer hinzugegeben und für 60 Minuten inkubiert, bestehend aus 2% *goat*-serum und PBST. Nach diesem Schritt konnte der primäre Antikörper zur Färbung der Synapsenbestandteile in 0,2% *goat*-Serum und PBST gelöst, und dann auf die Zellen aufgegeben werden.

Bei Verwendung des hochaffinen und spezifischen Antikörpers gegen VGAT konnte nach Ablauf von 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Protokoll fortgefahren werden; der Antikörper gegen VGLUT1 erforderte jedoch eine Lagerung der Zellen bei 4°C über Nacht - hier konnte erst am nächsten Morgen fortgefahren werden.

Wenn es zu einer primären Antikörperbindung gekommen war, konnte der Überstand wieder entfernt werden und die Schale mit PBST für 10 Minuten gewaschen werden. Direkt im Anschluss daran wurde der sekundäre Antikörper, ein gegen *rabbit* gerichteter *goat*-Antikörper, aufgegeben und wiederum für 60 Minuten inkubiert. Danach musste noch 2 Mal mit PBS gewaschen werden und dann waren die Zellen bereit für die Betrachtung unter dem Mikroskop.

2.6 Fluoreszenzmikroskopische Datensammlung

Zur Darstellung der in den vorigen Schritten platzierten Farbstoffe wurden die Coverslips in ein Fluoreszenz-Mikroskop eingebracht und folgend mit UV Bestrahlung angeregt. Mittels zwei verschiedener Filter konnte das grüne Spektrum für die Zellen und das rote Spektrum für die Antikörper gefärbten Synapsenbereiche Anwendung finden, während die Vergrößerung konstant 63x betrug.

Der grüne Filter (*Zeiss Filter Set 13, 488013 - 0000*) besaß ein Exzitationsmaximum bei 470nm und ein Emissionsmaximum bei 505-530nm. Hingegen wurde die Exzitation beim roten Filter (*Zeiss Filter Set 15, 488015 - 0000*) bei 546nm vorgenommen und eine Emission um 590nm aufgezeichnet.

2.6.1 Bildgewinnung

Die Sammlung der Rohdaten wurde mit dem vom Mikroskop mitgelieferten Programm MetaVue durchgeführt.

Unter Verwendung des Grün-Filters wurden so viele vital aussehende Zellen wie möglich und auf dem Coverslip vorhanden, aufgesucht und fokussiert. Dabei sollte auf jeden Fall das Soma mit erfasst sein, sowie ein großer Teil der zugehörigen Dendriten, sofern das bei einer Auflösung von 696x520 Pixeln möglich war. Nun wurden diejenigen Fokusebenen manuell definiert, die sich unter und über dem Bereich befanden, in dem die Zelle eben noch scharf zu sehen war. Mithilfe einer Automatikfunktion wurden nun zwischen diesen beiden Bildtiefen Bilder im Abstand von 10µm angefertigt.

Es resultierte ein in der absoluten Bildzahl variierender Z-Stack, der mit eindeutigen Dateinamen in das aktuelle Verzeichnis gespeichert wurde. Der korrespondierende Z-Stack mit vorgeschaltetem Rot-Filter zur Darstellung der Antikörper-Färbung musste auf selbige Weise wie oben beschrieben erstellt werden. Wichtig war dabei die eindeutige Zuordnung von rotem und grünem Stack, weil alleine von dem Antikörper-Bild keine ausreichende Kontrolle über die Richtigkeit der Zuordnung mehr möglich war.

2.6.2 Postprozessierung in ImageJ

Die weitere Prozessierung der Bilder wurde in ImageJ, Version 1.41o, vorgenommen (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Dies ist ein Programm, das auf OpenSource Basis der wissenschaftlichen Gemeinde zur Verfügung gestellt wird und über eine Vielzahl verschiedener, ebenfalls kostenfrei erhältlicher, Plugins verfügt.

Zunächst mussten die Z-Stacks zu einem Bild reduziert werden. Dafür wurde mit der Funktion "Image->Stack->Z-Project" ein Maximum-Bild erstellt, das die hellsten Stellen aus den ausgewählten (=schärfsten) Ebenen zu einem Bild summierte. Gewöhnlich konnte damit schon eine gute Verbesserung der Intensität und Schärfe des Bildes erreicht werden (Abb. 2.3a).

Für eine weitere relativ simple Besserung sorgte eine allgemeine mathematische Hintergrund-Entfernung, aufgerufen über "Process->Subtract Background". "Rolling Ball Radius=50", keine weiteren aktivierten Funktionen (Abb. 2.3b). Zudem war dieser Schritt nötig, damit in der nun folgenden Dekonvolution der roten Bilder keine übermäßigen Artefakte entstehen konnten - hier war eine punktförmige Färbung gewünscht, damit möglichst genau die Zahl der Punkte auf der Zelle gezählt werden konnten. Für die grünen Bilder, also die Darstellung der Zellen, war eine Dekonvolution nicht mehr nötig.

Zwei externe Plugins kamen zum Einsatz: "Diffraction PSF 3D" zur Erstellung der Point Spread Function und "Iterative Deconvolve 3D" für die Dekonvolution, beide entwickelt von Bob Dougherty, zu beziehen von <http://www.optinav.com/imagej.html>. Mit dem Plugin "Diffraction PSF 3D" wurde eine Point Spread Function erstellt, die dem zweiten Plugin als Referenz für die Dekonvolution diente: Sie generierte ein Bild, das anzeigt,

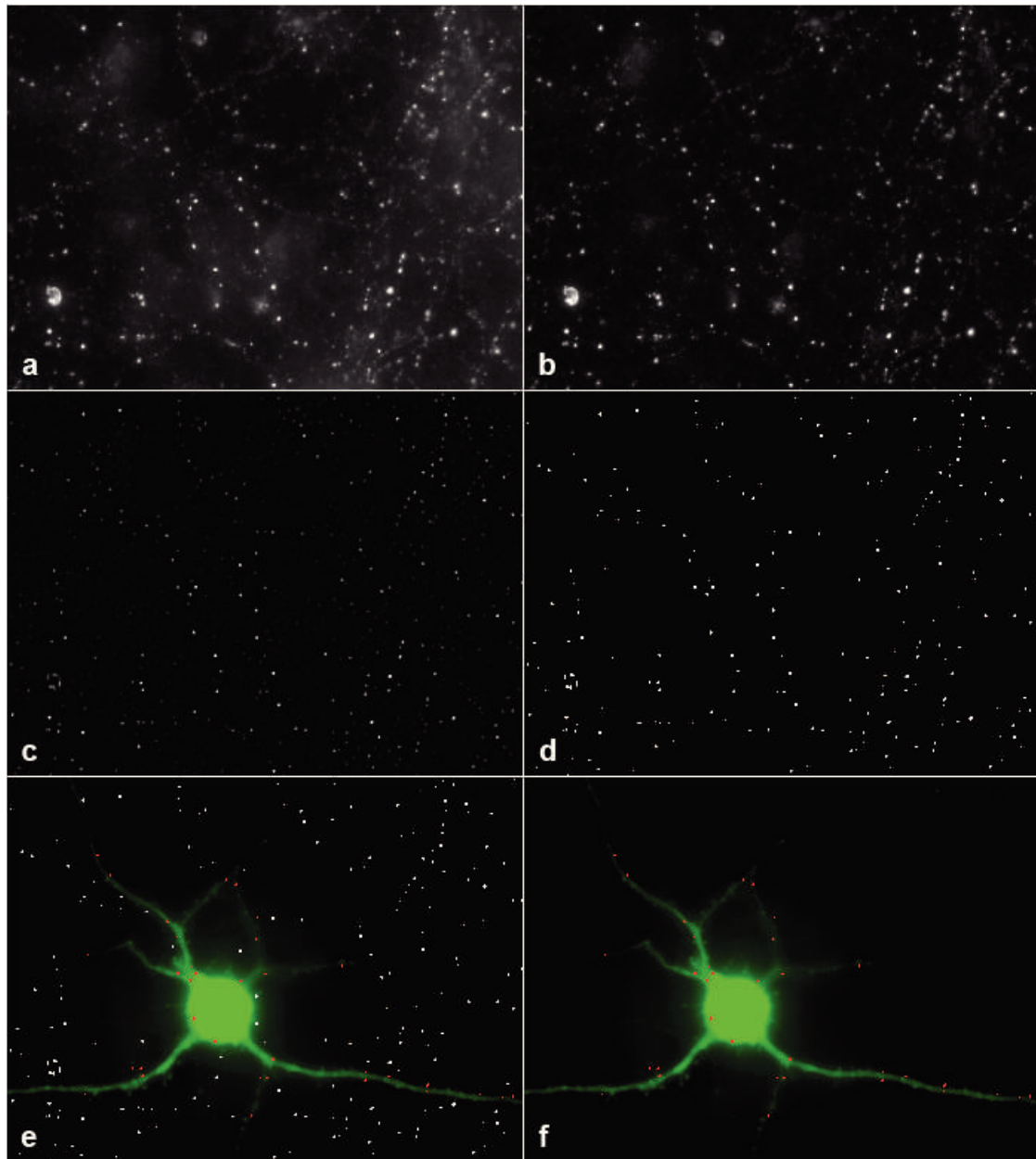


Abb. 2.3: Darstellung der Postprozessierung; a: Maximum Bild aus Fokusebenen eines Z-Stacks; b: Hintergrund-Entfernung über automatischen Algorithmus; c: De-konvolution mit 70 Wiederholungen; d: Applizierung eines Auto-Thresholdes; e: Overlay-Erstellung der Antikörperfärbung und der zugehörigen Zelle, Hervorhebung der gezählten Punkte/Synapsen mit rot; f: Entfernung der nicht gezählten Punkte zur besseren Übersichtlichkeit

wie ein Punkt nach Anwendung einer bestimmten Unschärfe-Funktion aussieht. Hier wurden die Standard-Einstellungen übernommen, wie sie von dem Plugin mitgeliefert wurden. Nun konnte die eigentliche Dekonvolution beginnen. Es handelte sich hierbei um eine 2D Dekonvolution, die maximal 70 Male wiederholt wurde. Die Einstellungen für Filter und Bildverbesserungen (“Normalize PSF”, “Perform anti-ringing step”, “Log mean pixel value to track convergence”, “Detect divergence”, “Wiener filter gamma”, “Low pass filter”) wurden aktiviert belassen, da ein Ausschalten nur in einer signifikanten Verschlechterung des Bildes endete, aber nicht mehr zusätzliche Bildinformation lieferte. Nach Ablauf einer gewissen Zeit war auch dieser Schritt abgeschlossen, aber das Bild insgesamt relativ dunkel (Abb. 2.3c).

Ein Auto-Grenzwert (*Image->Adjust->Threshold*) trennte den Hintergrund von den maximal hellen Punkten nach dem IsoData Algorithmus[75], der von Gabriel Landini in ImageJ integriert wurde:

$$\text{Grenzwert} = (\text{Hintergrund Mittelwert} + \text{Objekt Mittelwert}) / 2$$

Für die Auszählung der Punkte war dies von Vorteil, weil zum einen eventuell entstandene Artefakte mit diesem Schritt noch aussortiert werden konnten und zum anderen alle Punkte dieselbe Intensität aufwiesen (Abb. 2.3d).

Das entstandene Grenzwert-Bild wurde mit dem vorher produzierten Bild der Zelle zusammengefügt und abgespeichert (Abb. 2.3e).

2.6.3 Automatisierung

Aufgrund der Vielzahl der zu untersuchenden Zellen und der Menge an Daten war eine rein manuelle Prozessierung der Bilder unpraktikabel. Deshalb wurden mehrere Makros entwickelt, die zu einer Automatisierung führten (Abb. 2.4 und 2.5). Vor regulärer Inbetriebnahme wurden diese ausführlich darauf getestet, dass sie die korrespondierenden Stacks rot/grün korrekt zusammenführten.

Dabei wurde pro Stack-Art ein Verzeichnis erstellt; eines für die roten Stacks (Antikörperfärbung) und eines für die grünen Stacks (Zellen). Die Makros erstellten daraus eine Dateiliste für jedes Verzeichnis und wiesen jeder Datei eine fortlaufende Zahl zu; Stacks mit derselben zugewiesenen Nummer wurden als zusammengehörig bearbeitet - wenn die Namensgebung der Dateien nicht stimmte und somit die Reihenfolge innerhalb des Verzeichnisses, kam es unweigerlich zu einer falschen Zuordnung der Stacks. Durch mehrmalige Kontrollen der Dateinamen vor Beginn der Prozessierung wurde dem entgegengewirkt. Auch stichprobenartige Kontrollen der finalen Kombinationsstacks waren korrekt zusammengeführt.

```
macro "Batch Deconvolution" {  
    source = getDirectory("Quellenverzeichnis angeben");  
    dest = getDirectory("Zielverzeichnis angeben");  
    list = getFileList(source);  
    setBatchMode(true);  
    for (i=0; i<list.length; i++) {  
        filename = source+list[i];  
        open(filename);  
        run("Subtract Background...", "rolling=50");  
        deconCommand="image="+list[i]+" point=PSF  
            output=Deconvolved show log perform detect  
            wiener=0.000 low=1 z_direction=1 maximum=70  
            terminate=0.010";  
        run("Iterative Deconvolve 3D", deconCommand);  
        dotIndex=lastIndexOf(filename, ".");  
        if (dotIndex!=-1)  
            filename = substring(filename, 0, dotIndex);  
        save(dest+"decon_"+list[i]+".tif");  
    }  
    close();  
}
```

Abb. 2.4: Makro "Batch Deconvolution"; bei Maximum Bildern einer Antikörperfärbung werden zunächst die Hintergründe herausgerechnet und im Anschluss die Dekonvolution durchgeführt; fertig prozessierte Bilder werden in einem Zielverzeichnis gespeichert, und sogleich mit dem nächsten Bild fortgefahren.

```
macro "Batch ExamineThreshold" {
    src_green = getDirectory("Quellverzeichnis GRUEN angeben");
    src_red = getDirectory("Quellverzeichnis ROT angeben ");
    dest = getDirectory("Zielverzeichnis angeben ");
    list_g = getFileList(src_green);
    list_r = getFileList(src_red);
    setBatchMode(true);
    for (i=0; i<list_g.length; i++) {
        green = src_green+list_g[i];
        red = src_red+list_r[i];
        open(green); run("Green"); run("RGB Color");
        open(red); setAutoThreshold(); run("Red"); run("RGB
            Color");
        run("Merge Channels...", "red="+list_r[i]+" green="+
            list_g[i]+" blue=*None* gray=*None* create keep");
        run("Concatenate ", "title=[Concatenated Stacks]
            image_1="+list_g[i]+" image_2="+list_r[i]+" image_3=
            RGB image_4=[-- None --]");
        save(dest+"c_"+i+1+".tif");
    }
}
```

Abb. 2.5: Makro "Batch ExamineThreshold"; fertig prozessierte Zellbilder und Antikörper-Bilder (die hier desweiteren mit dem Auto Threshold bearbeitet werden) werden zuerst in RGB umgewandelt, dann per "RGB Merge" zu Composites zusammengeführt und anschließend ein Stack zur Auswertung hergestellt mit der Bildreihenfolge: Grüne Zelle, rote Threshold-Antikörperfärbung, Composite; Wiederholung für alle Bilder in den Quellenverzeichnissen.

Batch-No.	Type	Cell-No.	Synapses	Length (µm)	Synapses/µm	Mean ratio
09jan28	Vcontrol14	1	7	19,792	0,353678254	0,51468302
			10	10,688	0,935628743	
			5	16,368	0,305474096	
			10	21,554	0,463951007	
		2	5	16,084	0,310867943	0,2970726
			7	28,49	0,245700246	
			5	14,941	0,334649622	
			3	9,053		

Abb. 2.6: Auszug aus einem Excel-Sheet zur primären Datenerhebung; Batch-No.: Ansatz 28, ausplattiert im Januar 2009; Type: VGAT Kontrolle an DIV14; Cell-No.: Laufende Nummer der ausgewerteten Zelle; Synapses: Ausgezählte Synapsenzahl; Length (µm): Länge des gemessenen Abschnittes in µm; Synapses/µm: Durchschnittliche Synapsenzahl für den betrachteten Dendritenabschnitt; Mean ratio: Mittelwert in Synapses/µm für die gemessenen Dendritenabschnitte insgesamt für die betrachtete Zelle; *Beachte: die vierte Messung von Zelle 2 wurde ausgeschlossen wegen zu geringer Länge - $9,053\mu\text{m} < 10\mu\text{m}$*

2.7 Auswertung und Statistik

Zuerst mussten Kriterien festgelegt werden, anhand derer bei der folgenden manuellen Auszählung der Synapsen entschieden wurde, ob ein Punkt als Synapse gezählt wurde oder nicht. Folgende Voraussetzungen mussten erfüllt sein:

- Der gezählte Punkt musste >1 Pixel an Größe sein (Annahme eines Artefakts bei 1 Pixel Punkten)
- Der Punkt durfte nicht weiter als $0,25\mu\text{m}$ von Soma/Dendrit der Zelle entfernt sein
- Dendritenabschnitte $<10\mu\text{m}$ in Länge wurden von der Statistik ausgeschlossen (Annahme einer geringen Repräsentativität)
- Es sollten so viele Dendritenabschnitte wie möglich pro Zelle gemessen werden

Für diesen ersten Schritt der Datenerhebung wurde Microsoft Excel verwendet. Ebenso wurden hier erste Mittelwert-Berechnungen vorgenommen (Abb. 2.6).

Für die Ausmessung der Abschnitte in der Einheit Mikrometer musste in ImageJ das Verhältnis von Pixeln zu Mikrometer festgelegt werden. Analyze->Set Scale: Bei einer Vergrößerung von 63x und einer Auflösung von 696x520 Pixeln betrug das Verhältnis 1 Pixel / $0,0738$ Mikrometer.

Die Einstellungen wurden deshalb wie folgt vorgenommen: Distance in Pixels = 1.0; Known Distance = 0.0738; Pixel Aspect ratio = 1.0; Unit of Length = µm.

2.7.1 Quantifizierung von somatischen Synapsen

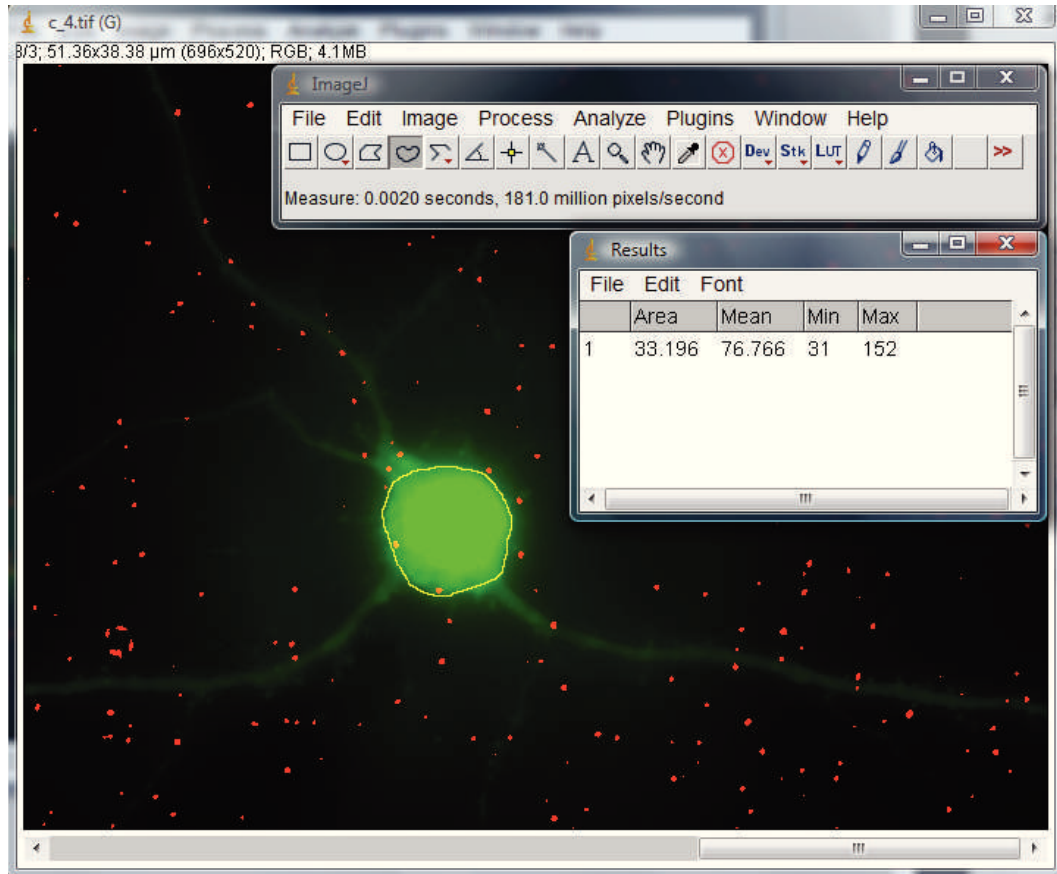


Abb. 2.7: Ausmessung des Somas, um die gezählten Synapsen mit der Fläche in Verhältnis setzen zu können; Die Fläche war hier $\text{Area}=33,196\mu\text{m}^2$

Für die Markierung des Somas musste aufgrund der Form- und Variationsbreite der Zellen das Freehand Selection Tool verwendet werden. Dafür wurde der Bereich des Somas manuell mit der Maus umfahren, um den Bereich zu markieren. Die Ausmessung und Ausgabe in Mikrometer übernahm im Anschluss ImageJ (Abb. 2.7). Im Results-Fenster war der Area-Wert von Interesse. Er wurde, zusammen mit der ausgezählten Anzahl von Synapsen (Kriterien s. 2.7) in das Excel-Sheet übernommen.

Alle Zellen, die das selbe Alter (7 oder 14 Tage) und dieselbe Behandlung aufwiesen (Knockout / Kontrolle, Antikörperfärbung), wurden in SigmaPlot in Gruppen übernommen und dort weiter ausgewertet.

2.7.2 Quantifizierung von dendritischen Synapsen

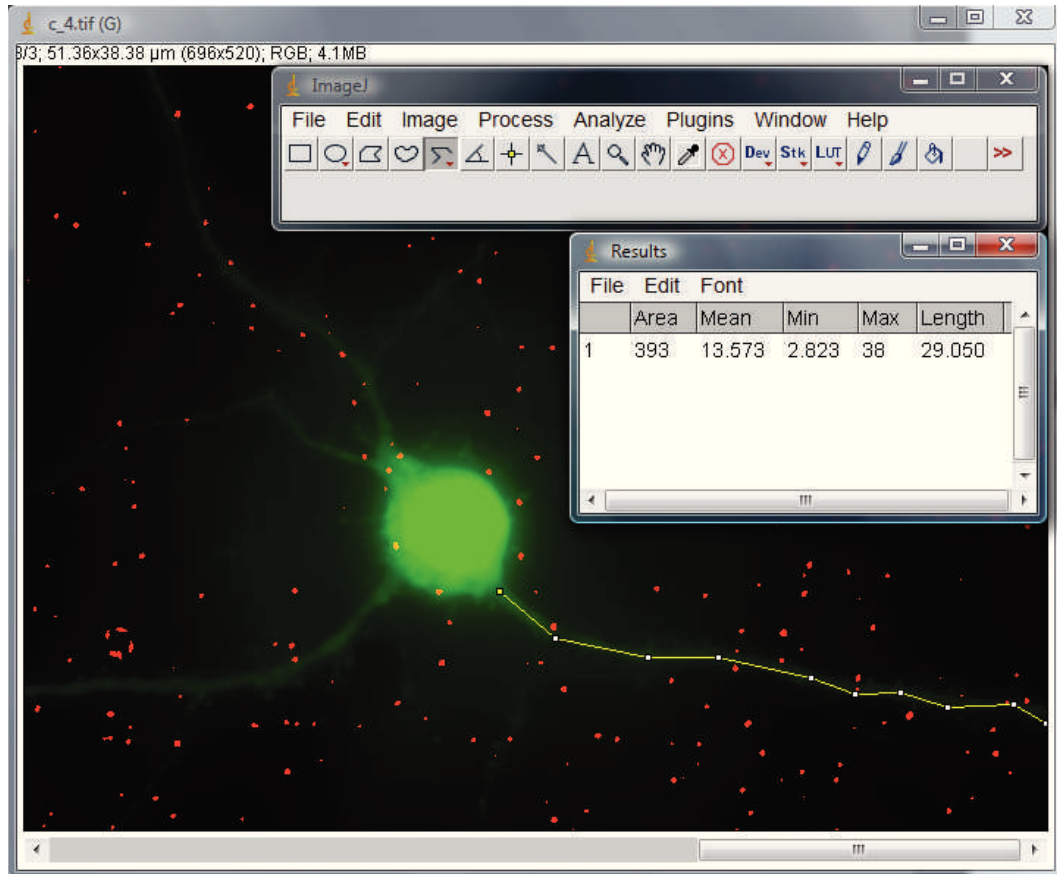


Abb. 2.8: Ausmessung der Länge eines Dendriten, um diese mit der gezählten Zahl von Synapsen in Verbindung setzen zu können; Der Messwert war hier Length = 29,050µm

Die Ausmessung der Dendritenlängen wurde mit dem Segmented Line Tool in ImageJ vorgenommen. Das Programm übernahm dann die Umsetzung in Mikrometer. Dabei wurden so viele Dendriten wie möglich auf einem Bild ausgewertet (Abb. 2.8).

Gemessener Dendrit und zugehörige Synapsenzahl (Kriterien s. 2.7) wurden in ein Excel-Sheet übernommen. Wenn dabei eine Länge unter 10µm gemessen wurde, wurde diese aus der weiteren Berechnung herausgenommen (s.o.) Pro Zelle wurde dann aus den Synapsendichten der einzeln gemessenen Dendriten ein Mittelwert für die gesamte Zelle errechnet und in SigmaPlot übernommen, um weiter statistisch auswerten zu können.

2.7.3 Statistische Auswertung

Für die Signifikanztests wurde SigmaPlot 11.0 verwendet. Die Werte wurden sortiert und eingelesen nach Zellalter zum Zeitpunkt der Messung, Antikörperfärbung, Kontrolle/Knockout und somatischer/dendritischer Messung.

Nun wurde ein ungepaarter t-Test mit der Fragestellung eines Unterschiedes zwischen den zwei betrachteten Gruppen (jeweils ein Kontrolle-Knockout Vergleich) durchgeführt. Im Rahmen dieser Verarbeitung wurde zunächst auf eine Normalverteilung und ähnliche Varianz geprüft, damit die Grundlage zu einem aussagekräftigen t-Test geschaffen wurde; erst danach folgte der eigentliche Signifikanztest. Zu den weiterhin errechneten Werten gehörte das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Standardfehler. Aus diesen Auswertungen konnten im Anschluss Graphen erstellt werden zur besseren Darstellung der Ergebnisse (s. dort).

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der EcadFlox Mausföten

Die für sämtliche Experimente verwendete homozygote Ecad flox Mauslinie beinhaltete bei Übernahme von Boussadia et al. in den Introns 5 und 10 jeweils eine loxP-Site, was insgesamt einem um 90bp längeren Genabschnitt entspricht. Diese Veränderung musste homozygot vorliegen, da nur dann ein ausreichender E-cadherin Knockout in den späteren Schritten erreicht werden konnte. Eine Kontrolle dieser Homozygotie war somit unerlässlich. Zu diesem Zweck wurde im ersten Schritt der Bereich zwischen Intron 5 und 10 des CDH1 Gens mit dem Forward-Primer pE10.2 und dem Reverse-Primer pE11as.2 vervielfältigt und auf einem Agarose-Gel aufgetragen (Abb. 3.1).

Bei den GVO Tieren zeigte sich im Gegensatz zu der Wildtyp-Probe eine leicht verringerte Laufstrecke im Gel. Doppelbanden oder verbreiterte Banden aufgrund einer eventuellen Heterozygotie zeigten sich nicht. Danach wurden die Proben einem Restriktionsenzymverdau durch EcoR1 unterzogen, dessen Restriktionssite im Rahmen der Einführung der loxP-Sites neu entstanden war (Abb. 3.2).

Die von den gentechnisch veränderten Mäusen stammenden Proben zeigten zwei Spaltprodukte als Ergebnis, die Wildtyp-Kontrolle wurde nicht geschnitten und zeigte somit lediglich eine Bande. Zusätzliche Banden, aufgrund von nicht geschnittenen Wildtyp-Allelen in den GVO Proben, zeigten sich nicht. Es war somit von einer Homozygotie für das Ecad flox Gen in den untersuchten Tieren auszugehen, und damit auch der grundsätzlichen Möglichkeit, das E-Cadherin Gen durch die Cre-Rekombinase konditional auszuschalten.

Mittels eines Westernblots wurde darüber hinaus die vorhandene Expression von E-Cadherin sowohl in Ecad flox- als auch Wildtyp- Massenkulturen an DIV7 nachgewiesen (Abb. 3.3). Hierbei ergab sich ebenfalls kein wesentlicher Unterschied im Maße der Expression, soweit durch den Westernblot beurteilbar.



Abb. 3.1: PCR des CDH1-Genabschnittes Intron 5 bis 10; Probe 1-9: EcadFloX; 1: 01.12.2008, 2: 12.01.2009, 3: 19.01.2009, 4: 26.01.2009, 5: 02.02.2009, 6: 16.03.2009, 7: 23.03.2009, 8: 30.03.2009, 9: 27.04.2009; WT: Wildtyp; X: Leerprobe; zu sehen ist die weitere Lauflänge des Wildtyps im Vergleich zu den größeren EcadFloX Produkten; durchgeführt von *Martina Bohndorf*, Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

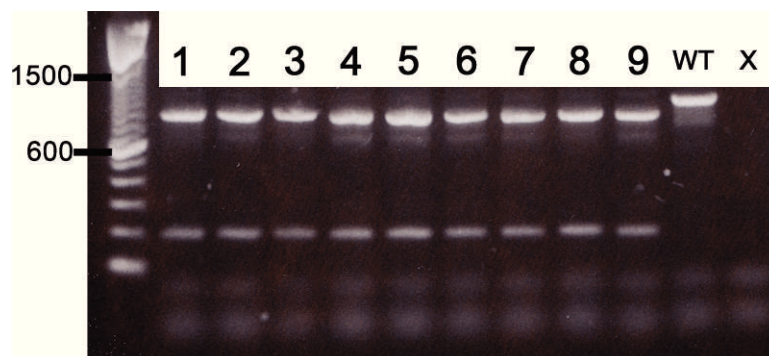


Abb. 3.2: Restriktionsverdau des PCR Produkts aus Abb. 3.1; Probe 1-9: EcadFloX; WT: Wildtyp; X: Leerprobe; Die gefloXten Proben sind durch EcoR1 geschnitten worden, der Wildtyp nicht; durchgeführt von *Martina Bohndorf*, Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

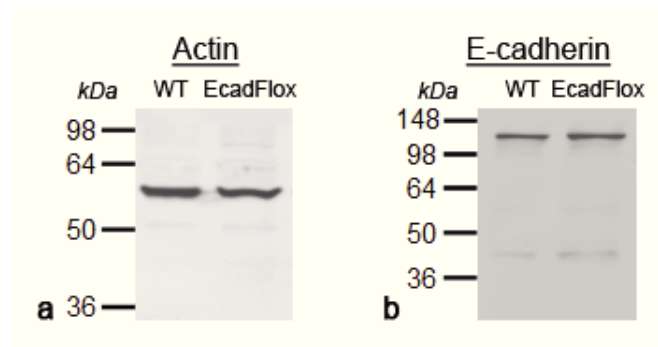


Abb. 3.3: Westernblot; **a**: Actin-Kontrolle, **b**: E-Cadherin Nachweis: Ecad-Bande bei ~120kDa, CTF1-Bande bei ~40kDa als Kreuzreaktivität des Antikörpers; Sowohl in Wildtyp-, als auch in EcadFlox-Massenkulturen wurde Actin exprimiert, selbiges gilt für die Expression von E-Cadherin; Antikörper bei *b*: rabbit polyclonal anti-E-Cadherin-Ak, Abcam ab53033; durchgeführt von *Dr. Aksana Andreyeva*, Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf;

3.2 Ermittlung des Vektorenverhältnisses zur Kotransfektion

Mittels des Transfektionsreagens Lipofectamine 2000 war es möglich, Zielzellen nicht nur mit einem Vektor zu transfizieren, sondern auch mit einem weiteren kotransfizieren. Diese Tatsache war für die folgenden Experimente von zentraler Bedeutung.

In der Kontrollgruppe wurden die Zellkulturschalen ausschließlich mit EGFP-N1 transfiziert, was zwar eine Identifizierung transfizierter Zellen ermöglichte, jedoch keinen Einfluss auf die E-Cadherin-Expression hatte. In der eigentlichen Experiment-Gruppe sollte der Vektor EGFP-N1 mit dem Fluorophor GFP der Identifizierung der transfizierten Zellen in der Massenkultur dienen, - der Vektor pBS598, mit dem Fusionsprotein CreGFP dem konditionalen Knockout der E-Cadherin Expression. Jedoch war dadurch keine Kontrolle über die tatsächliche Expression von CreGFP möglich: Sowohl das vorwiegend nukleär lokalisierte CreGFP als auch das homogen über die Zelle verteilte GFP leuchten grün und sind optisch nicht voneinander zu unterscheiden.

Es musste deshalb ein Verhältnis der Vektorenzugabe gefunden werden, in dem im Großteil der Zellen eine Kotransfektion als erfolgreich *anzunehmen* war, obwohl sie im eigentlichen späteren Experiment nicht mehr direkt kontrolliert werden konnte.

Zur Erprobung dieses Verhältnisses wurden Massenkulturen kotransfiziert mit den Vektoren pDsRed2-N1, der für das rot leuchtende Fluorophor DsRed2 codiert, und pBS598, also

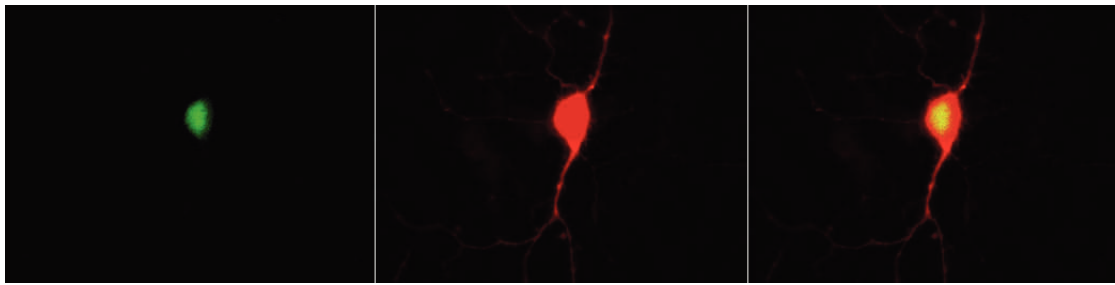


Abb. 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines mit pDsRed2-N1 und pBS598 kotransfizierten Neurons; Kotransfektion an DIV4, Aufnahme an DIV7; Das CreGFP ist vorwiegend im Nukleus lokalisiert, wohingegen das DsRed2 homogen über die gesamte Zelle verteilt ist

dem Fusionsprotein CreGFP (Abb. 3.4). Dabei wurde ein Verhältnis der Vektoren gewählt, dem ein starker Überschuss von pBS598 zugrunde lag. Dementsprechend waren viele nukleär grün leuchtende Zellen zu erwarten, und lediglich wenige homogen rot leuchtende Zellen. Diese roten Zellen sollten durch das Vektorenverhältnis überdies kotransfiziert worden sein. Diese Überlegung wurde im Lauf der Experimente fluoreszenzmikroskopisch als statthaft identifiziert, obwohl eine einfache Transfektion der Zellen mit pDsRed2-N1 natürlich ebenso möglich, wenn auch nicht so wahrscheinlich, war.

Das Verhältnis von pBS598 und pDsRed2-N1 in diesem Kontrollexperiment betrug 5:1.

Nach Transfektion an DIV4, wurde der Erfolg überprüft an DIV7. Dabei wurde unter Zuhilfenahme des Rot-Filters nach erfolgreich mit pDsRed2-N1 transfizierten Zellen gesucht, die in der Unterzahl der insgesamt transfizierten Zellen, aber erwartungsgemäß erfolgreich kotransfiziert sein sollten (s.o.) Danach wurde umgeschaltet auf den Grün-Filter, und damit die CreGFP Expression im Nukleus verifiziert.

Die Auswertung zeigte, dass von insgesamt 175 beobachteten transfizierten Neuronen, 171 erfolgreich kotransfiziert waren, und lediglich 4 Neurone ausschließlich eine DsRed2 Expression aufwiesen (Abb. 3.5). Diese “Kotransfektions-Versager” wiesen jedoch eine sehr schwach ausgeprägte Expression der Vektoren insgesamt auf, sodass es gut möglich ist, dass in Wirklichkeit dennoch eine Kotransfektion, wenn auch nicht zweifelsfrei feststellbar, stattgefunden hat. Insgesamt gesehen entspricht aber auch die Auswertung in der gegenwärtigen Form einer Kotransfektions-Effizienz von $\sim 97,7\%$.

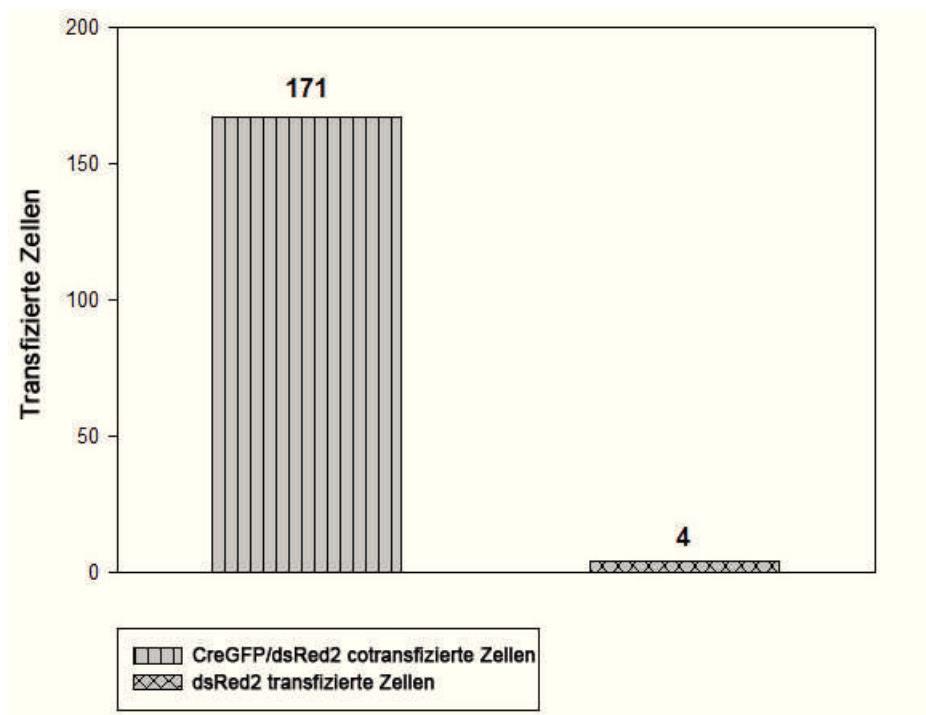


Abb. 3.5: Kotretransfektions-Kontrolle; Ecad flox Neurone, an DIV4 kotretransfiziert, an DIV7 ausgewertet; Balkendiagramm mit absoluten Häufigkeiten

3.3 Somatische Expression

Nach Transfektion der Zellkulturen an DIV4 wurde die Ausbildung der glutamatergen und GABAergen Synapsen zunächst am Soma untersucht. Dies geschah an DIV7 und DIV14 (Abb. 2.2b/c). Dabei wurde die absolut ausgezählte Anzahl an Synapsen auf die ausgemessene Fläche des Somas in μm^2 bezogen und anschließend mit 20 multipliziert, um eine bessere Lesbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Einheit der folgenden Auswertungen ist somit Synapsen pro $20\mu\text{m}^2$.

Für Kontroll- und Knockout-Gruppe wurden in beiden Fällen EcadFlox Neuronen zwecks Vergleichbarkeit verwendet. Die Transfektion geschah in der Kontrollgruppe mit EGFP-N1; in der Knockoutgruppe zusätzlich mit pBS598, um additiv den Knockout von E-Cadherin konditional herbeizuführen.

Danach fand die Antikörperfärbung mit spezifischen Vesikelmarkern statt: Für glutamaterge Synapsen wurde das VGLUT1 Protein (*Vesicular Glutamate Transporter 1*) als Marker gewählt, das den Glutamat-Uptake in synaptische Vesikel an der Präsynapse übernimmt. Zur Darstellung der GABAergen Synapsen fand ein Antikörper gegen das VGAT Protein (*Vesicular GABA Transporter*) Einsatz. VGAT transportiert GABA in die synaptischen Vesikel, ähnlich wie das bereits erwähnte Gegenstück an glutamatergen Synapsen.

3.3.1 VGLUT1 positive Synapsen am Soma

Zunächst wurde die Expression von somatischen glutamatergen Synapsen mittels Marker VGLUT1 in Kontroll- und Knockout-Gruppe untersucht.

An DIV7 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,626$), wobei die Kontrollgruppe einen Durchschnitt von 5,651 und die Knockout-Gruppe 5,972 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$ aufwies (Abb. 3.6, sowie Abb. 3.8, Abb. 3.9).

Weitere Werte: Kontrollgruppe $n=26$, Standardabweichung 2,4 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$, Standardfehler 0,471 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$; Knockout-Gruppe $n=25$, Standardabweichung 2,274 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$, Standardfehler 0,455 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$.

Der geringe Unterschied und die nicht gegebene Signifikanz sprechen für eine normale Entwicklung und Ausbildung der VGLUT1 positiven glutamatergen Synapsen am Soma bis zum Zeitpunkt der Messung. Da aber ein eventuell gering ausgeprägter Effekt infolge des E-Cadherin Knockouts erst durch die fehlende *Neuausprägung* von Synapsen zutage treten könnte, wurden weitere Untersuchungen sieben Tage später, an DIV14, durchgeführt und ebenfalls miteinander verglichen. Somit konnte die quantitative Entwicklung der

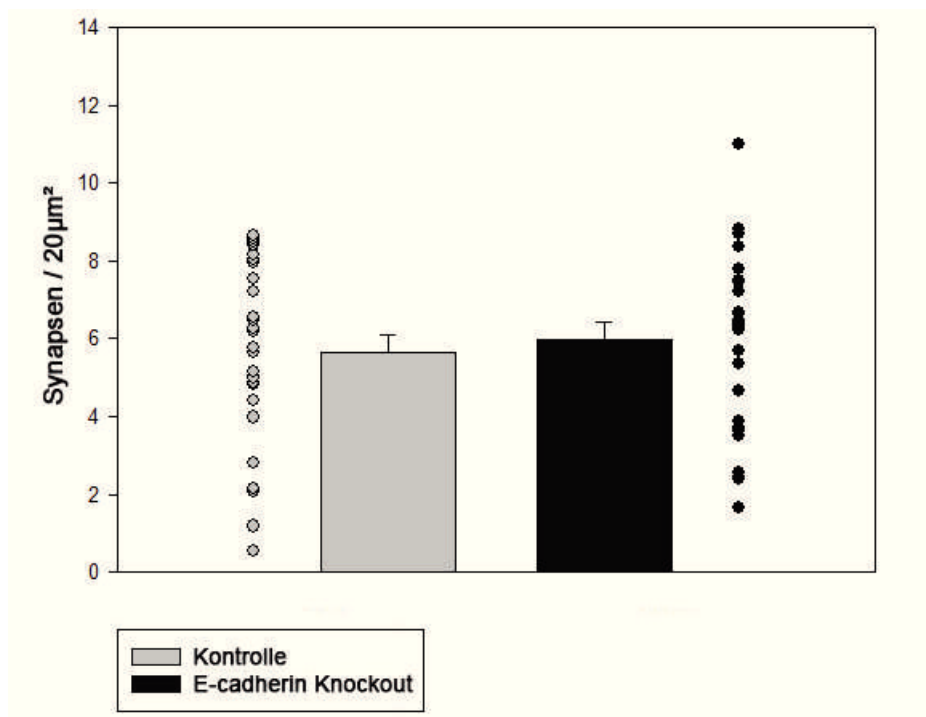


Abb. 3.6: Somatische Glutamat Synapsen, DIV7, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots; Färbung mit anti-VGLUT1, s. 2.5.1

Synapsen erfasst und verglichen werden.

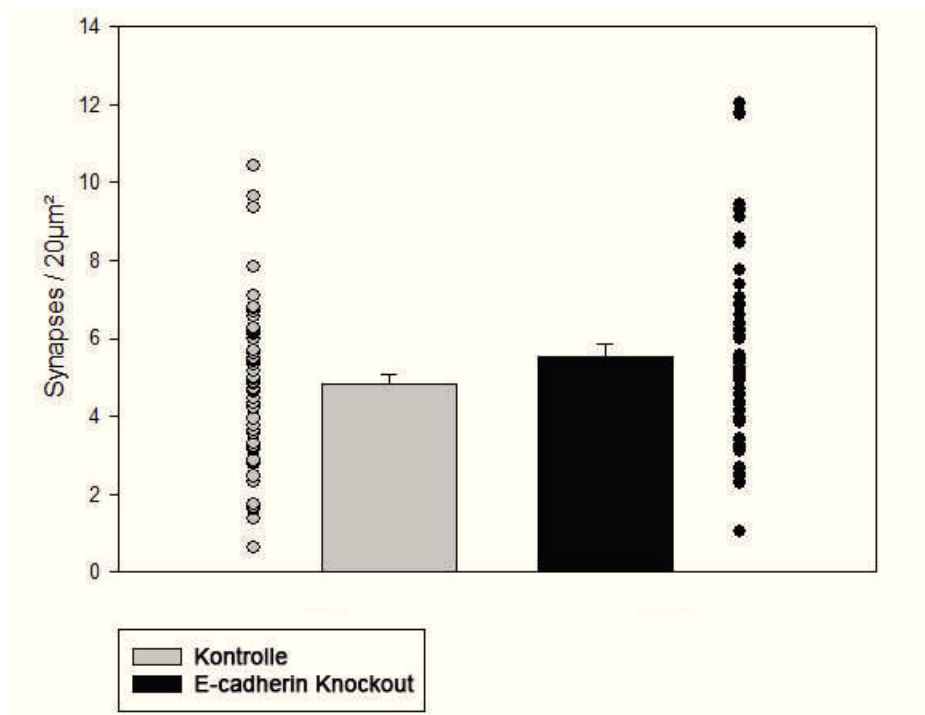


Abb. 3.7: Somatische Glutamat Synapsen, DIV14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots; Färbung mit anti-VGLUT1, s. 2.5.1

An diesem zweiten Messzeitpunkt ergaben sich wiederum keine signifikanten Unterschiede in den betrachteten Gruppen in den pro μm^2 ausgebildeten Synapsen ($p=0,077$, Abb. 3.7, sowie Abb. 3.10, Abb. 3.11): Durchschnittlich 4,827 in der Kontroll- und 5,540 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$ in der Knockout-Gruppe. Da diese Werte auf die Somafläche bezogen sind, und das Zellsoma bei längerer Kultivierung anwächst, blieb das Verhältnis von Synapsenzahl zu Fläche erwartet in einem ähnlichen Rahmen, wie an DIV7.

Weitere Werte: Kontrollgruppe $n=59$, Standardabweichung 1,998 und Standardfehler 0,260 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$. Knockout-Gruppe $n=55$, Standardabweichung 2,264 und Standardfehler 0,305 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$.

Der E-Cadherin Knockout hat somit keinen nachweisbaren Effekt auf die Ausprägung glutamaterger Synapsen am Soma.

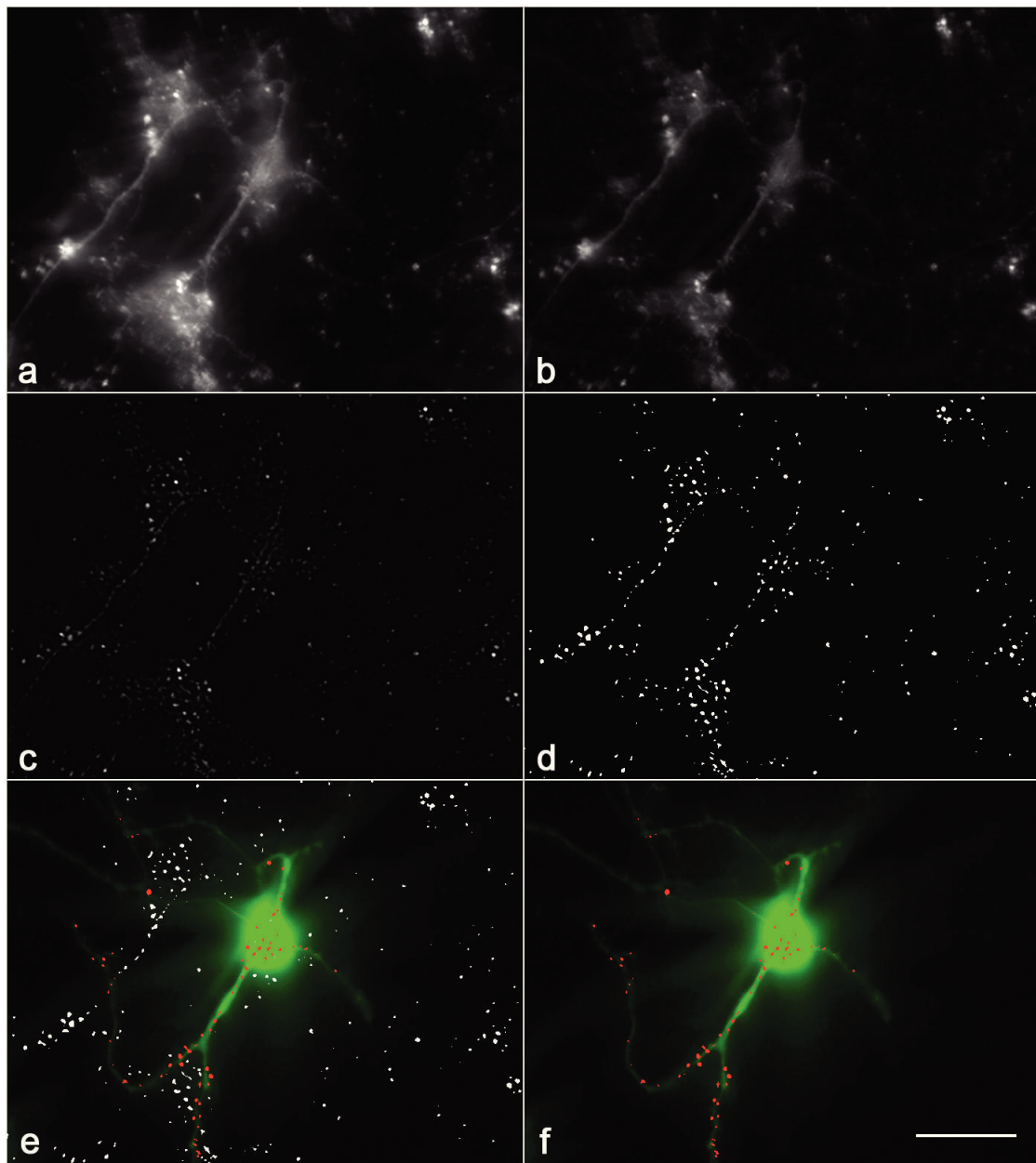


Abb. 3.8: Kontrolle, VGLUT1 Färbung, DIV7; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10 μ m; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Besserung Übersichtlichkeit

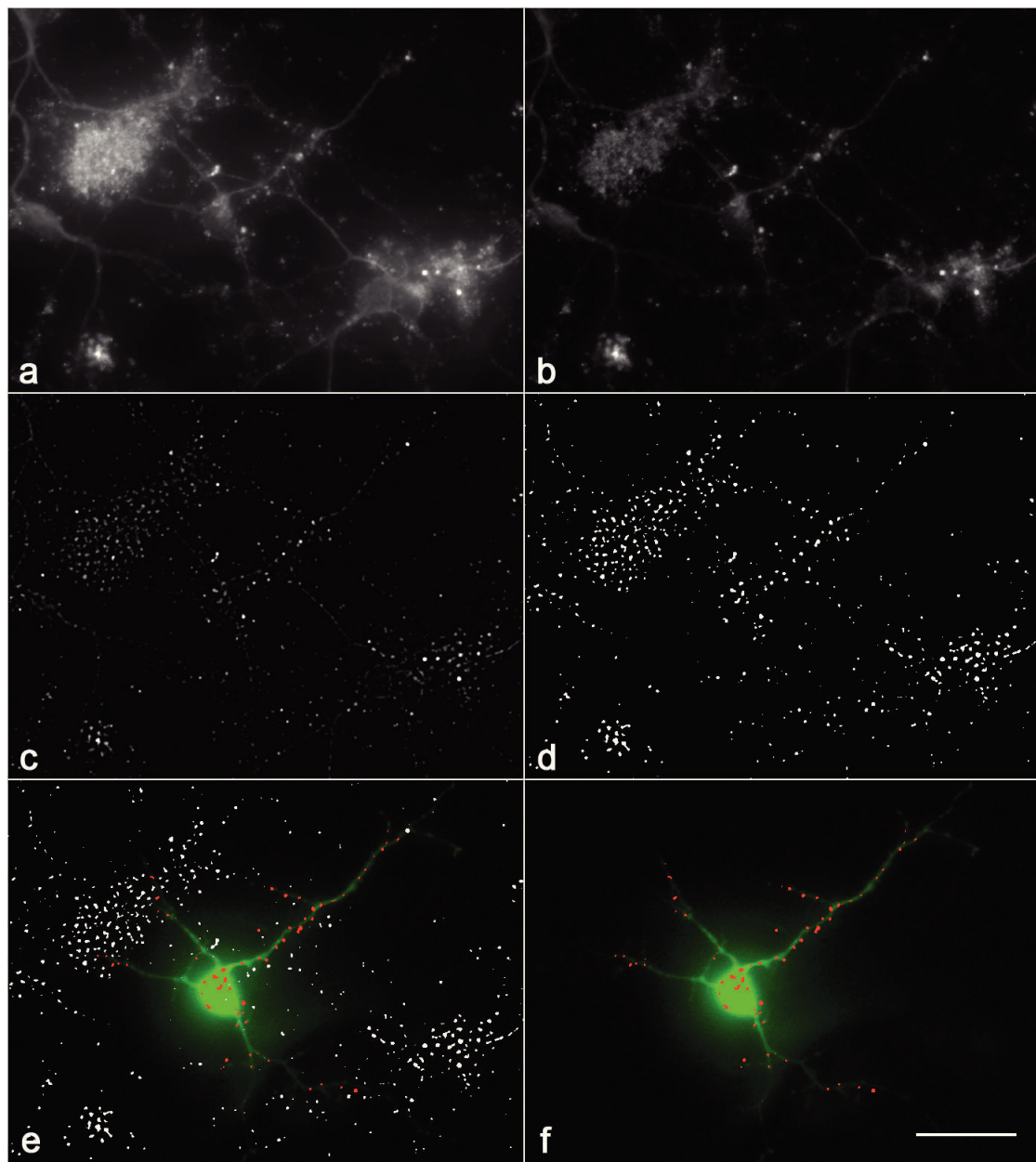


Abb. 3.9: E-Cadherin Knockout, VGLUT1 Färbung, DIV7; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10µm; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Besserung Übersichtlichkeit

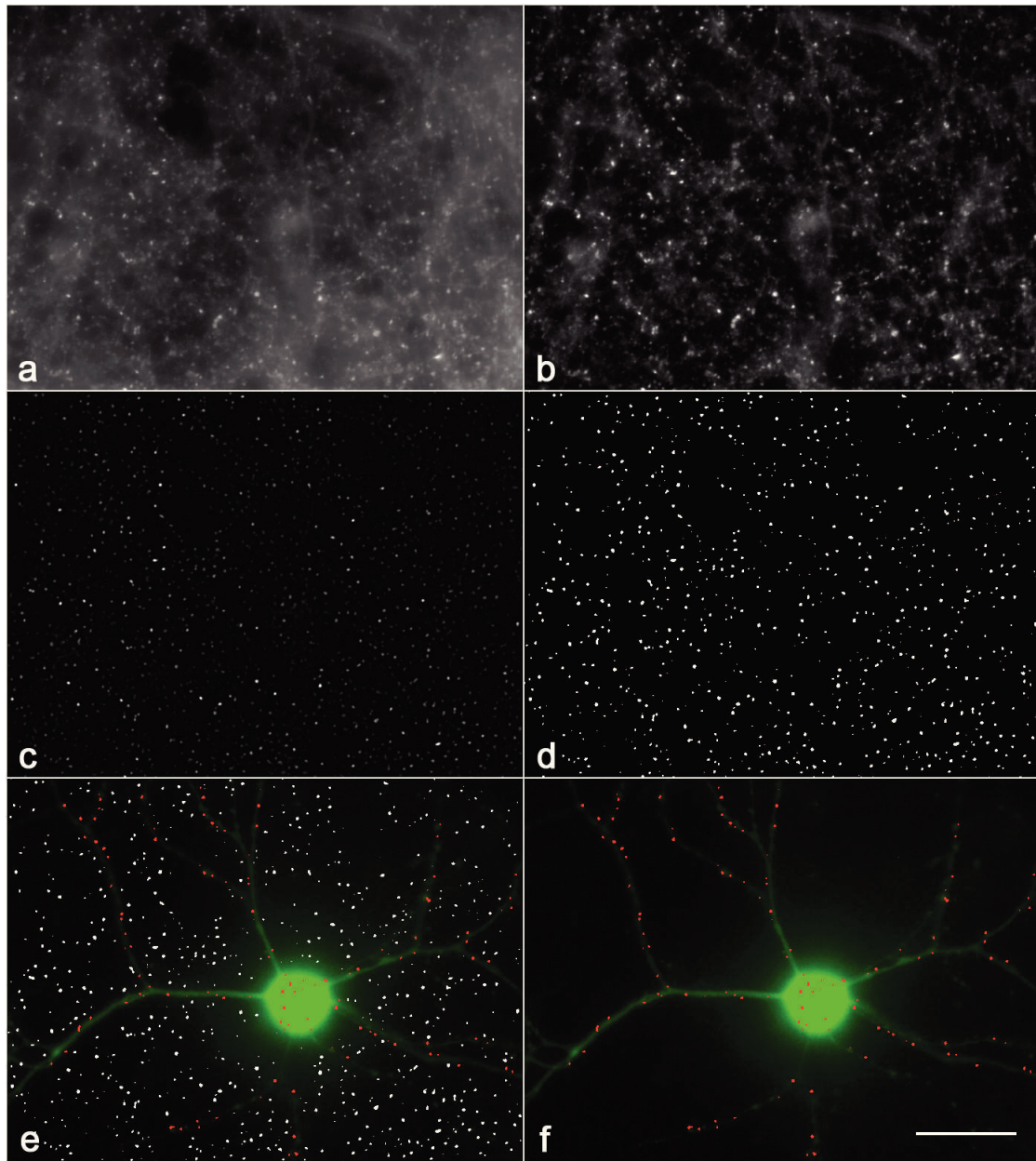


Abb. 3.10: Kontrolle, VGLUT1 Färbung, DIV14; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10 μ m; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Besserung Übersichtlichkeit

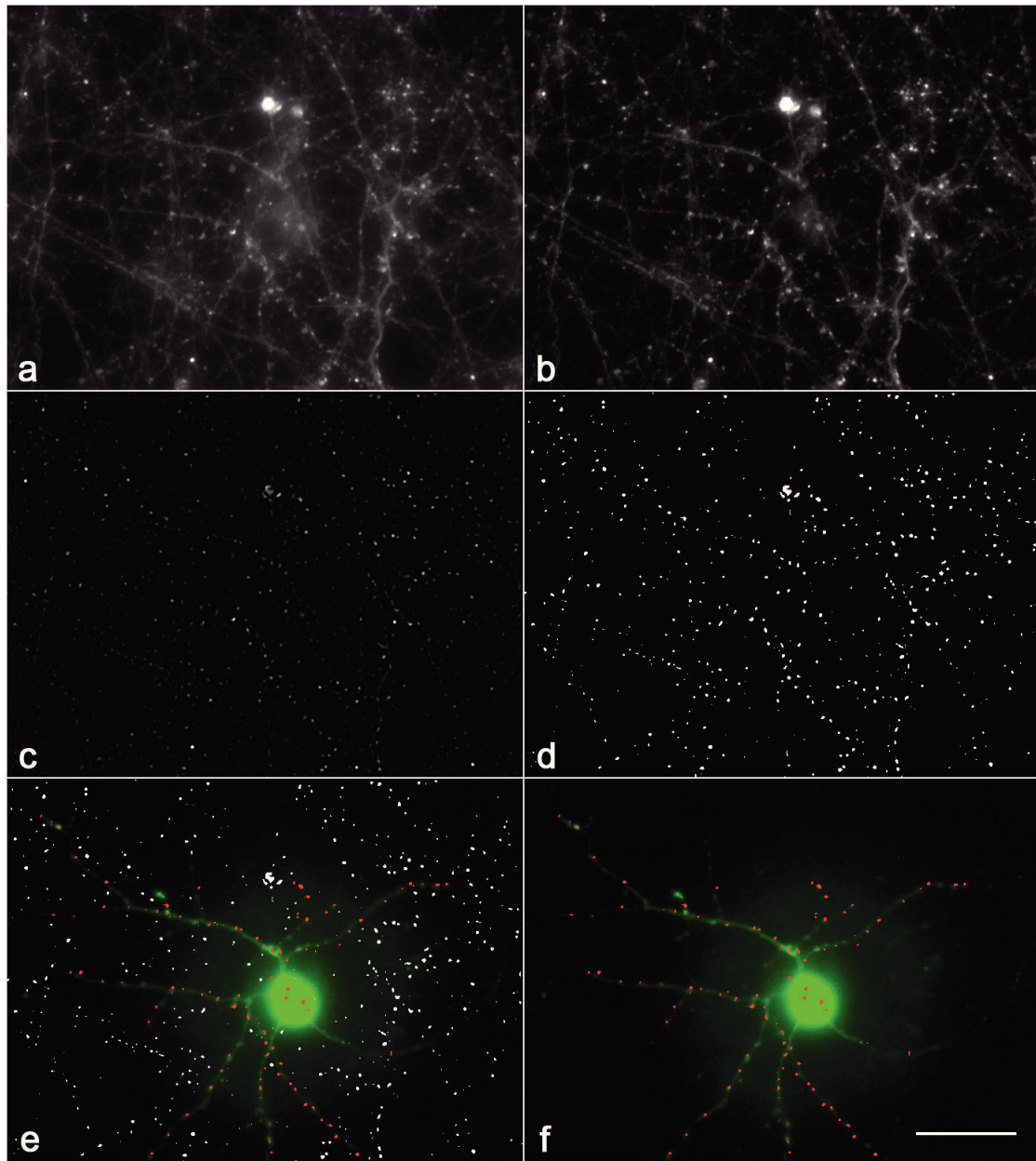


Abb. 3.11: E-Cadherin Knockout, VGLUT1 Färbung, DIV14; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10µm; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Verbesserung Übersichtlichkeit

3.3.2 VGAT positive Synapsen am Soma

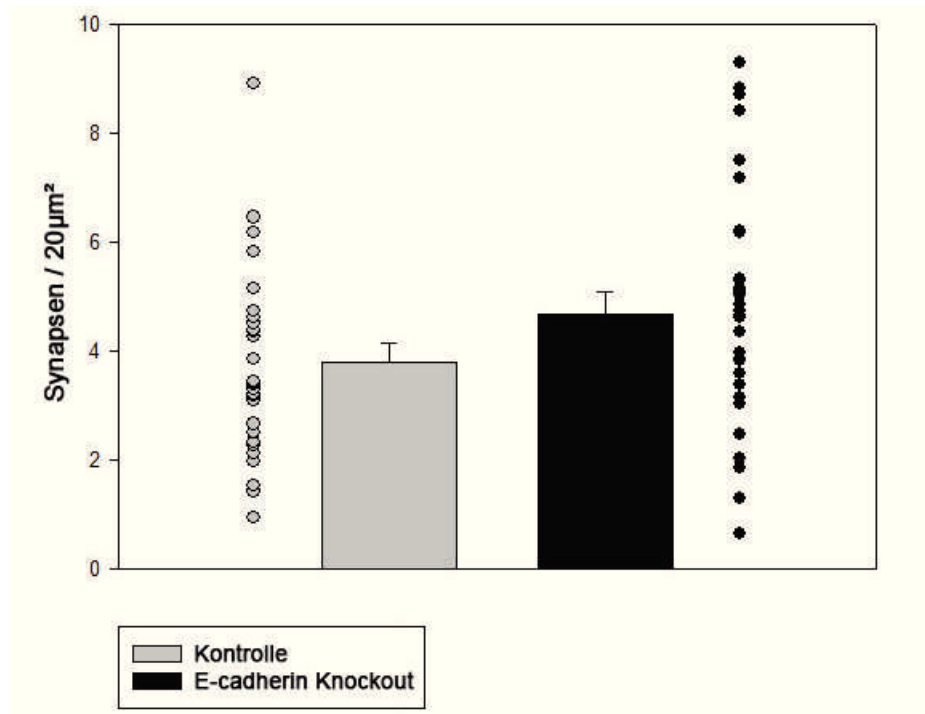


Abb. 3.12: Somatische GABA Synapsen, DIV7, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots; Färbung mit anti-VGAT, s. 2.5.2

Dass die Ausbildung der somatischen glutamatergen Synapsen von dem Knockout nicht betroffen war (s. 3.3.1), war laut Studienlage zu erwarten. Eine Funktion in dieser Umgebung spielt das N-Cadherin[9], was aber im vorliegenden Ansatz in normalem Umfang exprimiert wurde. Allerdings ist in GABAergen Neuronen beta-Catenin nachweisbar, bei gleichzeitiger *Abwesenheit* von N-Cadherin[9]. Es liegt somit nahe, dass ein anderes klassisches Cadherin, das ebenfalls an beta-Catenin binden kann, in diesen Neuronen vorhanden sein und Aufgaben übernehmen könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob es sich bei diesem Cadherin um E-Cadherin handeln könnte.

Deshalb wurde nun nach erfolgreichem Knockout von E-Cadherin an DIV4 (s. 2.4.5) zunächst die Expression der somatischen GABAergen Synapsen untersucht. VGAT wurde hier als vesikulärer Marker genutzt und mit dem entsprechenden Antikörper angefärbt (s. 2.5.2, sowie Abb. 3.14, Abb. 3.15).

An DIV7 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen: $p=0,110$. Die Synapsenzahl war insgesamt etwas geringer ausgeprägt als beim vorigen

VGLUT1 Experiment am Soma (s. 3.3.1). Die Menge der Synapsen betrug hier 3,813 in der Kontrolle und 4,676 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$ in der Knockoutgruppe (Abb. 3.12).

Weitere Werte: Kontrolle $n=29$, Standardabweichung 1,783 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$, Standardfehler 0,331 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$; Knockoutgruppe $n=30$, Standardabweichung 2,262 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$, Standardfehler 0,413 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$.

Die Testreihe wurde nun weiter verfolgt. An DIV14 wurden die GABAergen Synapsen erneut ausgezählt und auf die Somafläche bezogen. Das Verhältnis der Synapsen auf die Fläche blieb, wie beim vorigen Experiment mit den Glutamat-Synapsen, konstant. Auch hier ist sicher das wachsende Soma in Verbindung mit in ähnlichem Maß neu ausgebildete Synapsen, für dieses Ergebnis verantwortlich zu machen.

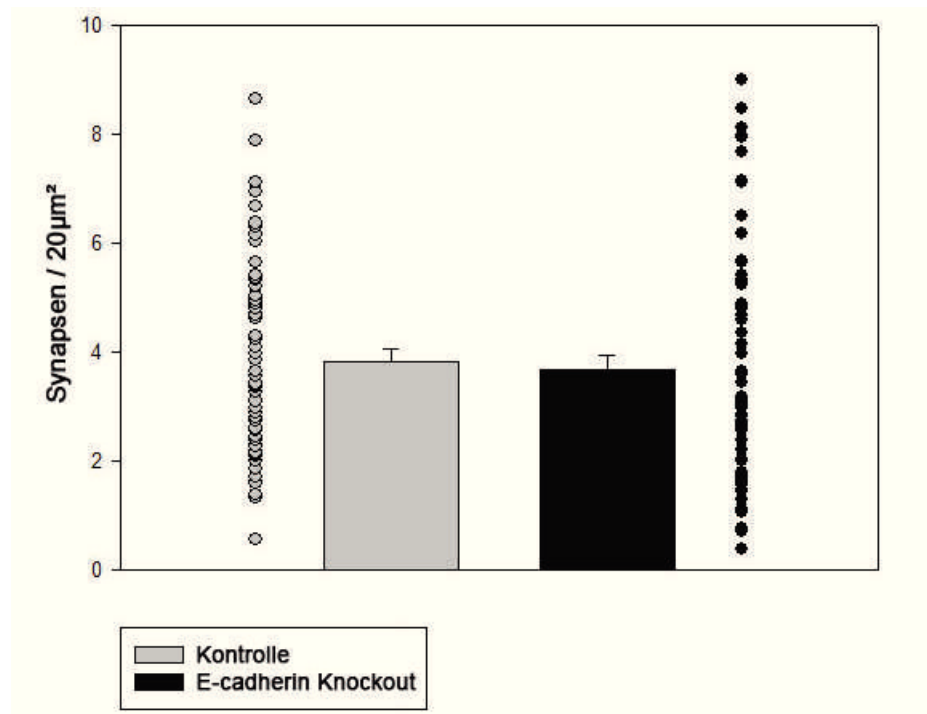


Abb. 3.13: Somatische GABA Synapsen, DIV14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots; Färbung mit anti-VGAT, s. 2.5.2

Ein Unterschied zwischen Kontrolle und Knockout ergab sich in dem hier untersuchten Aspekt nicht. Vielmehr war die Vergleichbarkeit der Gruppen noch viel stärker zu erkennen als zuvor: $p=0,705$. Die Kontrollgruppe wies ein arithmetisches Mittel von 3,821 und die Knockout-Gruppe von 3,684 Synapsen/ $20\mu\text{m}^2$ auf (Abb. 3.13).

Weitere Werte: Kontrolle n=59, Standardabweichung 1,813 Synapsen/20 μm^2 , Standardfehler 0,236 Synapsen/20 μm^2 ; Knockoutgruppe n=60, Standardabweichung 0,211 Synapsen/20 μm^2 , Standardfehler 0,272 Synapsen/20 μm^2 .

Zusammenfassend blieb das Verhältnis der GABAergen Synapsen pro Flächeneinheit Soma über den Zeitraum von 7 Tagen konstant; außerdem unterschieden sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten Kontroll- und Knockout-Gruppe nicht signifikant voneinander. Ein Knockout von E-Cadherin hatte in den durchgeführten Experimenten somit keinen nachweisbaren Einfluss auf die Neuausbildung somatischer GABAerger Synapsen.

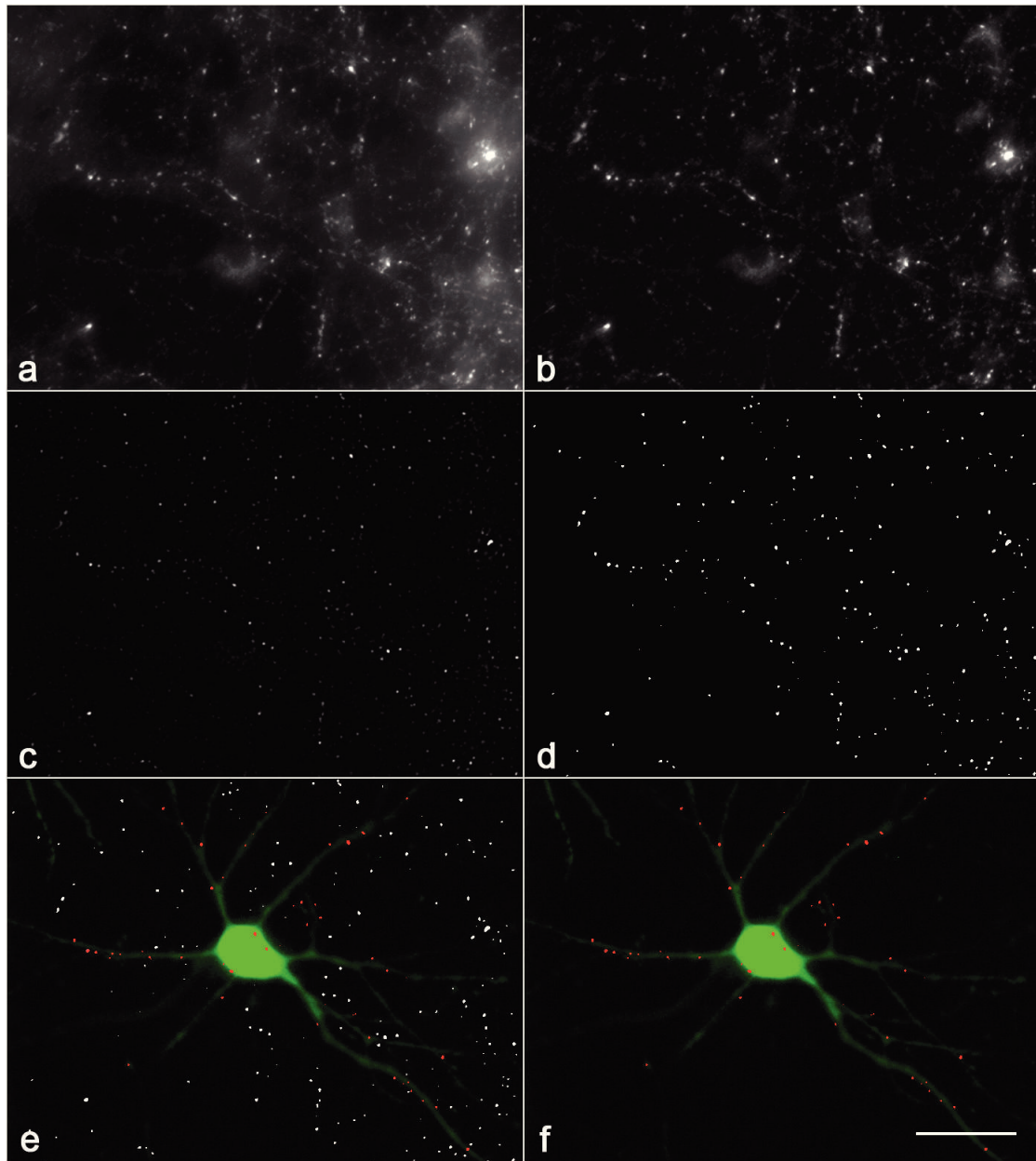


Abb. 3.14: Kontrolle, VGAT Färbung, DIV7; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10µm; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Besserung Übersichtlichkeit

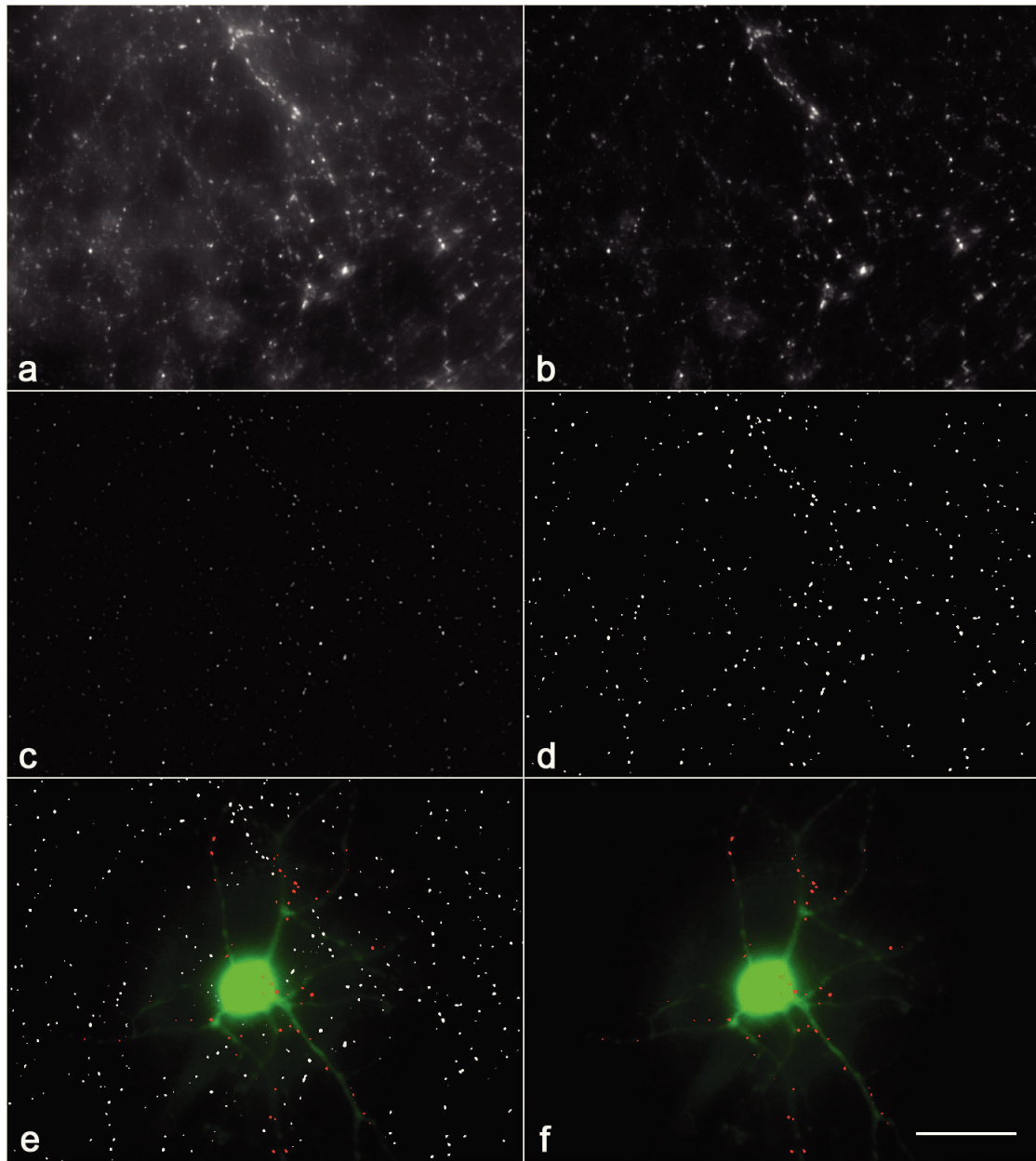


Abb. 3.15: E-Cadherin Knockout, VGAT Färbung, DIV7; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10 μ m; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Besserung Übersichtlichkeit

3.4 Dendritische Expression

Im Anschluss an die Evaluation der somatischen, wurden nun auch die dendritischen Synapsen untersucht und ausgezählt. Als Zeitpunkte der Auswertung wurden wieder DIV7 und DIV14 gewählt. Der Versuchsaufbau war identisch mit dem der somatischen Experimente. Ausschließlich EcadFlox Neuronen fanden Verwendung, die in der Kontrollgruppe mit EGFP-N1 und in der Knockoutgruppe zusätzlich mit pBS598 transfiziert wurden. Danach fand die Anfärbung mittels Antikörper von VGLUT1 als Marker für glutamaterge Synapsen, und VGAT für GABAerge Synapsen statt. Für ausführlichere Informationen diesbezüglich siehe Kapitel 2.4.5, beziehungsweise Abbildung 2.2b/c.

Die gezählten Synapsen-Punkte wurde auf die Länge des jeweils betrachteten, proximalen Dendritenabschnittes bezogen. Zur besseren Lesbarkeit wurden die sehr niedrigen Ergebnisse (<1 Synapse/ μm) mit 20 multipliziert. Die Einheit der Ergebnisse ist folglich "Synapsen pro 20 μm Länge des proximalen Dendriten".

Auf die proximalen Anteile wurde sich beschränkt, weil diese regelmäßig mit dem Mikroskop zu erfassen waren. Selbstverständlich sind Dendriten teils erheblich länger, als im vorliegenden Ansatz untersucht - jedoch wird rein technisch die Verfolgung und ordnungsgemäße Erfassung mit zunehmender Entfernung vom Soma schwieriger: Die distal schnell abnehmende Fluoreszenz begrenzt das Untersuchungsfeld; und die komplexen und für jede Zelle einzigartigen Aufgabelmuster der Dendriten würde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse negativ beeinflussen.

3.4.1 VGLUT1 positive Synapsen an den Dendriten

Zu Beginn wurden wieder die VGLUT1 Punkte ausgezählt und in ein Verhältnis mit der untersuchten Länge des Dendritenabschnittes gesetzt.

Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Gruppen an DIV7 ($p=0,755$). In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert bei 7,147 Synapsen/20 μm und die Knockoutgruppe bei 6,987 Synapsen/20 μm . Die Ähnlichkeit der Ergebnisse spricht für eine unbeeinträchtigte Ausbildung von glutamatergen Synapsen, auch 3 Tage nach dem Knockout an DIV4 (Abb. 3.16).

Weitere Werte: Kontrolle $n=34$, Standardabweichung 2,446 Synapsen/20 μm , Standardfehler 0,419 Synapsen/20 μm ; Knockoutgruppe $n=36$, Standardabweichung 1,806 Synapsen/20 μm , Standardfehler 0,301 Synapsen/20 μm .

Für die Erfassung eines möglichen Trends wurden die Synapsen an DIV14 erneut ausgezählt (Abb. 3.17).

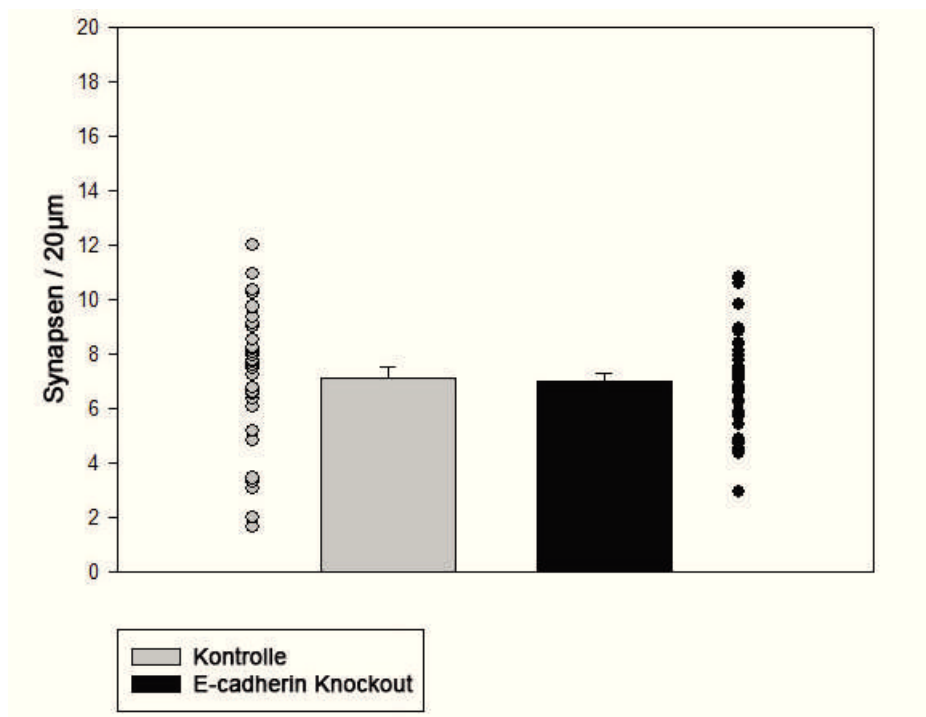


Abb. 3.16: Dendritische Glutamat Synapsen, DIV7, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots; Färbung mit anti-VGLUT1, s. 2.5.1

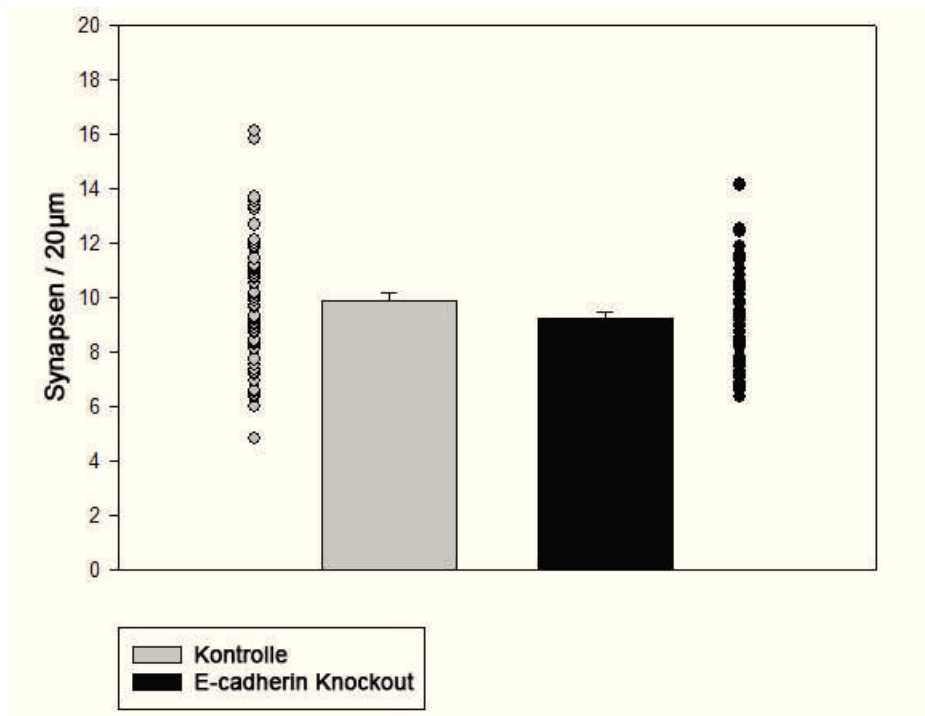


Abb. 3.17: Dendritische Glutamat Synapsen, DIV14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots; Färbung mit anti-VGLUT1, s. 2.5.1

Ein signifikanter Unterschied nach Knockout von E-Cadherin ließ sich erneut nicht nachweisen ($p=0,116$). Der Mittelwert in der Kontrollgruppe lag bei 9,872 Synapsen/20μm versus 9,252 Synapsen/20μm in der Knockoutgruppe.

Weitere Werte: Kontrolle $n=59$, Standardabweichung 2,339 Synapsen/20μm, Standardfehler 0,304 Synapsen/20μm; Knockoutgruppe $n=54$, Standardabweichung 1,757 Synapsen/20μm, Standardfehler 0,239 Synapsen/20μm.

Es konnten durch diesen Teil der Experimente mehrere Schlussfolgerungen gezogen werden. Erstens steigt die Dichte der glutamatergen Synapsen auf dem Dendriten über die Zeit an (vgl. Ergebnisse aus Kap. 3.3.1). Zweitens ist auch bei den VGLUT1 positiven dendritischen Synapsen (wie in der somatischen Auswertung) kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Knockoutgruppe nachweisbar. Es ist daher von einer regelhaften, unbeeinträchtigten Ausprägung glutamaterger Synapsen auszugehen, auch unter Knockout von E-Cadherin. Dieses Ergebnis erscheint nachvollziehbar, da bereits *N-Cadherin* der Plastizität glutamaterger Neuronen zugeschrieben wird[46].

3.4.2 VGAT positive Synapsen an den Dendriten

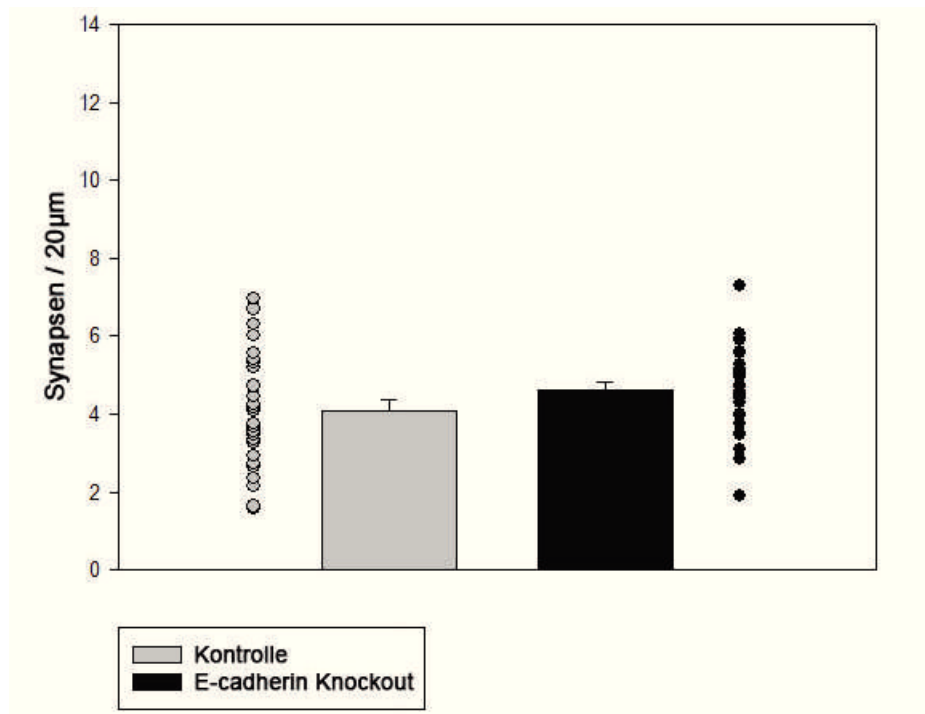


Abb. 3.18: Dendritische GABA Synapsen, DIV7, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots

Zum Abschluss der Experimente wurden die GABAergen dendritischen Synapsenzahlen ausgewertet. In beiden Gruppen wurden dabei 29 Zellen untersucht.

An DIV7 zeigte sich wie in den vorangegangenen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,148$). In der Kontrolle lag der Mittelwert bei 4,101 Synapsen/20μm, in der Knockoutgruppe bei 4,600 Synapsen/20μm (Abb. 3.18).

Weitere Werte: Kontrolle $n=29$, Standardabweichung 1,437 Synapsen/20μm, Standardfehler 0,267 Synapsen/20μm; Knockoutgruppe $n=29$, Standardabweichung 1,129 Synapsen/20μm, Standardfehler 0,210 Synapsen/20μm.

Ein Effekt des E-Cadherin-Knockouts war somit zum Zeitpunkt DIV7, drei Tage nach dem konditionalen Knockout, nicht nachweisbar. Um herauszufinden, ob sich der Knockout im weiteren Verlauf auf die Synapsenzahlen auswirkt, wurden diese an DIV14 erneut erhoben (Abb. 3.19, Abb. 3.20, Abb. 3.21).

Die Knockoutgruppe lag mit einem Mittelwert von 5,284 Synapsen/20μm weit *unter*

dem der Kontrollgruppe: 6,728 Synapsen/20µm. Dieser Unterschied stellte sich als höchst signifikant heraus: $p < 0,001$.

Weitere Werte: Kontrolle $n=59$, Standardabweichung 2,204 Synapsen/20µm, Standardfehler 0,287 Synapsen/20µm; Knockoutgruppe $n=60$, Standardabweichung 1,752 Synapsen/20µm, Standardfehler 0,226 Synapsen/20µm.

Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass der E-Cadherin Knockout einen Einfluss auf die geringer ausgeprägte Dichte von GABAergen Synapsen an DIV14 haben muss. Somit wird der beobachtete Effekt schon am Tag der Transfektion begonnen haben, und war an DIV7 zwar vorhanden, aber noch nicht zweifelsfrei statistisch nachweisbar. Die Synapsen in der Kontrollgruppe konnten über die gesamten 14 Tage ungehindert gebildet werden - In der Knockoutgruppe war die Synapsendichte anfangs noch identisch mit der Kontrolle, nahm aber in den folgenden Tagen signifikant weniger zu.

Es wurden also immer noch neue Synapsen gebildet, jedoch in Summe weniger als zu erwarten gewesen wäre. Einige, aber nicht alle GABAerge Synapsen scheinen also auf E-Cadherin angewiesen zu sein in Bezug auf Formation und Stabilisierung. Beide Funktionen könnten ursächlich an der geringeren Anstiegssteilheit der Synapsendichte beteiligt sein.

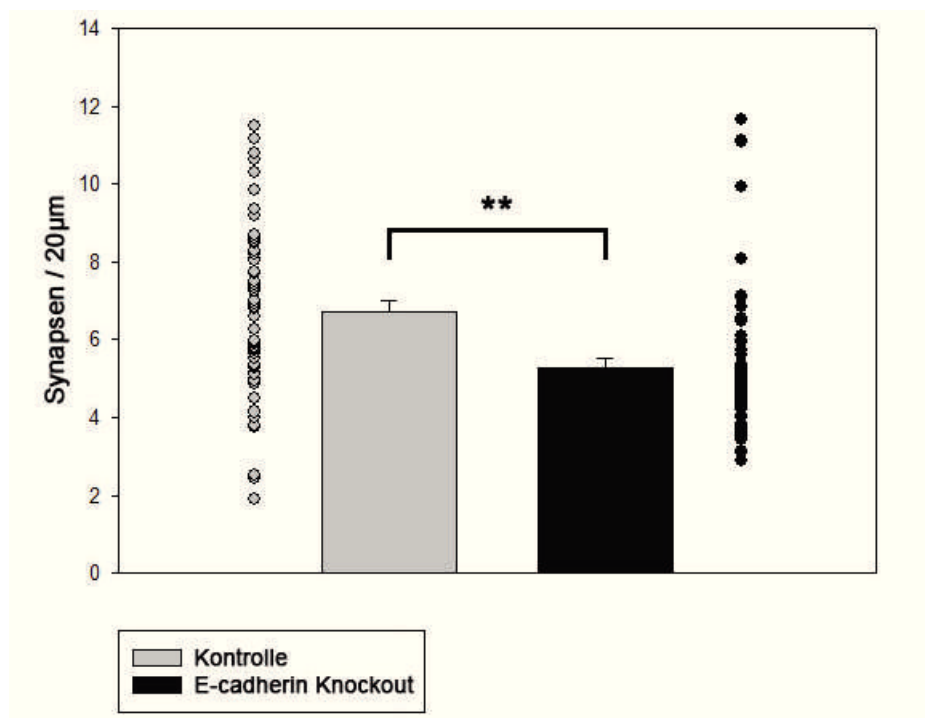


Abb. 3.19: Dendritische GABA Synapsen, DIV14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; ** $p < 0,001$; Balkendiagramm mit Fehlerbalken und Scatterplots

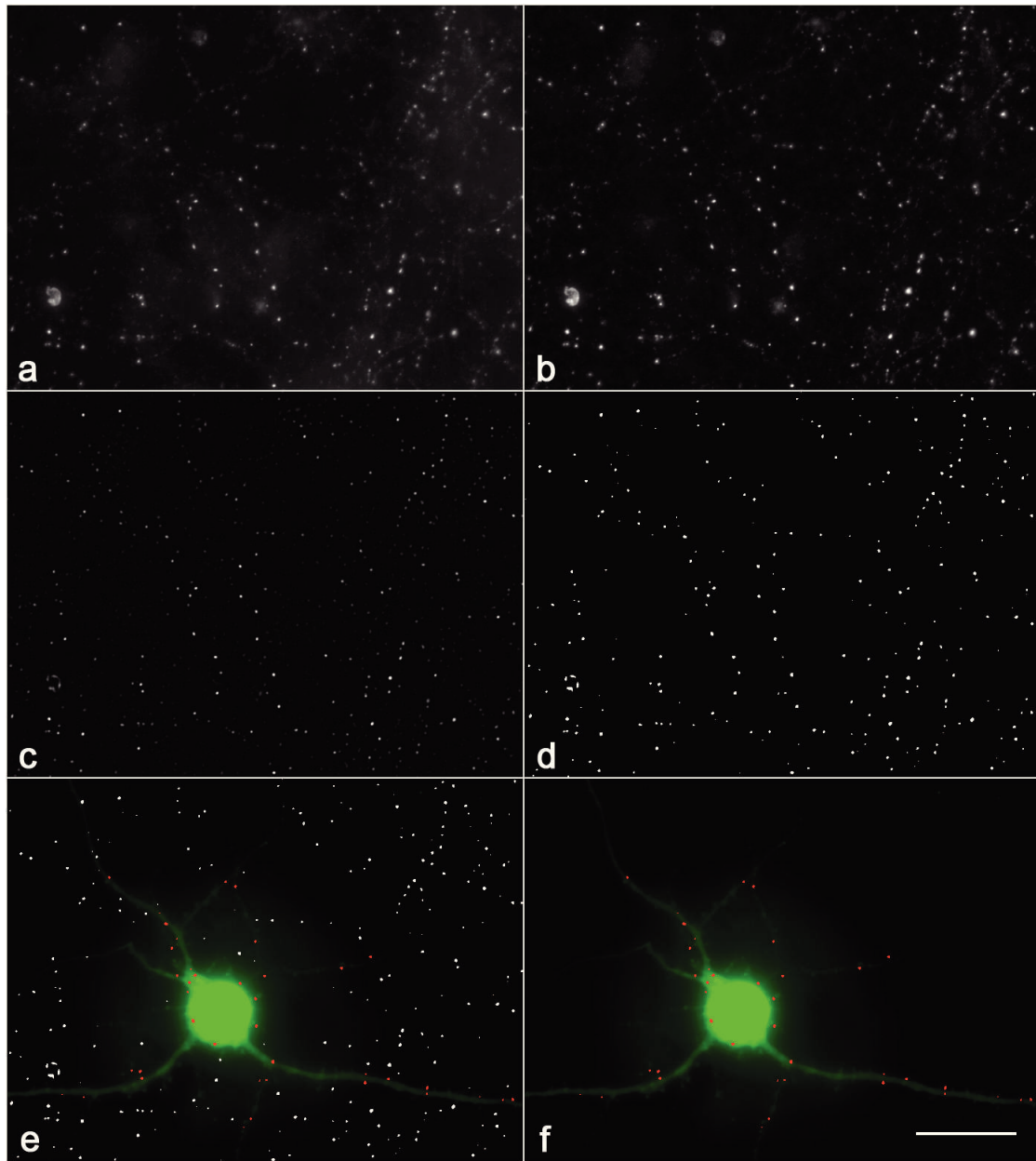


Abb. 3.20: Kontrolle, VGAT Färbung, DIV14; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10µm; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Besserung Übersichtlichkeit

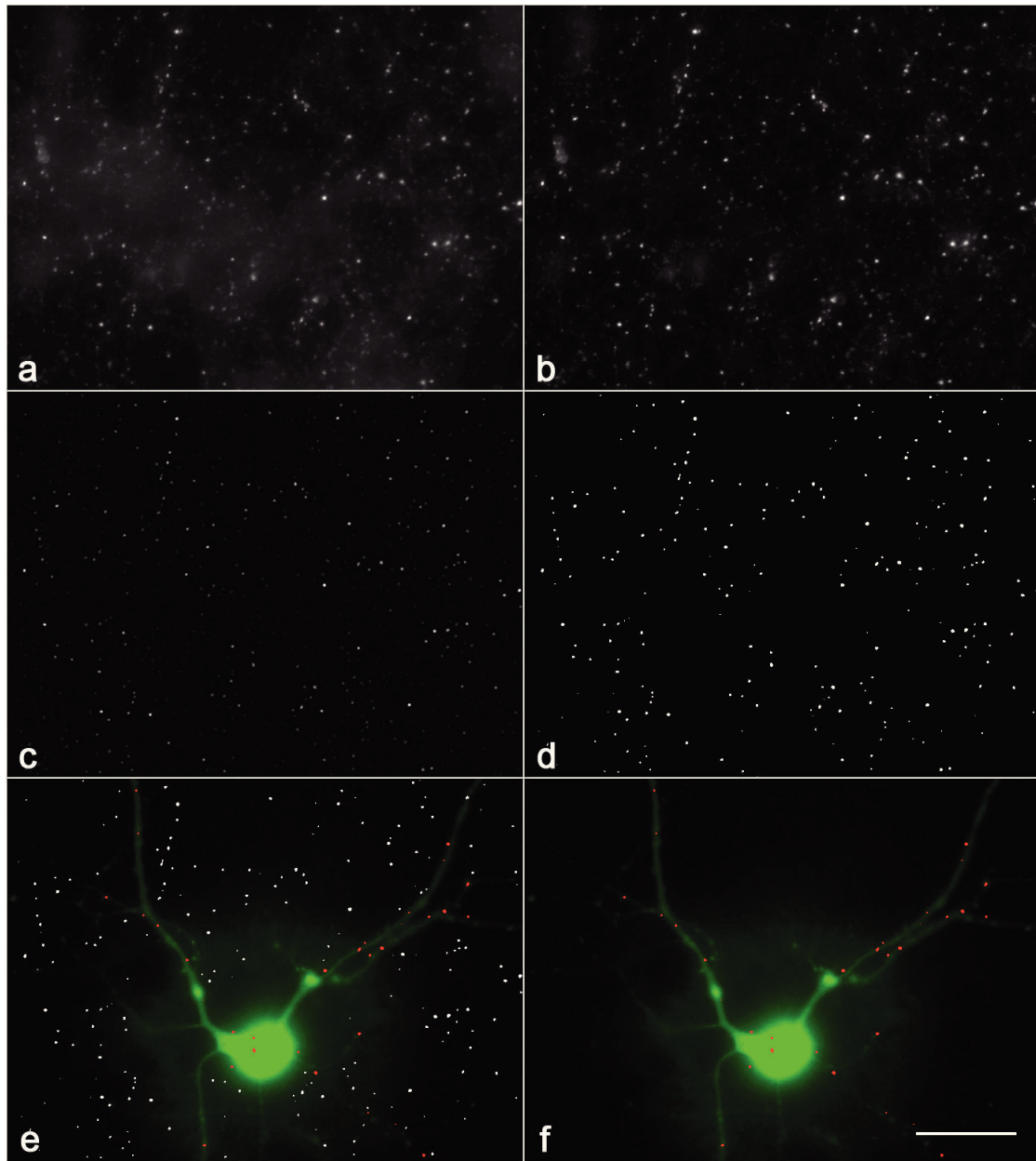


Abb. 3.21: E-Cadherin Knockout, VGAT Färbung, DIV14; Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme; Scalebar = 10 μ m; **a**: Maximum-Image des originalen Z-Stacks, **b**: Background-Subtraction, **c**: 2D Dekonvolution, **d**: Darstellung nach Grenzwert-Berechnung, **e**: Overlay aus Grenzwertbild und Zellbild - Markierung der gezählten Puncta in rot, **f**: Entfernung der nicht gezählten Puncta zur Besserung Übersichtlichkeit

4 Diskussion

Nachdem mittels Western Blot gezeigt werden konnte, dass E-Cadherin sehr wohl in kultivierten Neuronen der Maus exprimiert wird, wurde die Homozygotie des GVO Genoms mittels PCR und Elektrophorese überprüft (beides s. 2.2). Die Intaktheit konnte bestätigt werden und lieferte die Grundlage für die weiteren Experimente: Es konnten nun die primär kultivierten kortikalen Neurone mit einer standardmäßigen immunzytochemischen Färbung untersucht werden.

Dabei wurde ein Effekt des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf die reifenden Neurone dargestellt, der nicht nur qualitativ, sondern nun auch quantitativ nachgewiesen werden konnte.

4.1 Transfektion kultivierter kortikaler Neurone

Das Einbringen von DNA-Plasmiden in eukaryontische Zellen ist ein in der Zellbiologie weit verbreitetes Verfahren, das auch auf Neurone angewendet werden kann. Bis zur Fixierung zwecks Immunzytochemie müssen die Zellen überleben und funktionell möglichst intakt bleiben. Eine Transfektion jedoch stellt ein gravierendes Ereignis dar, das die Zelle in ihrer Integrität bedroht, eventuell sogar zu ihrem Untergang führt[5].

Es muss geklärt werden, ob der Metabolismus und die Funktion transfizierter Neurone vergleichbar zu den Zellen ist, die nicht transfiziert worden sind. Da dies jedoch schwerlich im Rahmen der medizinischen Dissertation nachgewiesen werden konnte, wurde sich eines Hilfskonstrukts bedient: Die Kontrollgruppe wurde mit EGFP-N1 transfiziert, was lediglich zu einer Ausprägung von GFP führte, jedoch keine weitere große metabolische Konsequenz für die Zelle hatte. Im Vergleich zu den mit pBS598 transfizierten Zellen war nun eine Vergleichsgruppe verfügbar, die, wenn vorhanden, dieselben eventuellen Zellveränderungen durch Lipofectamine 2000 erfahren hatte. Unbekannte Störfaktoren sollten so durch den direkten Vergleich der beiden Gruppen ausgeschlossen werden.

Für die Untersuchung wurden weiterhin nur Zellen gewählt, die unter optischer Kontrolle intakt erschienen und keine Veränderungen eines nahenden Zelltodes aufwiesen (wie zum Beispiel Zellschrumpfung, -segmentierung oder dergleichen).

Die beobachtete Transfektionseffizienz des Lipofectamine 2000 in den Experimenten war sehr gering - sie hängt erfahrungsgemäß maßgeblich von der Art der zu transfizierenden Zellen, sowie der Konfluenz des Zellrasens ab. Neurone sind jedoch von sich aus schwer zu transfizieren, und die Zelldichte auf den Coverslips war ebenfalls ein limitierender Faktor.

Zur Vermeidung bakterieller Infektionen des Mediums wurde ein Gemisch aus Penicillin/Streptomycin beigefügt, was die Effizienz weiter senkt (laut Herstellerangabe), jedoch unerlässlich war. So lag die erreichte Transfektionseffizienz noch unter den in der Literatur angegebenen 3%[66].

Dies war ein Problem bei der Darstellung der E-Cadherin Expression mittels Western Blot. Die unweigerlich heterogenen Zellkulturen mit transfizierten/nicht transfizierten Neuronen konnten nicht mehr voneinander getrennt untersucht werden - eine selektive Ablösung der transfizierten Zellen von den Kulturschalen würde sich sehr schwierig gestalten; einzige Möglichkeit zur gezielten Darstellung eines E-Cadherin Knockouts wäre eventuell die Ablösung aller Zellen vom Grund des Dishes, gefolgt von einer Durchflusszytometrie und danach einem Western Blot[27].

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass E-Cadherin immerhin in kultivierten Kortexneuronen exprimiert wird (s. 2.2): Zum Zeitpunkt E17 befinden sich entsprechend auch sehr wenige Gliazellen, was oben genannten Schluss zulässt. Die absolute Anzahl transfizierter Neurone spielt in der vorliegenden Arbeit eine eher untergeordnete Rolle, da die durchgeführten Experimente Einzelzelluntersuchungen sind, bei denen pro transfizierter Zelle die Anzahl gewisser Synapsen quantifiziert wird (s.u.)

4.2 Die Expression des CreGFP Protein in kortikalen Neuronen

Die in der Literatur beschriebene überwiegend nukleäre Lokalisation des CreGFP Fusionsproteins[27][53] konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (s. 3.4). Durch den starken EF1 α Promotor war die Expression des Proteins hoch[53]; noch zehn Tage nach Transfektion war die Fluoreszenz unter Mikroskopie deutlich zu erkennen. Daraus kann auf die langanhaltende Präsenz des CreGFP geschlossen werden, welche laut Voruntersuchungen gar nicht nötig gewesen wäre: Auch eine nur kurzzeitige Expression hätte zur vollständigen Rekombination im Genom geführt[27][64].

Aus diesem Grund wurde das unter Transfektion mit pBS598 (CreGFP) hergestellte Allel Ecad flox-del angenommen. Letzte Gewissheit über eine erfolgreiche Rekombination würde nur eine Einzelzell PCR liefern, auf die hier wegen der Datenlage in der Literatur verzichtet wurde.

4.3 Konditionaler E-Cadherin Knockout in kortikalen Neuronen

In den Experimenten konnten die Zellen bis DIV4 E-Cadherin bilden. Erst an diesem Tag wurde die Kondition gesetzt und der Knockout auf genomischer Ebene herbeigeführt. Danach waren diese Zellen nicht mehr in der Lage, neues E-Cadherin zu bilden.

Jedoch verschwindet bereits gebildetes E-Cadherin nicht sofort; vielmehr unterliegt der Abbau komplexen Regulationsmechanismen, bevor es schließlich im Proteasom degradiert wird. Wie lange dieser Prozess dauert, ist nicht bekannt.

Jedoch sind eine Reihe von Regulationsfaktoren beschrieben, wie zum Beispiel die GTPasen Rab5, ARF6, Rac1, RhoA, Cdc42 [47][26]. Außerdem ist der Prozess der Endozytose von bereits exprimiertem und in der Zellmembran verankertem E-Cadherin bekannt: Er ist sowohl Clathrin-abhängig[51] als auch -unabhängig möglich[69]. Dabei ist diese Endozytose wie viele andere Prozesse in der Zelle in einem ständigen Fluss: Es kommt laufend zu Endozytosen, von denen ein Teil sofort in die Membran zurückkehrt, ein anderer Teil degradiert und ein weiterer Teil aus Neusynthese bezogen wird[51].

Der Effekt einer E-Cadherin Depletion auf die Zelladhäsion wurde bereits an Tumorzellen (MCA3d und PDV) untersucht, bei der es infolgedessen zu einer morphologischen Veränderung kam[13]. Bereits 24-48 Stunden nach Transfektion mit SNAIL konnte hier ein Verlust von E-Cadherin an Zellkontakten festgestellt werden.

Jedoch waren diese Zellen solche, die eine hohe Expressionsrate für E-Cadherin aufwiesen; im Gegensatz zu den dieser Arbeit zugrunde liegenden Neuronen. Außerdem wurde in dem beschriebenen Experiment nur ein unvollständiger Knockout beschrieben; die Repressionsrate für SNAIL wird mit ~56% angegeben[13]. Im Gegensatz dazu ist bei einer Exzision wichtiger Sequenzen des E-Cadherin Gens auf genomischer Ebene von einem Knockout von 100% auszugehen, zumindest was die Neubildung des Proteins betrifft (wie in der vorliegenden Arbeit geschehen).

In einem weiteren Ansatz wurde der Frage der E-Cadherin Depletion mit RNA Interferenz in MDCK Zellen nachgegangen[14]. Dort wurde die Ausschaltung mit >90% angegeben. Es zeigte sich, dass vor der Transfektion gebildete Zell-Zell-Kontakte auch 48 Stunden danach noch bestanden, ebenso wie die Zellpolarität unangetastet blieb. Jedoch war die Ausbildung von neuen Zellkontakten gestört. E-Cadherin spielt offensichtlich für die Ausbildung von Zellkontakten eine wichtige Rolle, jedoch übernimmt zur Aufrechterhaltung derselben eine Reihe weiterer Moleküle die Führung.

Obwohl die RNA Interferenz und MDCK Zellen selbstverständlich zu meinen Ansätzen abgegrenzt werden müssen, wird ein ähnlicher Zusammenhang in Bezug auf E-Cadherin

und Synapsenbildung implizit (s.u.)

Wieviel E-Cadherin überhaupt im Säugerkortex exprimiert wird, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin exprimiert wird, wenn auch schwach und nah an der Nachweisgrenze. Entsprechend sind manche Arbeitsaussagen widersprüchlich. Coleman und Fannon 1996 konnten E-Cadherin in synaptischen Zellkontakten im Hippokampus nachweisen, der Allen Brain Atlas an P56 Mäusen eine diffuse schwache kortikale Verteilung, wie auch das GENSAT Projekt bei P7 Mäusen auf immunhistochemischem Weg und durch Western Blot untermauert.

Hingegen konnte an 20 Wochen alten Mäusen im Hirnhomogenisat mittels Western Blot im Vorfeld kein E-Cadherin nachgewiesen werden[88], was jedoch am verwendeten Antikörper gelegen haben mag. Solange die Distribution des Moleküls nicht einwandfrei an Hirnschnitten und in vivo dargestellt ist, bleibt nur der indirekte Nachweis über Knockouts. Dieser Methode bediente auch ich mich.

Der eigentliche Knockout in dieser Arbeit fand durch Exzision der Exone 6-10 statt, welche für extrazelluläre Domänen kodieren. Da hiervon der Promotor des Gens unbeeinflusst blieb, kommt es nur zur Expression eines sogenannten trunkierten Proteins, dem funktionelle Eigenschaften fehlen[10]. Ob es im Endeffekt überhaupt zu einer Expression dieses trunkierten Proteins kommt, ist nicht bekannt - eventuell verschiebt sich durch die Exzision der Cre-Rekombinase das Leseraster, sodass es zu einer fehlerhaften oder gar keinen Ausbildung der auf dem Allel verbleibenden Informationen des Gens kommt. Struktur oder biochemisches Verhalten des trunkierten Proteins sind ebenfalls nicht bekannt. Es wäre möglich, dass es tatsächlich an die Zellmembran transportiert wird und folgend Catenine (β -, γ - oder p120-) daran binden, welche nicht in ihrer Funktion gestört sind. Das würde heißen, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte nur auf das Fehlen von extrazellulären Domänen zurückzuführen sind; nicht aber auf einen kompletten E-Cadherin Knockout, weil die intrazelluläre Regulation in unbekanntem Maße weiter fortlaufen könnte.

Für die quantitative Auswertung von Synapsenproteinen in dieser Arbeit hat diese Problematik jedoch keinen direkten Einfluss. Zwar lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt das Verhalten des trunkierten E-Cadherins nicht vorhersagen, die eigentliche immunzytochemische Anfärbung von VGAT und VGLUT1 ist aber nach wie vor uneingeschränkt möglich. Somit bleibt lediglich die Frage, ob der beobachtete Effekt auf die Synapsenzahlen eines globalen E-Cadherin Knockouts, oder lediglich auf das Fehlen von extrazellulären Domänen zurückzuführen ist.

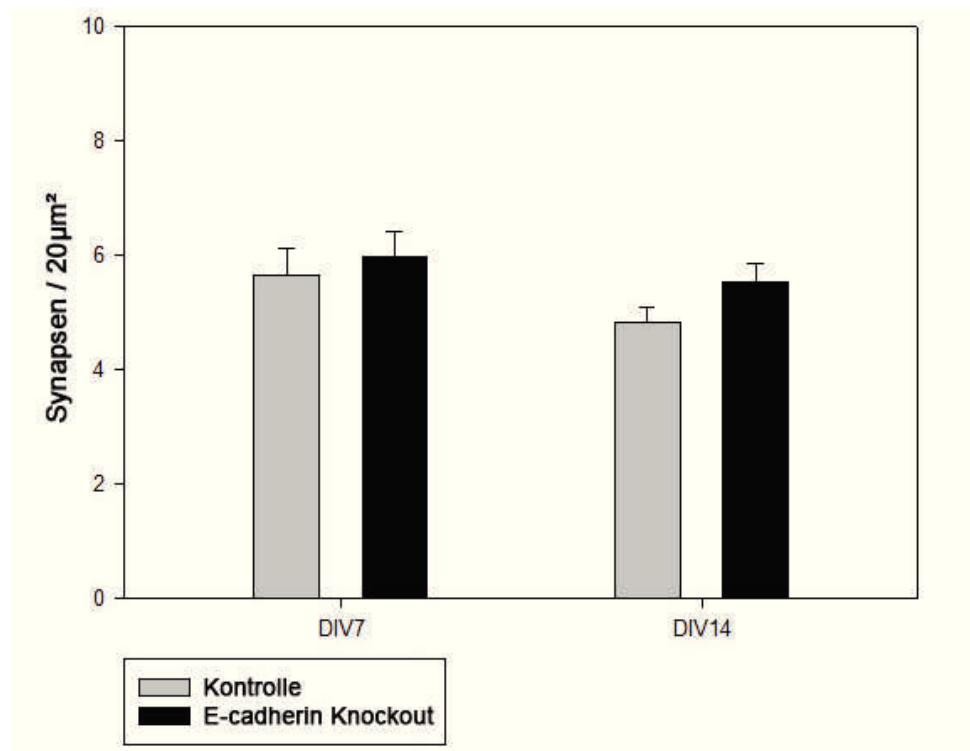


Abb. 4.1: Somatische glutamaterge Synapsen, VGLUT1 Färbung; DIV7 und 14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken

4.4 Auswirkungen des konditionalen Knockouts von E-Cadherin auf Synapsen

Zum Nachweis eines Effekts infolge des konditionalen E-Cadherin Knockouts wurden Kontrollzellen (EGFP exprimierend) mit Knockoutzellen (creGFP exprimierend) in der Quantität von VGAT und VGLUT1 verglichen, stellvertretend für GABAerge und glutamaterge Synapsen. Dabei wurden somatische von dendritischen Synapsen unterschieden, um einen eventuell lokal begrenzten Effekt nachweisen zu können.

Die Somata wiesen in beiden Untersuchungsgruppen jeweils an DIV7 und DIV14 ähnliche Werte auf (Abb. 4.1, Abb. 4.2). Auch wenn es bei der mittleren Synapsenzahl auf GABAergen Neuronen an DIV7 in der Knockoutgruppe zu einem scheinbaren Ausreißer gekommen ist, so besitzt dieser keine statistische Signifikanz und wäre bei einer Erhöhung der Stichprobe vermutlich verschwunden. Die glutamatergen Synapsen weisen an beiden Zeitpunkten sowohl in Kontroll- wie auch Knockoutgruppe ähnliche Synapsenzahlen auf ihrem Soma auf.

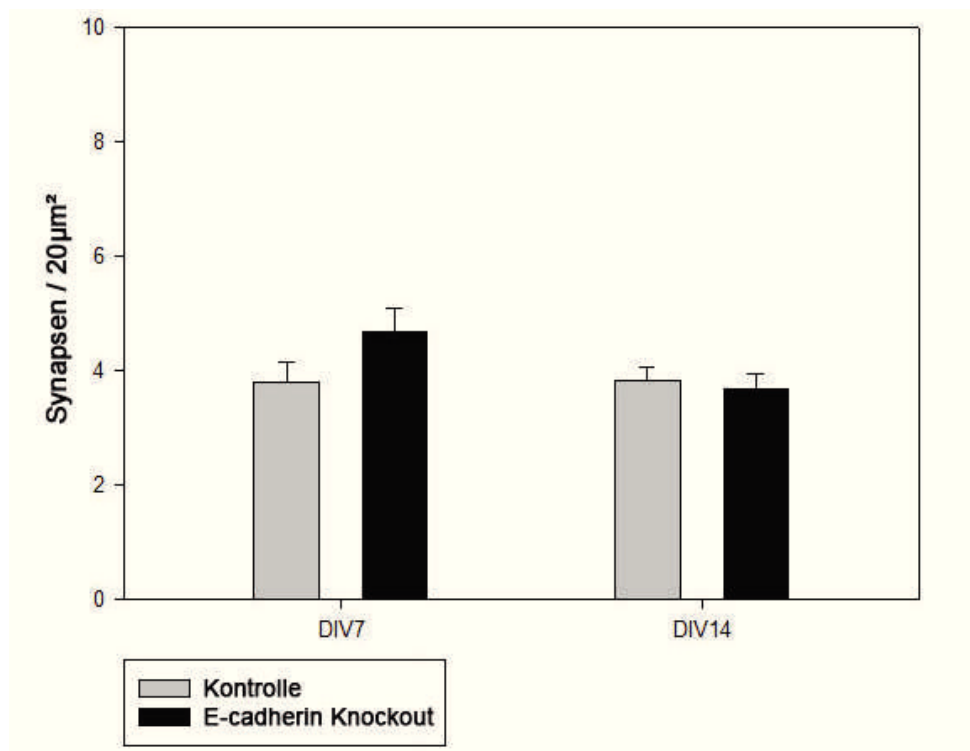


Abb. 4.2: Somatische GABAerge Synapsen, VGAT Färbung; DIV7 und 14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken

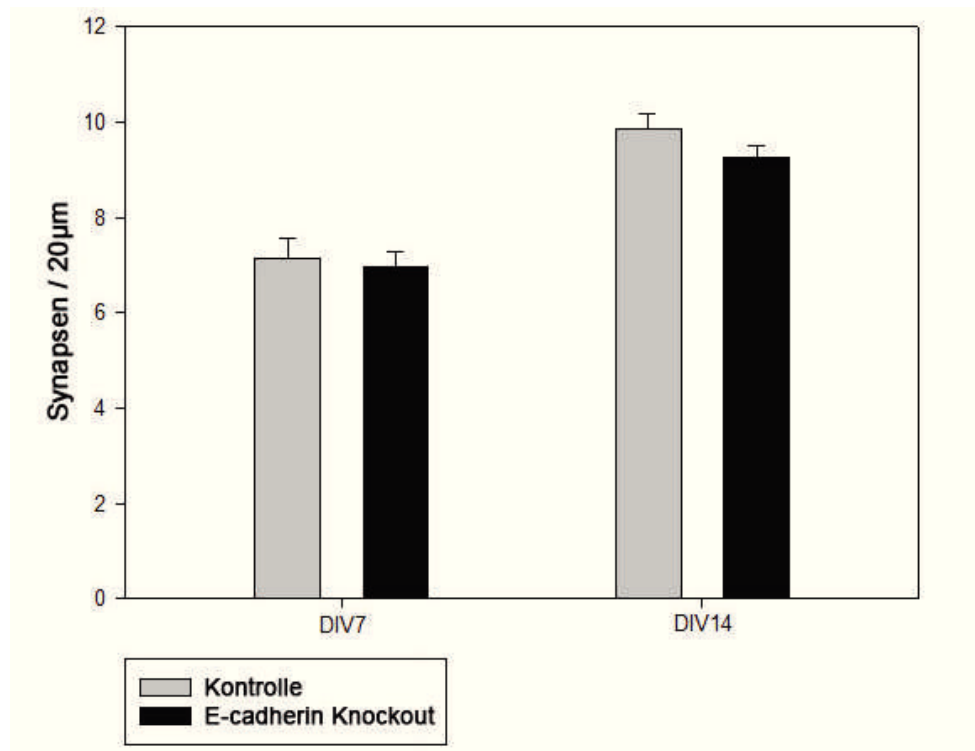


Abb. 4.3: Dendritische glutamaterge Synapsen, VGLUT1 Färbung; DIV7 und 14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; Balkendiagramm mit Fehlerbalken

Es ist festzuhalten, dass der E-Cadherin Knockout die somatischen Synapsen für sowohl GABA als auch Glutamat unangetastet belässt. Der durchschnittliche Wert für GABAerge Neurone liegt bei etwa 4 Synapsen / $20\mu\text{m}^2$ und für glutamaterge Synapsen bei circa 5-6 / $20\mu\text{m}^2$, was auch mit der Literatur und vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe übereinstimmt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für die Dendriten, weisen die glutamatergen Synapsen einen gleichmäßigen Anstieg in ihrer Zahl in beiden Gruppen über den Verlauf der 7 Tage auf. Von durchschnittlich 7 steigen sie auf etwa 9-10 Synapsen / $20\mu\text{m}$. Signifikante Unterschiede gab es hier nicht (Abb. 4.3).

Das gilt jedoch nicht für die GABAergen dendritischen Synapsen. Auch hier lässt sich in der Kontrollgruppe von DIV7 auf DIV14 ein Anstieg der Synapsenzahl feststellen, was wie zu erwarten das Korrelat der Ausbildung von neuronalen Netzwerken in den primären Massenkulturen darstellt. Dabei steigen die Zahlen von 4 auf knapp 7 Synapsen / $20\mu\text{m}$ (Abb. 4.4).

In der Knockoutgruppe fällt dieser Anstieg jedoch weit geringer aus, auch wenn er nicht

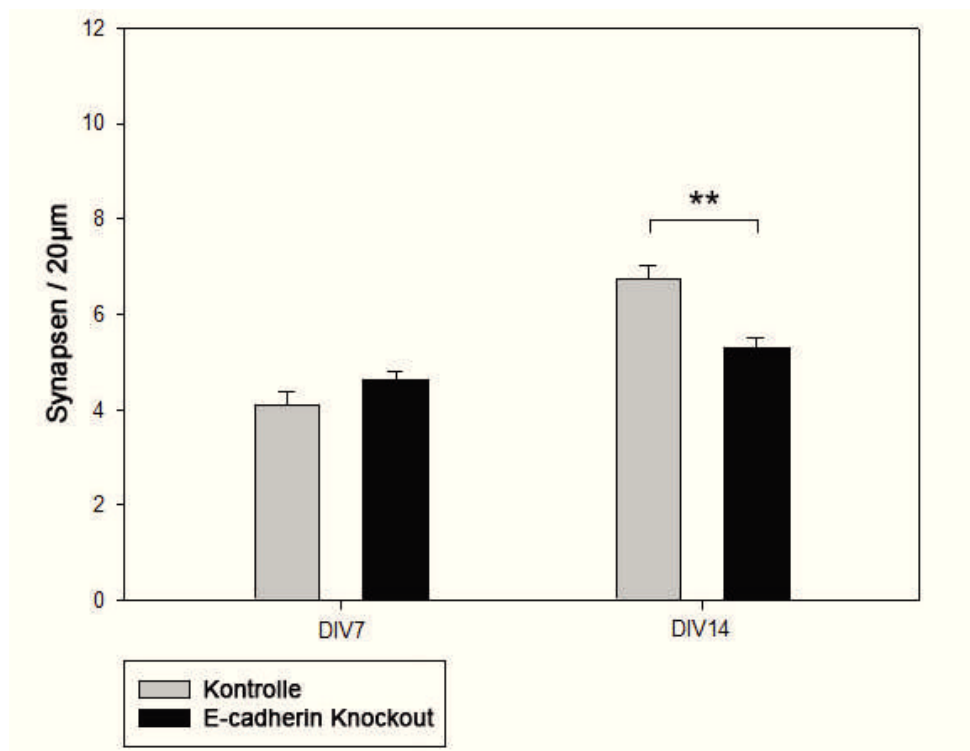


Abb. 4.4: Dendritische GABAerge Synapsen, VGAT Färbung; DIV7 und 14, Vergleich Kontrolle und E-Cadherin Knockout; ** $p < 0,001$; Balkendiagramm mit Fehlerbalken

ganz verschwunden ist. Jedoch ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der absoluten Synapsenzahl an DIV14 zwischen den Vergleichsgruppen: In der Kontrollgruppe etwa 7 Synapsen, in der Knockoutgruppe etwa 5 Synapsen / 20µm. Es besteht also ein verzögerter Anstieg in der Ausbildung dendritischer GABAerger Synapsen unter Fehlen von E-Cadherin.

Dieses Ergebnis steht in Konkordanz mit bereits oben vorgestellten Studien, nach denen E-Cadherin bei der Formierung von Zell-Zell-Kontakten wichtig ist, ein nachträgliches Ausschalten jedoch nicht zum Stabilitätsverlust derselben führt. Deshalb stagniert in der Knockoutgruppe der Anstieg der Synapsenzahl, aber es kommt zu keiner Reduzierung.

Das spricht dafür, dass E-Cadherin nur für ein spezielles Subset Neuronen am Dendriten zur Formation entscheidend ist - weil es nicht zu einem vollständigen Erliegen der Neuausbildung kommt; Auf jeden Fall sind die betroffenen Neurone GABAerg. An glutamatergen Synapsen spielt E-Cadherin keine Rolle; hier ist wie bereits aus der Literatur bekannt das N-Cadherin der entscheidende Faktor.

In der elektrophysiologischen Vorgängerarbeit wurde ein ähnliches Ergebnis in Bezug auf die synaptische Aktivität gesehen. Diese war signifikant geringer an DIV14 in der Knockoutgruppe: Kontrolle - 0,14-2,82Hz versus Knockoutgruppe - 0,03-0,6Hz. Die Amplitude war jedoch in beiden Fällen ähnlich. Ein zugrunde liegender quantitativer Unterschied in den Gruppen lag nahe, der mit meiner Arbeit nachgewiesen werden konnte[25].

Über die tatsächliche Rolle von E-Cadherin in der Synaptogenese kann indes nur spekuliert werden. Blockierungen von N-Cadherin durch Antikörper führte demnach nicht zu einer fehlenden Synaptogenese, sondern vielmehr zu einem Überschießen der Zellkontakte, was letztlich zu instabilen und nicht formierten Synapsen führte[44].

In jedem Fall scheinen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle in der Synaptogenese zu spielen. RNA Interferenz Experimente, die Cadherin-11 und -22 ausschalteten, konnten zeigen, dass sowohl glutamaterge als auch GABAerge Synapsenformierung gestört war[68]. Demnach ist es höchst wahrscheinlich, dass ein komplexes Zusammenspiel solcher Adhäsionsmoleküle für die Formierung einer Synapse notwendig sind[77].

4.5 Ausblick

Dass E-Cadherin eine Rolle bei der Genese zentraler GABAerger Neurone spielt, konnte gezeigt werden - zunächst qualitativ über Elektrophysiologie, dann in dieser Arbeit strukturell[25].

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass jedoch nur ein spezielles Subset GABAerger Neuronen an den Dendriten davon abhängig ist. Interessant wäre es herauszufinden, welche Art von Synapsen genau dies betrifft - aus welchen Komponenten sie bestehen und welche Rezeptoren darin involviert sind. Über all dies gibt die Arbeit keine Information. Die Lokalisation von E-Cadherin könnte dabei indirekt einen Hinweis geben, welche Subtypen der GABA-Synapsen betroffen sind.

Der Nachweis im Gehirn der Maus ist indes schwierig. Mit dem durchgeführten Western-Blot (Abb. 3.3) ist uns dies prinzipiell zwar gelungen, jedoch wurden als Probenmaterial nur die oben beschriebenen Zellkulturplatten, d.h. dissoziierten Cortices, genommen. Das lässt zumindest schlussfolgern: Es wird E-Cadherin in diesen Kulturen exprimiert - also gilt das auch höchstwahrscheinlich für das ursprüngliche Gehirn. Allein das ist schon bemerkenswert.

Folgend muss aber trotzdem die Frage gestellt werden, an welchen Stellen in einem intakten Gehirn, *in vivo*, es nun zu dieser Ausprägung kommt. Das Allen Developing Mouse Brain Projekt konnte mittlerweile eine schwache Expression des CDH1 Gens an E18.5 Mäusen nachweisen. Es wurden zu diesem Zweck Gensonden und eine *in situ* Hybridisierung (ISH) verwendet. Besonders im medialen Sagittalschnitt ist eine Häufung in Mittelhirn, Pons und Medulla oblongata zu beobachten. Dazu muss jedoch gesagt werden, dass es lange keinen eindeutigen Nachweis von E-Cadherin gab (vgl. Gensat-Projekt), weil die Dichte des Genprodukts insgesamt als sehr niedrig einzustufen ist.

Der dargestellte E-Cadherin Nachweis kann aber einen ersten Anhaltspunkt darstellen: Denn nur wo E-Cadherin exprimiert wird, kann es auch durch einen Knockout GABAerge Synapsen(ausprägung) beeinflussen. Es könnte als ein indirekter Anhaltspunkt die Zuordnung zu bestimmten Rezeptor-Subtypen in späteren Untersuchungen ermöglichen.

Allerdings ist nicht auszuschließen, dass es auch an anderen Stellen zu einer Expression kommt. Die Hirnschnitte und Färbungen des Allen Developing Mouse Brain Atlas wurden im Stadium E18.5 durchgeführt, die Präparation der Embryonen in dieser Arbeit jedoch schon an E17, und folgend eine *in vitro* Situation hergestellt. Eine Korrelation der Ergebnisse ist deshalb nur vorsichtig in Betracht zu ziehen.

Weiterhin könnten die verschiedenen GABA Rezeptoren über weitere immunhistochemische Färbungen an Hirnschnitten dargestellt werden. Sie könnten im ersten Schritt mit oben genanntem Ergebnis des Allen Developing Mouse Brain Atlas verglichen werden und so eventuelle Gemeinsamkeiten aufdecken. Außerdem sollte der Ansatz des konditionalen Knockouts von E-Cadherin fortgeführt werden: Dass nach dem Knockout weniger GABAerge Synapsen neu ausgeprägt werden, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Es kann aber bisher nur spekuliert werden, inwieweit sich Verteilungsmuster der Synapsen, deren Stabilität oder beteiligte Rezeptoren in ihrer Menge ändern.

Da es nach dem Knockout zu einem geringeren Anstieg der GABAergen Synapsenzahlen als in der Kontrollgruppe kam, muss von einer Funktion des E-Cadherins während der Synaptogenese ausgegangen werden. Da es ein Zelladhäsionsmolekül ist, liegt es nahe, dass es bei der Formation des synaptischen Spaltes eine stabilisierende Rolle übernehmen könnte. Durch die homophile trans-Bindung zwischen Zelloberflächen könnte es auch beim ersten Kontakt zwischen zwei Neuronen, also der Anhaftung der Prä- an die Postsynapse, zum Tragen kommen.

Weitere denkbare Ansätze leiten sich von der Verankerung des E-Cadherins in der Zellmembran ab. beta-Catenin ist zum Beispiel mit dem WNT-Pathway assoziiert, der weitere regulatorische Funktionen übernimmt, und auch auf die Formierung der Synapsen Einfluss haben könnte.

Diese Überlegungen sind sicher bei weitem nicht vollständig, und spiegeln bloß den Stand nach Abschluss meiner Experimente wider. Die Forschung auf diesem Gebiet ist jedenfalls noch lange nicht abgeschlossen und bietet viele interessante Ansätze, die es auch weiterhin zu verfolgen gilt.

A Tabellen

Biotin	Selen
L-Carnitin	T3 (Triiodthyronin)
Corticosteron	DL-a-tocopherol (Vitamin E)
Ethanolamin	DL-a-tocopherol Acetat
D(+)-Galaktose	<i>Proteine:</i>
Glutathion (reduziert)	Albumin, Rind
Linolsäure	Katalase
Linolensäure	Insulin
Progesteron	Superoxid Dismutase
Putrescin	Transferrin
Retinylacetat	

Tab. A.1: B27 Supplement Zusammensetzung[12]

Komponenten	Molekulargewicht	Konzentration (mg/L)	mM
Aminosäuren			
Glycin	75	30	0,4
L-Alanin	89	2	0,0225
L-Arginin Hydrochlorid	211	84	0,398
L-Asparagin-H ₂ O	150	0,83	0,00553
L-Cystein	121	31,5	0,26
L-Histidin Hydrochlorid-H ₂ O	210	42	0,2
L-Isoleucin	131	105	0,802
L-Leucin	131	105	0,802
L-Lysin Hydrochlorid	183	146	0,798
L-Methionin	149	30	0,201
L-Phenylalanin	165	66	0,4
L-Prolin	115	7,76	0,0675
L-Serin	105	42	0,4
L-Threonin	119	95	0,798
L-Tryptophan	204	16	0,0784
L-Tyrosin	181	72	0,398
L-Valin	117	94	0,803
Vitamine			
Cholinchlorid	140	4	0,0286
D-Calcium Pantothenat	477	4	0,00839
Folsäure	441	4	0,00907
Niacinamid	122	4	0,0328
Pyridoxinhydrochlorid	204	4	0,0196
Riboflavin	376	0,4	0,00106
Thiaminhydrochlorid	337	4	0,0119
Vitamin B12	1355	0,0068	0,000005
i-Inositol	180	7,2	0,04
Anorganische Salze			
Calciumchlorid (anhydr.)	111	200	1,8
Eisennitrat	404	0,1	0,000248
Magnesiumchlorid (anhydr.)	95	77,3	0,814
Kaliumchlorid	75	400	5,33
Natrium Bikarbonat	84	2200	26,19
Natriumchlorid	58	3000	51,72
Natriumphosphat monobas.	138	125	0,906
Zinksulfat	288	0,194	0,000674
Andere Komponenten			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	25
HEPES	238	2600	10,92
Phenolrot	376,4	8,1	0,0215
Natriumpyruvat	110	25	0,227

Tab. A.2: Zusammensetzung Gibco Neurobasal Medium 21103-049

Komponenten	Molekulargewicht	Konzentration (mg/L)	mM
Aminosäuren			
L-Arginin-Hydrochlorid	211	21	0,0995
L-Cystin 2HCl	313	16	0,0511
L-Histidin	155	8	0,0516
L-Isoleucin	131	26	0,198
L-Leucin	131	26	0,198
L-Lysin Hydrochlorid	183	36,47	0,199
L-Methionin	149	7,5	0,0503
L-Phenylalanin	165	16,5	0,1
L-Threonin	119	24	0,202
L-Tryptophan	204	4	0,0196
L-Tyrosindinatriumsalzdihydrat	261	26	0,0996
L-Valin	117	23,5	0,201
Vitamine			
Biotin	244	1	0,0041
Cholinchlorid	140	1	0,00714
D-Calcium Pantothenat	477	1	0,0021
Folsäure	441	1	0,00227
Nicotinamid	122	1	0,0082
Pyridoxalhydrochlorid	204	1	0,0049
Riboflavin	376	0,1	0,000266
Thiaminhydrochlorid	337	1	0,00297
i-Inositol	180	2	0,0111
Anorganische Salze			
Calciumchlorid (anhydr.)	111	200	1,8
Magnesiumsulfat (anhydr.)	120	97,7	0,814
Kaliumchlorid	75	400	5,33
Natrium Bikarbonat	84	2200	26,19
Natriumchlorid	58	6800	117,24
Natriumphosphat monobas.	138	140	1,01
Andere Komponenten			
D-Glucose (Dextrose)	180	1000	5,56
Phenolrot	376,4	10	0,0266

Tab. A.3: Zusammensetzung Gibco BME Medium 21370-028

B Abkürzungen

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionsäure
ARA-C	Cytosin- β -D-Arabinofuranosid-Hydrochlorid
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BME	Basalmedium plus Eagle's Supplement
CAM	Cell Adhesion Molecule
cAMP	cyclic Adenosin Monophosphat
Cdh-1	Cadherin 1, E-Cadherin Gen
cGMP	cyclic Guanosin Monophosphat
cre	Cyclisation Recombinase
creGFP	Fusionsprotein aus cre und GFP
CV	Coefficient of Variation
DIV(x)	Day in Vitro (x)
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EC	Extracellular Cadherin repeat
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
E(x)	Tag x der Embryonalentwicklung
FBS	Fetal Bovine Serum
GABA	Gamma Aminobutyric Acid
GABARAP	GABA Rezeptor assoziiertes Protein
GAD65/67	Glutamic Acid Decarboxylase
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
IP3	Inositoltrisphosphat
loxP	Locus of X-Over of P1
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
mPSC	miniature Post Synaptic Current
n.a.	nicht angegeben
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NT-3	Neurotrophin 3
NSF	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCN	Primary cultivated Cortical Neurons
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPR	Paired Pulse Ratio
PSC	Post Synaptic Current
P(x)	Postpartaler Tag (x)
RNA	Ribonucleic Acid
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
SNARE-Komplex	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment-proteinreceptor-Komplex
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Literaturverzeichnis

- [1] Y. Aihara, H. Mashima, H. Onda, S. Hisano, H. Kasuya, T. Hori, S. Yamada, H. Tomura, Y. Yamada, I. Inoue, I. Kojima, and J. Takeda. Molecular cloning of a novel brain-type na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem*, 74(6):2622–2625, 2000.
- [2] K. Akagi, V. Sandig, M. Vooijs, M. Van der Valk, M. Giovannini, M. Strauss, and A. Berns. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res*, 25(9):1766–1773, 1997.
- [3] Fabrice Ango, Graziella di Cristo, Hiroyuki Higashiyama, Vann Bennett, Priscilla Wu, and Z. Josh Huang. Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs gabaergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell*, 119(2):257–272, 2004.
- [4] G. Barbin, H. Pollard, J. L. Gaïarsa, and Y. Ben-Ari. Involvement of gabaa receptors in the outgrowth of cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 152(1-2):150–154, 1993.
- [5] Matthias Bauer, Bjarne Winther Kristensen, Morten Meyer, Thomas Gasser, Hans Ruedi Widmer, Jens Zimmer, and Marius Ueffing. Toxic effects of lipid-mediated gene transfer in ventral mesencephalic explant cultures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 98(4):395–400, 2006.
- [6] T. N. Behar, A. E. Schaffner, C. A. Scott, C. O’Connell, and J. L. Barker. Differential response of cortical plate and ventricular zone cells to gaba as a migration stimulus. *J Neurosci*, 18(16):6378–6387, 1998.
- [7] E. E. Bellocchio, R. J. Reimer, R. T. Fremeau, and R. H. Edwards. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science*, 289(5481):957–960, 2000.
- [8] Yehezkel Ben-Ari. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 3(9):728–739, 2002.
- [9] D. L. Benson and H. Tanaka. N-cadherin redistribution during synaptogenesis in

- hippocampal neurons. *J Neurosci*, 18(17):6892–6904, 1998.
- [10] Oréda Boussadia, Stefanie Kutsch, Andreas Hierholzer, Véronique Delmas, and Rolf Kemler. E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mech Dev*, 115(1-2):53–62, 2002.
- [11] R. Brackenbury, U. Rutishauser, and G. M. Edelman. Distinct calcium-independent and calcium-dependent adhesion systems of chicken embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(1):387–391, 1981.
- [12] G. J. Brewer, J. R. Torricelli, E. K. Evege, and P. J. Price. Optimized survival of hippocampal neurons in b27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res*, 35(5):567–576, 1993.
- [13] A. Cano, M. A. Pérez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo, and M. A. Nieto. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing e-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2(2):76–83, 2000.
- [14] Christopher T Capaldo and Ian G Macara. Depletion of e-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 18(1):189–200, 2007.
- [15] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805, 1994.
- [16] Mi-Yoon Chang, Hyeon Son, Yong-Sung Lee, and Sang-Hun Lee. Neurons and astrocytes secrete factors that cause stem cells to differentiate into neurons and astrocytes, respectively. *Mol Cell Neurosci*, 23(3):414–426, 2003.
- [17] F. A. Chaudhry, R. J. Reimer, E. E. Bellocchio, N. C. Danbolt, K. K. Osen, R. H. Edwards, and J. Storm-Mathisen. The vesicular gaba transporter, vgat, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as gabaergic neurons. *J Neurosci*, 18(23):9733–9750, 1998.
- [18] W. L. Coleman, C. A. Bill, and M. Bykhovskaia. Rab3a deletion reduces vesicle docking and transmitter release at the mouse diaphragm synapse. *Neuroscience*, 148(1):1–6, 2007.
- [19] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, and S. Falkow. Facs-optimized mutants of the green fluorescent protein (gfp). *Gene*, 173(1 Spec No):33–38, 1996.
- [20] Matthew W Curtis, Keith R Johnson, and Margaret J Wheelock. E-cadherin/catenin complexes are formed cotranslationally in the endoplasmic reticulum/golgi compart-

- ments. *Cell Commun Adhes*, 15(4):365–378, 2008.
- [21] J. DeFelipe. Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cereb Cortex*, 3(4):273–289, 1993.
- [22] I. Engberg, J. A. Flatman, and J. D. Lambert. The actions of excitatory amino acids on motoneurons in the feline spinal cord. *J Physiol*, 288:227–261, 1979.
- [23] M. G. Erlander, N. J. Tillakaratne, S. Feldblum, N. Patel, and A. J. Tobin. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*, 7(1):91–100, 1991.
- [24] A. M. Fannon and D. R. Colman. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron*, 17(3):423–434, 1996.
- [25] Andreas Fiederling, Roman Ewert, Aksana Andreyeva, Kay Jüngling, and Kurt Gottmann. E-cadherin is required at gabaergic synapses in cultured cortical neurons. *Neurosci Lett*, 501(3):167–172, 2011.
- [26] M. Fukata and K. Kaibuchi. Rho-family gtpases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(12):887–897, 2001.
- [27] S. Gagnet, Y. Le, J. Miller, and B. Sauer. Brief expression of a gfp cre fusion gene in embryonic stem cells allows rapid retrieval of site-specific genomic deletions. *Nucleic Acids Res*, 25(16):3326–3331, 1997.
- [28] K. Ganguly, A. F. Schinder, S. T. Wong, and M. Poo. Gaba itself promotes the developmental switch of neuronal gabaergic responses from excitation to inhibition. *Cell*, 105(4):521–532, 2001.
- [29] M. Geppert, Y. Goda, R. E. Hammer, C. Li, T. W. Rosahl, C. F. Stevens, and T. C. Südhof. Synaptotagmin i: a major ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4):717–727, 1994.
- [30] Guillermo Gonzalez-Burgos, Kenneth N Fish, and David A Lewis. Gaba neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast*, 2011:723184, 2011.
- [31] Attila Gulyás-Kovács, Heidi de Wit, Ira Milosevic, Olexiy Kochubey, Ruud Toonen, Jürgen Klingauf, Matthijs Verhage, and Jakob B Sørensen. Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J Neurosci*, 27(32):8676–8686, 2007.
- [32] Eckart D Gundelfinger, Michael M Kessels, and Britta Qualmann. Temporal and

- spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(2):127–139, 2003.
- [33] J. Haas, E. C. Park, and B. Seed. Codon usage limitation in the expression of hiv-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol*, 6(3):315–324, 1996.
- [34] D. L. Hamilton and K. Abremski. Site-specific recombination by the bacteriophage p1 lox-cre system. cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol*, 178(2):481–486, 1984.
- [35] Marc Hammarlund, Mark T Palfreyman, Shigeki Watanabe, Shawn Olsen, and Erik M Jorgensen. Open syntaxin docks synaptic vesicles. *PLoS Biol*, 5(8):e198, 2007.
- [36] T. F. Haydar, F. Wang, M. L. Schwartz, and P. Rakic. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci*, 20(15):5764–5774, 2000.
- [37] R. Heim, A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature*, 373(6516):663–664, 1995.
- [38] R. H. Hoess, M. Ziese, and N. Sternberg. P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(11):3398–3402, 1982.
- [39] H. Hoschuetzky, H. Aberle, and R. Kemler. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol*, 127(5):1375–1380, 1994.
- [40] E. J. Huang and L. F. Reichardt. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, 24:677–736, 2001.
- [41] D. G. Huntsman and C. Caldas. Assignment1 of the e-cadherin gene (cdh1) to chromosome 16q22.1 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet*, 83(1-2):82–83, 1998.
- [42] F. Hyafil, C. Babinet, and F. Jacob. Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell*, 26(3 Pt 1):447–454, 1981.
- [43] A. Inoue and J. R. Sanes. Lamina-specific connectivity in the brain: regulation by n-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science*, 276(5317):1428–1431, 1997.
- [44] T. Inoue, O. Chisaka, H. Matsunami, and M. Takeichi. Cadherin-6 expression transiently delineates specific rhombomeres, other neural tube subdivisions, and

- neural crest subpopulations in mouse embryos. *Dev Biol*, 183(2):183–194, 1997.
- [45] S. Inouye and F. I. Tsuji. Aequorea green fluorescent protein. expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett*, 341(2-3):277–280, 1994.
- [46] Kay Jüngling, Volker Eulenburg, Robert Moore, Rolf Kemler, Volkmar Lessmann, and Kurt Gottmann. N-cadherin transsynaptically regulates short-term plasticity at glutamatergic synapses in embryonic stem cell-derived neurons. *J Neurosci*, 26(26):6968–6978, 2006.
- [47] T. Kamei, T. Matozaki, T. Sakisaka, A. Kodama, S. Yokoyama, Y. F. Peng, K. Nakano, K. Takaishi, and Y. Takai. Coendocytosis of cadherin and c-met coupled to disruption of cell-cell adhesion in mdck cells—regulation by rho, rac and rab small g proteins. *Oncogene*, 18(48):6776–6784, 1999.
- [48] M. Kozak. An analysis of 5′-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger rnas. *Nucleic Acids Res*, 15(20):8125–8148, 1987.
- [49] M. Lakso, B. Sauer, B. Mosinger, E. J. Lee, R. W. Manning, S. H. Yu, K. L. Mulder, and H. Westphal. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14):6232–6236, 1992.
- [50] L. Larue, M. Ohsugi, J. Hirchenhain, and R. Kemler. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(17):8263–8267, 1994.
- [51] T. L. Le, A. S. Yap, and J. L. Stow. Recycling of e-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol*, 146(1):219–232, 1999.
- [52] Y. Le, S. Gagnetten, D. Tombaccini, B. Bethke, and B. Sauer. Nuclear targeting determinants of the phage p1 cre dna recombinase. *Nucleic Acids Res*, 27(24):4703–4709, 1999.
- [53] Y. Le, J. L. Miller, and B. Sauer. Gfpcre fusion vectors with enhanced expression. *Anal Biochem*, 270(2):334–336, 1999.
- [54] Ke Li and En Xu. The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development. *Neurosci Bull*, 24(3):195–200, 2008.
- [55] Terje Lømo. The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432):617–620, 2003.
- [56] J. J. LoTurco, D. F. Owens, M. J. Heath, M. B. Davis, and A. R. Kriegstein. Gaba and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit dna synthesis. *Neuron*,

- 15(6):1287–1298, 1995.
- [57] M. A. Lynch. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 84(1):87–136, 2004.
- [58] Robert C Malenka and Mark F Bear. Ltp and ltd: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1):5–21, 2004.
- [59] D. Maric, Q. Y. Liu, I. Maric, S. Chaudry, Y. H. Chang, S. V. Smith, W. Sieghart, J. M. Fritschy, and J. L. Barker. Gaba expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via gaba(a) autoreceptor/cl- channels. *J Neurosci*, 21(7):2343–2360, 2001.
- [60] H. Matsunami and M. Takeichi. Fetal brain subdivisions defined by r- and e-cadherin expressions: evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. *Dev Biol*, 172(2):466–478, 1995.
- [61] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov. Fluorescent proteins from nonbioluminescent anthozoa species. *Nat Biotechnol*, 17(10):969–973, 1999.
- [62] S. L. McIntire, R. J. Reimer, K. Schuske, R. H. Edwards, and E. M. Jorgensen. Identification and characterization of the vesicular gaba transporter. *Nature*, 389(6653):870–876, 1997.
- [63] K. Mikoshiba, M. Fukuda, K. Ibata, H. Kabayama, and A. Mizutani. Role of synaptotagmin, a ca^{2+} and inositol polyphosphate binding protein, in neurotransmitter release and neurite outgrowth. *Chem Phys Lipids*, 98(1-2):59–67, 1999.
- [64] Kazuhiro Muramatsu, Yukiko Hashimoto, Takefumi Uemura, Masataka Kunii, Reiko Harada, Takashi Sato, Akihiro Morikawa, and Akihiro Harada. Neuron-specific recombination by cre recombinase inserted into the murine tau locus. *Biochem Biophys Res Commun*, 370(3):419–423, 2008.
- [65] B. Ni, Y. Du, X. Wu, B. S. DeHoff, P. R. Rosteck, and S. M. Paul. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a human brain-specific na^{+} -dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem*, 66(6):2227–2238, 1996.
- [66] E. C. Ohki, M. L. Tilkins, V. C. Ciccarone, and P. J. Price. Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons. *J Neurosci Methods*, 112(2):95–99, 2001.
- [67] P. C. Orban, D. Chui, and J. D. Marth. Tissue- and site-specific dna recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15):6861–6865, 1992.
- [68] Suzanne Paradis, Dana B Harrar, Yingxi Lin, Alex C Koon, Jessica L Hauser, Eric C Griffith, Li Zhu, Lawrence F Brass, Chinfei Chen, and Michael E Greenberg. An

- rnai-based approach identifies molecules required for glutamatergic and gabaergic synapse development. *Neuron*, 53(2):217–232, 2007.
- [69] Andrew D Paterson, Robert G Parton, Charles Ferguson, Jennifer L Stow, and Alpha S Yap. Characterization of e-cadherin endocytosis in isolated mcf-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound e-cadherin. *J Biol Chem*, 278(23):21050–21057, 2003.
- [70] O. Pertz, D. Bozic, A. W. Koch, C. Fauser, A. Brancaccio, and J. Engel. A new crystal structure, ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of e-cadherin homoassociation. *EMBO J*, 18(7):1738–1747, 1999.
- [71] Ognen A C Petroff. Gaba and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*, 8(6):562–573, 2002.
- [72] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier. Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–233, 1992.
- [73] Margaret Renaud-Young and Warren J Gallin. In the first extracellular domain of e-cadherin, heterophilic interactions, but not the conserved his-ala-val motif, are required for adhesion. *J Biol Chem*, 277(42):39609–39616, 2002.
- [74] C. E. Ribak. Aspinous and sparsely-spinous stellate neurons in the visual cortex of rats contain glutamic acid decarboxylase. *J Neurocytol*, 7(4):461–478, 1978.
- [75] TW Ridler and S Calvard. Picture thresholding using an iterative selection method. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, 8:630–6032, 1978.
- [76] B. Rubinfeld, I. Albert, E. Porfiri, C. Fiol, S. Munemitsu, and P. Polakis. Binding of gsk3beta to the apc-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, 272(5264):1023–1026, 1996.
- [77] Patricia C Salinas and Stephen R Price. Cadherins and catenins in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*, 15(1):73–80, 2005.
- [78] B. Sauer. Inducible gene targeting in mice using the cre/lox system. *Methods*, 14(4):381–392, 1998.
- [79] L. Shapiro, A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grübel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman, and W. A. Hendrickson. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 374(6520):327–337, 1995.
- [80] J. J. Soghomonian and D. L. Martin. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol Sci*, 19(12):500–505, 1998.

- [81] R. B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, and A. T. Brunger. Crystal structure of a snare complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 a resolution. *Nature*, 395(6700):347–353, 1998.
- [82] J. D. Sweatt. Toward a molecular explanation for long-term potentiation. *Learn Mem*, 6(5):399–416, 1999.
- [83] Masatoshi Takeichi. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci*, 8(1):11–20, 2007.
- [84] L. Tang, C. P. Hung, and E. M. Schuman. A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 20(6):1165–1175, 1998.
- [85] D. Vestweber, A. Gossler, K. Boller, and R. Kemler. Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol*, 124(2):451–456, 1987.
- [86] Y. Voziyanov, S. Pathania, and M. Jayaram. A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res*, 27(4):930–941, 1999.
- [87] A. S. Yap, C. M. Niessen, and B. M. Gumbiner. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol*, 141(3):779–789, 1998.
- [88] Peter Young, Oreda Boussadia, Hartmut Halfter, Richard Grose, Philipp Berger, Dino P Leone, Horst Robenek, Patrick Charnay, Rolf Kemler, and Ueli Suter. E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. *EMBO J*, 22(21):5723–5733, 2003.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift