

Aus dem Institut für Anatomie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

Untersuchung adulter Neurogenese in Mäusen mit konditionalen neuronenspezifisch
deletierten N-WASP-Gen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tim Goeser

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Charlotte von Gall

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Kurt Gottmann

Zusammenfassung

Das Neural-Wiskott-Aldrich-Syndrom-protein (N-WASP) spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen des Aufbaus von Aktin-Netzwerken und somit bei der Entwicklung des Zytoskeletts von Zellen. N-WASP fungiert aufgrund seiner vielfältigen Bindungsregionen als Vermittler zwischen verschiedensten Signalmolekülen und dem Aktin-Skelett. Neurogenese kann im adulten Gehirn nur in zwei Regionen gefunden werden: zum einen in der Subgranulärzone des Hippokampus und zum anderen in der Subventrikulärzone des Seitenventrikels. Die adulte Neurogenese lässt sich grob in vier Stadien gliedern. Im ersten Stadium, der Proliferation, findet die Vermehrung und das Wachstum der Zellen statt. Im folgenden Stadium, der Migration, wandern die Zellen zu ihrem Bestimmungsort. Im dritten Stadium, der Differenzierung, werden Zellausläufer - sogenannte Spines und Dendriten - ausgebildet, um mit den vorhandenen Zellen zu interagieren. Im letzten Stadium, der Integration, adaptieren die Zellen an das bestehende neuronale Netzwerk. Die adulte Neurogenese ist abhängig von einem feinabgestimmten Aktin-Netzwerk. Ein Fehlen von N-WASP müsste sich somit im Ablauf der Neurogenese bemerkbar machen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die adulte Neurogenese in N-WASP-defizienten-Mäusen und ihren Wildtypen untersucht. Es wurde eine N-WASP-Knock-Out-Gruppe mit einer Wildtyp-Gruppe verglichen. Beide Populationen wurden mit BrdU behandelt, um Zellen in der Mitose zu markieren. Ein Teil jeder Population wurde 1 Tag nach der BrdU-Applikation perfundiert der andere Teil der Population nach 28 Tagen, um die unterschiedlichen Phasen der Neurogenese beurteilen zu können. Im ersten Schritt wurde über eine immunhistochemische Färbung die Gesamtanzahl der BrdU-positiven Zellen im Hippokampus Wildtyp gegen Knock-Out verglichen, um Unterschiede in der Proliferation zu ermitteln. Im zweiten Schritt wurden die Tiere aus der 28-Tage-Untersuchungsreihe mit Hilfe einer immunhistochemischen Kolo-kalisation in den Stadien der Migration und Differenzierung sowie der Integration im Vergleich der Population im Hinblick auf die Anzahl der BrdU-positiven Zellen konnten wir sowohl in der 28-Tages-Serie als auch in der 1-Tages-Serie keine signifikanten Abweichungen der Zellzahlen feststellen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass N-WASP in einem neuronenspezifischen Knock-Out mit dem Promotor CaMKII α keinen Einfluss auf die adulte Neurogenese hat.

Abstract

Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) plays a key role in actin-network development and in cytoskeleton construction. As a result of its diverse binding sites it is capable of mediating between different transmitting molecules and actin networks. Neurogenesis in adult brain is only known to take place in two areas: on the one hand in the subgranular cell layer of the hippocampus and on the other hand in the subventricular zone of the lateral ventricles. Adult neurogenesis can be divided into 4 steps. First, in the proliferation phase the cells multiply and grow. In the following migration phase these cells travel to their destinations. In the third phase, the differentiation, cells develop cell-processes as synapses and dendrites to communicate with existing cells. At last, in the integration phase, they are adapted as a part of the cellular network. Within a transgenic mice model a N-WASP knock out population and a wildtype population were compared to each other. Both populations have been treated with a high dose of BrdU in order to mark the cells in mitosis. One part of each population was killed 1 day after BrdU application and the other part after 28 days. As a first step we compared for day 1 and day 28 the number of BrdU-positive cells KO vs WT in the hippocampus. In order to assign them to the stages of neurogenesis in the second step cells were phenotyped with GFP, NeuN and DCX within mice with 28-day survival period. In comparative analysis of BrdU cells and their Phenotypes there was found no difference between KO and WT for the group of 1-day nor for the group of 28-day survival period. Our results suggest that N-WASP in a neuron-specific knock-out model has no influence on adult neurogenesis.

Abkürzungsverzeichnis

3D	<i>dreidimensional</i>
A	<i>Acidic-domain</i>
Abb	<i>Abbildung</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BR	<i>Basic region</i>
BrdU	<i>5-Bromo-2'-deoxyuridine</i>
C	<i>Cofilin-homology-domain</i>
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CaMk	<i>Ca²⁺/Calmodulin-dependent-protein-kinase</i>
Cre	<i>Cyclischen-recombination</i>
CRIP	<i>Cdc42-and-Rac-interactive-domain</i>
DCX	<i>Doublecortin</i>
DG	<i>Gyrus Dentatu</i>
EC	<i>Enterokortex</i>
F-Aktin	<i>filamentöses Aktin</i>
G-Aktin	<i>globuläres Aktin</i>
GBD	<i>GPTase-binding domain</i>
GCL	<i>Granular-Cell-Layer</i>
GFAP	<i>Glia fibrillary acidic protein</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
ML	<i>Stratum moleculare</i>
NeuN	<i>Neuron-specific nuclear antigen</i>
NPF	<i>Nukleation-promoting-faktor</i>
NSZ	<i>neuronal Stammzellen/Vorläuferzellen</i>
N-WASP	<i>Neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein</i>
OB	<i>Bulbus olfaktorius</i>
PAP	<i>perisynaptische astrozytische Prozesse</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PP	<i>Traktus perforans</i>
RMS	<i>rostraler Migrationsstrom</i>
SGZ	<i>Subgranulärzone</i>
SVZ	<i>Subventrikulärzone</i>

V	<i>verprolin-homology-domain</i>
WAS	<i>Wiskott-Aldrich-Syndrom</i>
WASI	<i>Wiskott-Aldrich-Syndrom-like</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein</i>
WAVE	<i>WASP-family-homology-Protein</i>
WH1/EVH1	<i>ENA/Vasodilator stimul. phosphoprotein-homology</i>
WH2	<i>WASP-homology-domain</i>
WIP	<i>WASP-interacting-Protein</i>
WISH	<i>WASP-interacting SH3 Protein</i>
WRC	<i>WAVE-regulating-complex</i>
WT	<i>Wildtyp</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Einleitung	- 1 -
<i>WASP</i>	- 1 -
<i>N-WASP</i>	- 1 -
<i>Aktivierung N-WASP</i>	- 2 -
<i>N-WASP-Interaktionen</i>	- 4 -
<i>Arp 2/3-Komplex und WASP-Familie</i>	- 5 -
<i>Strukturelle Ähnlichkeiten und Unterschiede der WASP-Familie</i>	- 5 -
<i>Aktin-Polymerisation</i>	- 7 -
<i>Aktin</i>	- 8 -
<i>Überblick Adulte Neurogenese</i>	- 8 -
<i>Neurogene Nische</i>	- 9 -
<i>Adulte Neurogenese im Gyrus Dentatus</i>	- 11 -
<i>Neuronale Stammzellen und Vorläuferzellen</i>	- 13 -
<i>Nervenzellmigration durch das Zytoskelett</i>	- 14 -
<i>Adulte Neurogenese und N-WASP</i>	- 16 -
<i>Regulation der adulten Neurogenese</i>	- 17 -
<i>Funktion der adulten Neurogenese</i>	- 18 -
<i>Tiermodell</i>	- 19 -
<i>Konditionaler Knock-Out</i>	- 19 -
<i>Ca₂₊/Calmodulin-dependent protein kinase II isoform α (CaMkIIα)</i>	- 20 -
<i>CaMkIIαCre-Knock-Out</i>	- 21 -
<i>Analyse des hippocampalen N-WASP-Gehalts mittels Western-Blot</i>	- 22 -
<i>Aufbau der Hippokampus-Formation</i>	- 23 -
<i>Subgranulärzone</i>	- 25 -
<i>Ausblick</i>	- 26 -
<i>Fragestellung</i>	- 27 -
Material und Methoden	- 28 -
<i>Versuchstiere</i>	- 28 -

<i>Applikationsschema</i>	- 28 -
<i>Untersuchung der Stadien der Neurogenese</i>	- 29 -
<i>Marker</i>	- 31 -
<i>BrdU (5-Bromo-2`-deoxyuridine)</i>	- 31 -
<i>GFAP (Glia fibrillary acidic protein)</i>	- 31 -
<i>DCX (Doublecortin)</i>	- 31 -
<i>NeuN (Neuron-specific nuclear antigen)</i>	- 32 -
<i>Chemikalien</i>	- 32 -
<i>Seren</i>	- 33 -
<i>Antikörper</i>	- 33 -
<i>Geräte</i>	- 33 -
<i>Lösungen</i>	- 33 -
<i>Immunhistochemie</i>	- 35 -
<i>Perfusion</i>	- 35 -
<i>Statistische Auswertung</i>	- 36 -
<i>Immunhistochemische Färbung BrdU bei freiflotierenden Schnitten</i>	- 37 -
<i>Immunhistochemische Färbung BrdU auf Objektträgern</i>	- 37 -
<i>Kresylviolett-Gegenfärbung</i>	- 38 -
<i>Immunfluoreszenz</i>	- 38 -
<i>Immunfluoreszenz-Analyse am BZ9000</i>	- 39 -
Ergebnisse	- 40 -
<i>BrdU: 1d Anzahl der proliferierenden Zellen Knock-Out gegen Wildtyp im DG</i>	- 40 -
<i>BrdU: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG</i>	- 43 -
<i>DCX: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG</i>	- 46 -
<i>GFAP: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG</i>	- 47 -
<i>NeuN: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG</i>	- 49 -
<i>BrdU: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im OB</i>	- 51 -
Diskussion	- 52 -
<i>Tiermodell</i>	- 52 -
<i>CaMkII</i>	- 52 -

<i>Zusammenhang von N-WASP und der Proliferation</i>	<i>- 54 -</i>
<i>Migration.....</i>	<i>- 55 -</i>
<i>Differenzierung</i>	<i>- 57 -</i>
<i>Integration und synaptische Verschaltung</i>	<i>- 59 -</i>
<i>WASP-Familie.....</i>	<i>- 60 -</i>
<i>Gliazellen.....</i>	<i>- 63 -</i>
Literaturverzeichnis	- 69 -

Einleitung

WASP

Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP) wurde im Zusammenhang mit dem X-chromosomal vererbten Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) zum ersten Mal beschrieben. Das WAS manifestiert sich klinisch durch eine Insuffizienz des Immunsystems und der Blutgerinnung [1]. Die typische Symptomtrias des WAS wird durch opportunistischen Infektionen, Ekzeme und Thrombozytopenie definiert [2]. Weitere Analysen konnten das mutierte WAS-Gen als Auslöser für WASP identifizieren. Bei einer alternativen WASP-Ausbildung sind chemotaktische Defekte, abnormale Morphologien, sowie Adhäsions- und Migrationsfehler bei Zellen des Immunsystems zu registrieren. Weitere Analysen zeigten eine Wechselwirkung zwischen den fehlenden zellulären Ausläufern hämatopoetischer Stammzellen und WASP auf. Anschließende Abhandlungen offenbarten eine Vielzahl von Verbindungen und Kopplungen zwischen WASP und dem aktinabhängigen Zytoskelett. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde das Neural-WASP (N-WASP) als neuronale WASP-Variante identifiziert [3].

N-WASP

Das Neural-Wiskott-Aldrich-Protein ähnelt im Aufbau dem WASP. N-WASP gehört zur WASP-Familie und wird durch das Wiskott-Aldrich-Syndrom-like-Gen (WASL-Gen) codiert [4]. N-WASP wird insbesondere in Neuronen exprimiert, kommt jedoch auch ubiquitär in Säugetierzellen vor. N-WASP gilt als das Schlüsselement bei der Kommunikation zwischen Signalmolekülen und der Aktin-Polymerisation [3, 5, 6]. Mit Hilfe vielfältiger Bindungsregionen integriert N-WASP als Mediator, Signalmoleküle und Transduktionskaskaden in das Aktin-Skelett. Forschungsergebnisse zeigen, dass N-WASP über das Aktinskelett ein tragender Faktor für die Invasivität von Zellen ist und so z.B. auch in Tumorzellen hochreguliert sein kann [7]. Die Abbildung 1 stellt schematisch den Aufbau von N-WASP dar. An der C-terminalen Region besteht N-WASP aus einer sogenannten VCA-Region, die sich zusammensetzt aus einer *verprolin-homology-domain* (V), auch als WASP-homology-Domain (WH2) bezeichnet, einer *cofilin-homology-domain* (C) und einer *Acidic-domain* (A). Daran schließt sich die *Prolin-rich-domain*, die *GPTase-binding domain* (GBD), die *Basic Region* (BR) und die

ENA/Vasodilator stimul. phosphoprotein-homology (WH1/EVH1), sowie das N-terminalen Ende an [5, 6].

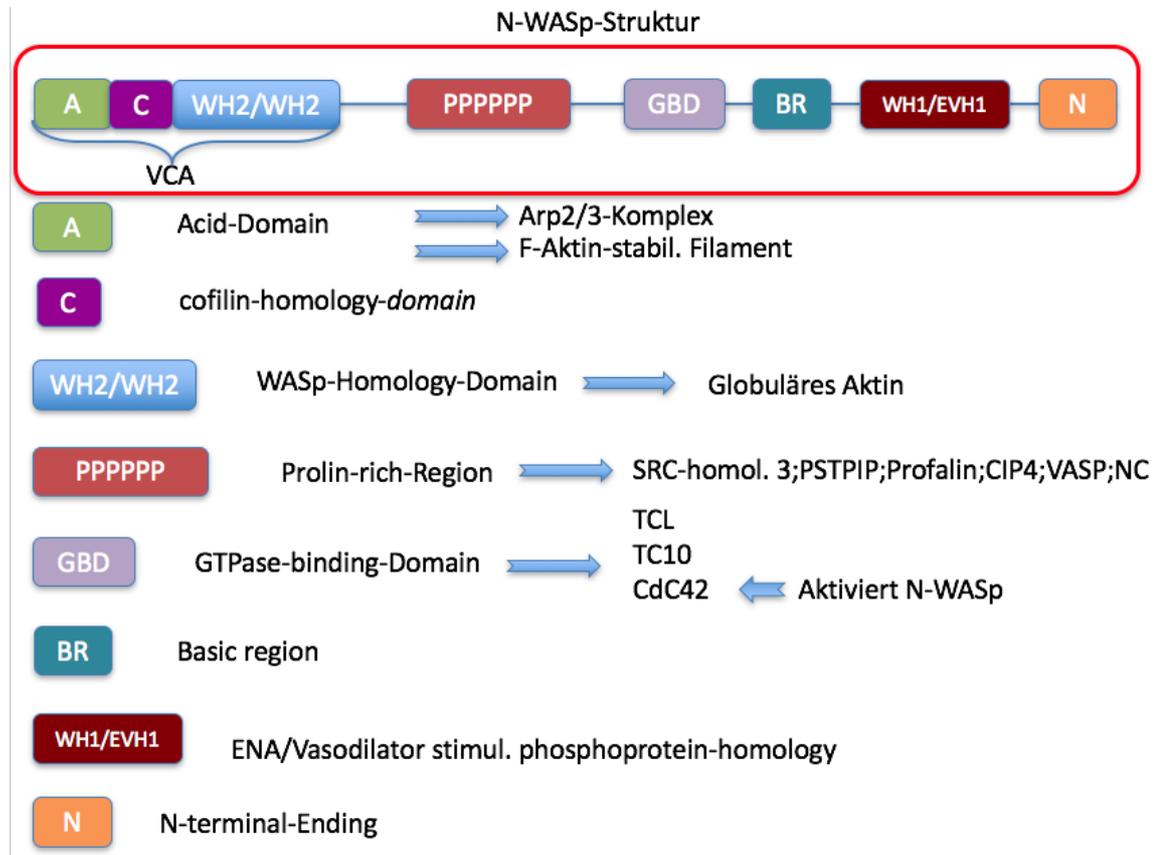


Abb. 1: N-WASP-Struktur

N-WASP besteht aus einer Acid-Domain (A) die an den Arp 2/3-Komplex bindet, sowie das F-Aktin-stabilisierende Filament. Die cofilin-homology-domain schließt sich an. Die WASP-Homology-Domain (WH2/WH2) folgt der cofilin-homology-domain und bindet an Globuläres Aktin. Diese drei Regionen werden zusammen als VCA-Region bezeichnet. Die nachfolgende Prolin-rich-Region (PPPPPP) verknüpft N-WASP mit Signalen von SRC-homology 3, PSTPIP, Profalin, CIP4, VASP, NCK. Die GTPase-binding-Region (GBD) ist assoziiert mit TCK, TC10 und Cdc42 dem Aktivator von N-WASP. GBD folgen die basic region (BR), die ENA/Vasodilator stimulating phosphoprotein-homology (WH1/EVH1) und das N-terminal-Ending (N).

Aktivierung N-WASP

Die Aktivierung von N-WASP funktioniert wahrscheinlich wie folgt und ist in der Abb. 2 beispielhaft graphisch veranschaulicht: Durch ein Signal kommt es bei einem Rezeptor zu einer Autophosphorylierung und einer Anlagerung von Nck. Das rezeptorständige Nck bindet an N-WASP über die *Prolin-rich-domain* zusammen in einem Komplex mit SH3-domain-containing-proteins und *WASP-interacting-Protein* (WIP). Im nicht aktivierten Zustand liegt N-WASP gefaltet vor. Es lagern sich die VCA-Region und die autoinhibitorische Region GBD aneinander und verhindern die Interaktion von N-WASP

mit Aktinfilamenten. Durch die Bindung von Cdc42 und dem membranständigen PtdInsP₂ kann die kompetitive Hemmung aufgehoben werden: N-WASP wird entfaltet und aktiviert. Im Folgenden bindet der Arp2/3-Komplex [8, 9] an die VCA-Region und die *Acidic-domain* (globuläres Aktin). Anschließend wird die Nukleation von Aktinmonomeren (G-Aktin) zu Aktinfilamenten (F-Aktin) unter GTPase-GTP-Verbrauch gestartet, dies gilt als der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Aktin-De-Novo-Synthese.

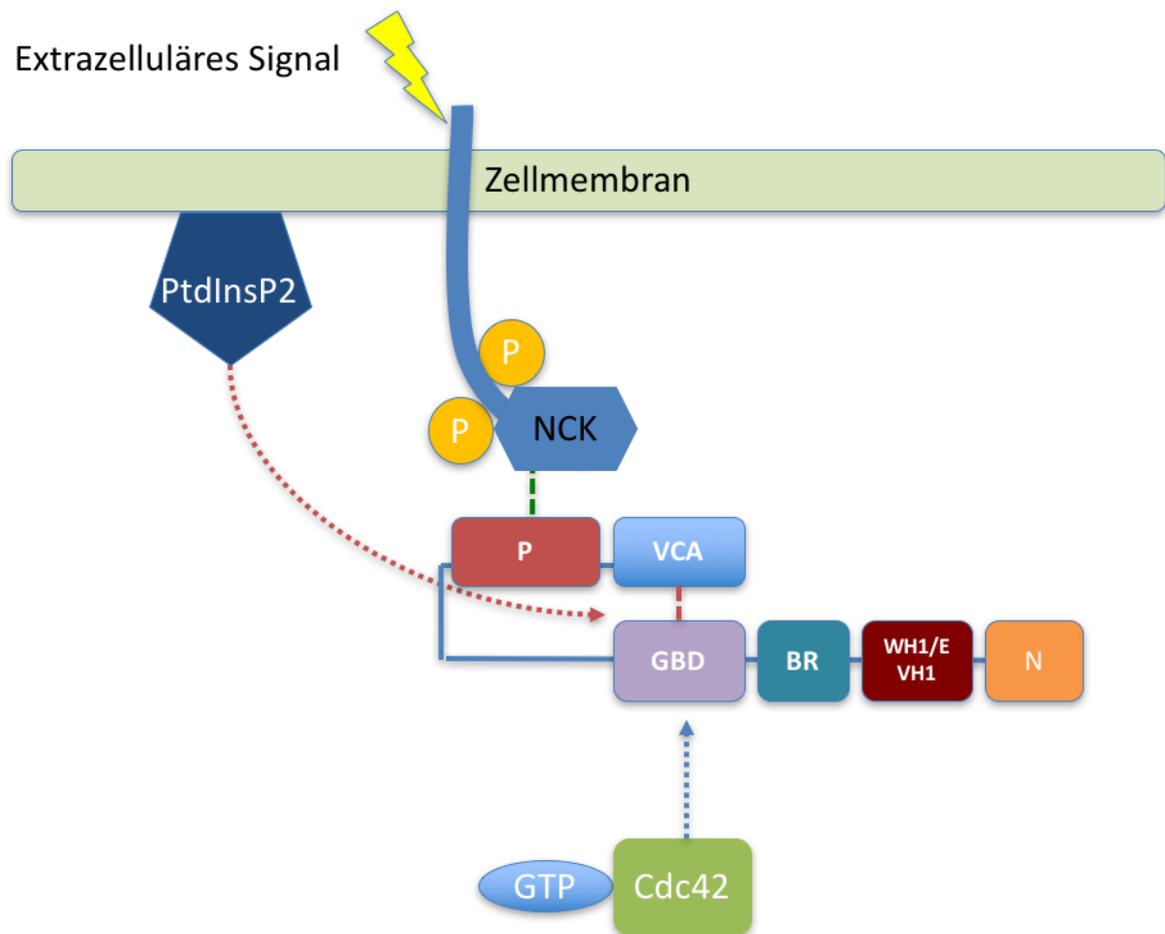


Abb. 2: Aktivierung von N-WASP

N-WASP liegt im inaktiven Zustand in gefalteter Form vor. Die VCA-Region ist der GBD-Region aufgelagert. Extrazelluläre Signale bewirken eine Autophosphorylierung des Rezeptors. Diese Autophosphorylierung macht die Anlagerung von NCK möglich. Über die Prolin-rich-Region (P) bindet das inaktive N-WASP, Nck an. Durch die Bindung von Cdc42 (an GTP gebunden) und PtdInsP₂ kann die Struktur von N-WASP entfaltet und aktiviert werden.

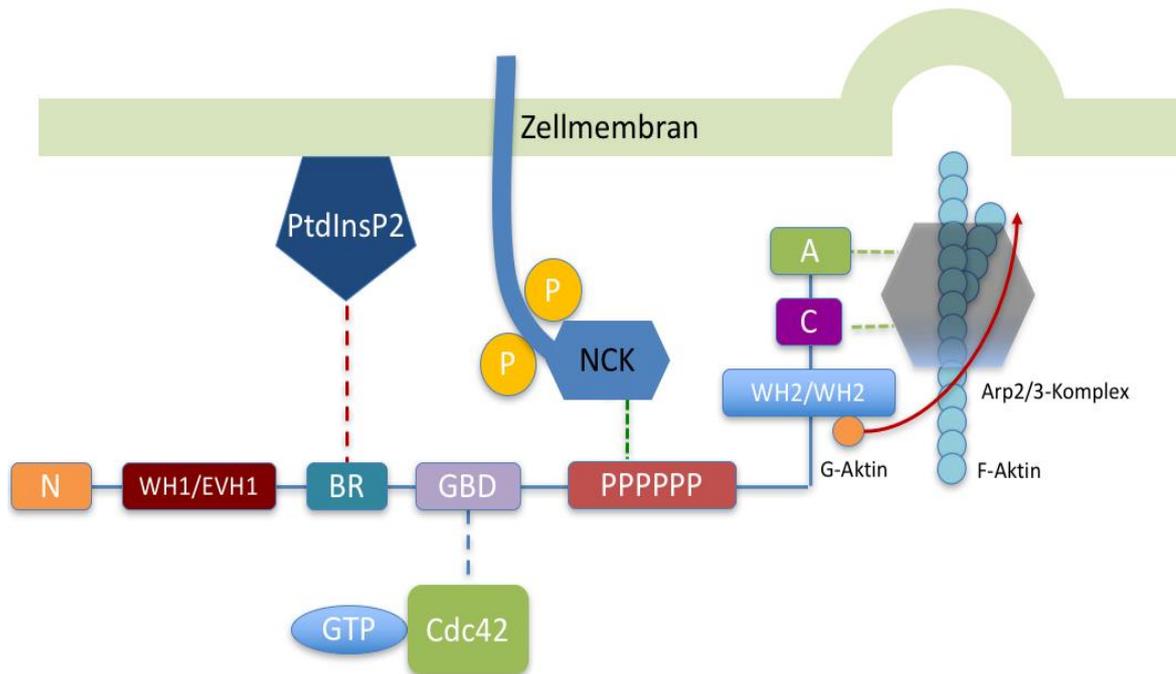


Abb. 3: Aktivierte Form von N-WASP

Durch die Bindungen von PtdInsP2 und BR, NCK und Prolin-rich-Region, sowie Cdc42 und GBD entfaltet sich N-WASP und geht in seine aktive Form über. Die VCA-Region bestehend aus WH2/WH2, C und A interagiert mit dem ARP2/3-Komplex und dem globulären Aktin. Das globuläre Aktin bindet an WH2/WH2 und dient dem Arp2/3-Komplex als Substrat zur Verlängerung von F-Aktin. Mit der Unterstützung des Arp2/3-complex können nun dynamische Zellprozesse wie die Ausbildung von Zellausläufern vorangetrieben werden.

N-WASP-Interaktionen

N-WASP und seine Bindungsstellen sind auf vielfältige Weise in der Lage mit ihrer Umgebung zu interagieren. N-WASP wird über Transduktionskaskaden von extra- und intrazellulären Reizen erreicht. Diese Reize kann N-WASP über den Arp2/3-Komplex in das Aktinskelett integrieren. Über die VCA-Region (auch *output-domain*) wird die Polymerisation von F-Aktin aus G-Aktin vorangetrieben [10]. Die *Prolin-rich-domain* interagiert über SH3-Gruppen mit Rezeptoren, wie z.B. dem membranständigen Rezeptor NCK [11, 12]. Zudem ist die Prolin-rich-domain ebenfalls an der Aktivierung des Arp2/3-complexes beteiligt [13]. Die GBD-Region oder auch CRIP-Region weist enge Bezüge

zur *Rho-family* der *Ras-like-GTPasen* auf. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind CDC42, Rac1 und Rho [14]. Die GBD-Region ist eine autoinhibitorische Region. Über die Interaktion mit dieser Region kann N-WASP aktiviert und somit als *downstream effector* der Rho-GTPasen wirksam werden [14].

Arp 2/3-Komplex und WASP-Familie

Der Arp2/3-Komplex ist das Bindeglied zwischen der WASP-Familie und der Ausbildung des F-Aktin. Der Arp2/3-Komplex besteht aus insgesamt sieben Polypeptiden: Arp 2, Arp 3 sowie ARPC 1-5. Die Aktivierung des Komplexes erfolgt über die Bindung von ATP, Aktin und *Nukleation-promoting-faktor* (NPF). Es sind zwei Klassen von NPFs bekannt. Die Klasse 1 beinhaltet unter anderem die WASP-Familie. WASP liegt normalerweise in einer autoinhibitorischen Form vor und kann vielfältig aktiviert werden, z.B. über extrazelluläre Einflüsse. Die Bindung eines aktivierten WASP bewirkt eine Konformationsänderung des Arp2/3-Komplex – somit wird dieser aktiviert. Der aktivierte Arp2/3-Komplex ist in der Lage F-Aktin mit dem vom WASP angebotenen G-Aktin zu verlängern. Das Aktinfilament wird jedoch nicht an seinem Ende verlängert, sondern es kommt zum *branching*. Arp 2 und 3 sind nun die ersten zwei Einheiten jedes Tochterstranges und treiben die Verästelung immer im 70 Grad Winkel voran. Über diesen Mechanismus werden Aktinnetzwerke gebildet. Das Wachstum der Tochterstränge kann über capping Proteine begrenzt werden [15]. Der dynamische Aufbau und Abbau von Aktin liefert die Grundlage für dynamische Zellfunktionen. Somit wird mit Hilfe von Aktin unter Einfluss des Arp2/3-Komplex die Endozytose ermöglicht und die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien vorangetrieben. Damit wird der Grundstein für Zellprozesse wie Differenzierung, Migration und Integration gelegt. Das genaue Zusammenspiel zwischen der Aktivierung des Arp2/3-Komplex und der WASP-Familie ist Gegenstand der aktuellen Forschung und kann zurzeit noch nicht in seinem vollen Umfang nachvollzogen werden.

Strukturelle Ähnlichkeiten und Unterschiede der WASP-Familie

Die Vertreter WASP-Familie bestehen aus circa 500 Aminosäuren großen Proteinen. Die drei am besten erforschten Proteine dieser Gruppe sind WASP, N-WASP sowie den

WASP-family-verprolin-homology-Protein (WAVE) 1, 2 und 3 [5, 6]. WAVE wird in der Forschungsliteratur auch als Scar bezeichnet oder es werden Begriffe wie WAVE/Scar oder *WAVE-regulating-complex* (WRC) verwendet. Die WASP-Familie zeichnet sich durch strukturelle Homologie im Aufbau sowie die Aktivierung des Arp2/3-Komplex aus. Alle Proteine dieser Gruppe sind in der Lage extrazelluläre Stimuli in das Aktinskelett zu integrieren. Durch ihren Aufbau verbinden sie Aktivierungskaskaden mit den *Rho-family-small-GTPasen* und der Aktinnukleation [16]. N-WASP interagiert mit Cdc42 und Rac, während WAVE seine Wirkung über Rac entfaltet [17, 18]. Somit verfügen alle Vertreter der WASP-Familie über eine *Prolin-rich-domain*. Des Weiteren existiert bei allen die N-terminale Region, welche die VCA-Region reguliert. Die VCA-Region fungiert als *output-domaine* und vermittelt die Verbindung zwischen Aktin und dem Arp2/3-Komplex. WASp und WAVE weisen im Vergleich zu N-WASP nur eine WH2-Region auf [19]. Molekularbiologische Experimente legen nahe, dass die Aktivierbarkeit des Arp2/3-Komplexes und seiner Untereinheiten nur durch zwei WH2-Region möglich ist [20, 21]. Statt einer WH1/EVH1-Region besitzt WAVE eine funktionell ähnliche WHD-Region. Über die WH1-Region findet die Wechselwirkung von WASP und N-WASP mit WIP statt [22]. Die Basic-region ist ebenfalls bei allen drei Proteinen vertreten. N-WASP und WASP verfügen darüber hinaus über eine GBD-Region. Diese ist eine autoinhibitorische Region, die über eine Interaktion mit Cdc42 und RAC eine Konformationsänderung erlaubt. Aufgrund seiner Interaktion wird die GBD-Region auch als *Cdc42-and-Rac-interactive-binding-domain* (CRIP) bezeichnet. Diese GBD-Region ist bei WAVE nicht vorhanden. Dadurch fehlt die Möglichkeit zu einer direkten Bindung an Rho-GTPasen, daraus lässt sich schließen, dass WAVE mutmaßlich in anderer Weise aktiviert wird als WASP und N-WASP [19]. Aufgrund der homologen Charakteristik agieren die WAVE-Proteine ebenfalls beim Schritt der Aktin-Polymerisation und damit beim Aufbau des Zytoskeletts sowie bei der Ausbildung von Zellausläufern wie Filopodien und Lamellipodien [23]. Diese sind essentiell für dynamische Zellgrundfunktionen. Es existieren gegenläufige Informationen auf welche Art und Weise die einzelnen Vertreter der WASP-Familie an der Regulation des Aktinskeletts beteiligt sind. WAVE 1 und 3 sind insbesondere im neuronalen Gewebe exprimiert, während WAVE 2 ubiquitär vorhanden ist. In der Forschung wird diskutiert inwiefern die WAVE-Familie eine unterstützende bzw. eine separate Funktion vorweisen. Jedoch scheinen der WAVE/SCAR-Komplex und N-WASP eine antagonistische Beziehung zu haben [7].

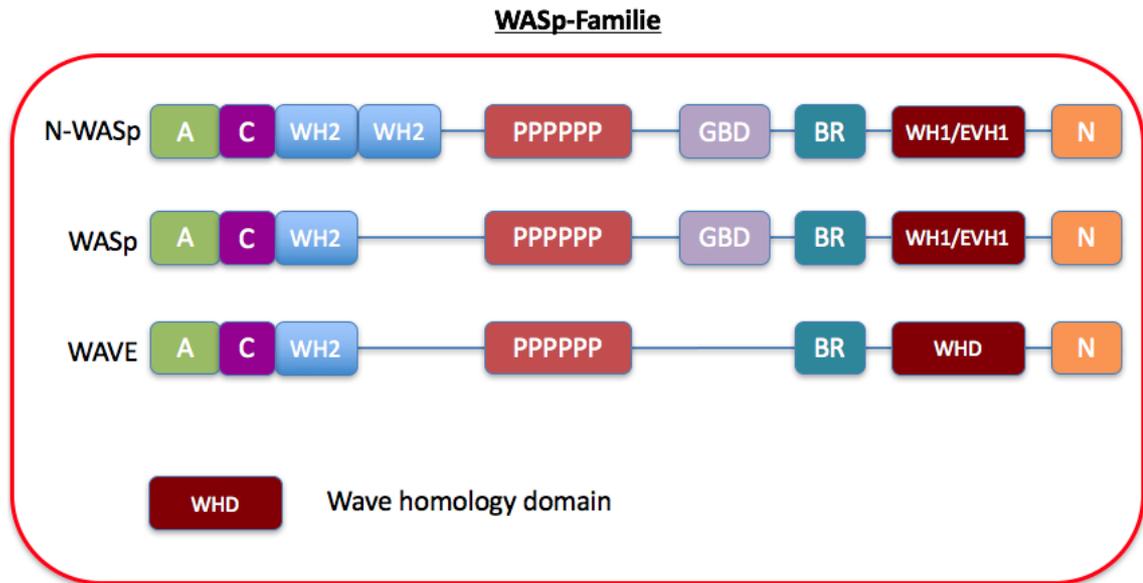


Abb. 4: Struktur der WASP-Familie

Die wichtigsten Vertreter der WASP-Familie unterscheiden sich nur geringfügig in ihrem Aufbau. Alle drei Proteine bilden eine VCA-Region aus. Das V der VCA-Region wird auch als WASP-Homology-Domain (WH2) bezeichnet. N-WASP verfügt im Gegensatz zu WASP und WAVE über zwei WASP-Homology-Domain, Alle Vertreter der WASP-Familie besitzen eine Prolin-rich-domain (PPPPPP). Bei N-WASP und WASP schließt sich an die P, eine GTPase-binding-Region (GBD) an. Die WAVE-Struktur weist keine GBD auf und besitzt statt einer ENA/Vasodilator stimulating phosphoprotein-homology (WH1/EVH1) eine WAVE-homology-domain (WHD). Alle drei Proteine besitzen eine N-terminale Region.

Aktin-Polymerisation

Die Aktinpolymerisation ist der entscheidende Schritt bei der Bildung von Aktinfilamenten: Aus dem monomeren G-Aktin wird über Nukleation F-Aktin synthetisiert. Die Entstehung von F-Aktin aus G-Aktin ist energetisch ungünstig und findet deshalb spontan nur vereinzelt statt, sodass die Verlängerung von Aktinfilamenten hauptsächlich über Nukleationsfaktoren durchgeführt wird [24]. Als Nukleationsfaktoren bekannt sind Formin, *tandem-monomer-binding nucleators*, sowie der, für diese Arbeit besonders relevante, Arp2/3-Komplex. Der Arp2/3-Komplex ist insbesondere bei der Vernetzung von Aktinfilamenten und damit bei der Ausbildung von Zellausläufern beteiligt [15, 25]. Die Aktivierung des Arp2/3-Komplex erfolgt maßgeblich über die WASP-Familie.

Aktin

Das Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt. Sein Anteil beträgt bis zu 20 Prozent am Gesamtprotein. Die Funktionen des Aktins sind dabei vielfältig: Auf der einen Seite stabilisiert es die äußere Zellstruktur, auf der anderen Seite ermöglicht es durch den raschen Auf- und Abbau die Ausbildung von Zellfortsätzen, z.B. Lamellipodien und Filopodien [23]. Darüber hinaus befestigt das Aktin essentielle Zellstrukturen untereinander und baut somit das intrazelluläre Transportnetzwerk der Zellen auf. Zudem bildet es mit seinen kontraktilen Eigenschaften die Grundlage für Muskelbewegungen in eukaryotischen Zellen [26]. Das Aktin spielt ebenfalls innerhalb der Prozesse der Genexpression sowie der Apoptose eine entscheidende Rolle. Aktin kann zum einen in Form eines Monomers als globuläres Aktin (G-Aktin) und zum anderen als filamentöses Aktin (F-Aktin), welches aus mehreren G-Aktin-Monomeren im Zuge der Aktinpolymerisation gebildet wird, vorliegen. Ein F-Aktin lagert sich in den Zellen mit einem zweiten F-Aktin unter Ausbildung einer rechtsdrehenden Doppelhelix zusammen und wird enzymatisch stabilisiert. F-Aktin wird über Profilin ATP-abhängig verlängert und kann durch Verzweigungen komplexe Netzwerke bilden. Mit der Hilfe von Chaperonen und heat-shock-proteine kann das Aktin zu Tertiär- bzw. Quartärstrukturen angeordnet werden und damit seine vielfältige Wirkung in den Zellen entfalten [27]. Aktin kann anhand seiner Ladung in verschiedene Isoformen unterteilt werden, welche vorrangig in unterschiedlichen Geweben exprimiert sind. Bei genetisch bedingten Störungen der Aktinsynthese treten je nach entsprechender Isoform komplexe Erkrankungen aus dem neuromuskulären Formenkreis auf.

Überblick Adulte Neurogenese

Neurogenese bezeichnet die Neubildung von funktionalen im Netzwerk integrierten Neuronen (Nervenzellen). Lange Zeit wurde angenommen, dass die Bildung von Nervenzellen auf die embryonale Entwicklung beschränkt ist. Die ersten Forschungsergebnisse, die auf die Fähigkeit adulter Säugetiergehirne zur Bildung neuronaler Zellen hindeuteten, sorgten für große Überraschungen und Skepsis. Die Entdeckung adulter Neurogenese (= Neurogenese im Erwachsenenalter) in isolierten Regionen des Hippokampus sowie des lateralen Ventrikels führte in den Folgejahren dennoch zu einem Paradigmenwechsel. Das aufkommende Interesse an der adulte

Neurogenese legte den Grundstein für eine Vielzahl von Folgeexperimenten, –mit dem Ziel deren Nutzen und Rolle zu erfassen. Fortschritte zum Verständnis regulierender endogener und exogener Faktoren, sowie zum Ablauf steigerten die Hoffnung, Hintergründe begreifen und den Prozess beeinflussen zu können. [28] Die adulte Neurogenese wird im Folgenden als Prozess der Entwicklung von reifen Neuronen aus ihren Vorläuferzellen, den sogenannten Progenitorzellen, verstanden. Die Progenitorzellen bilden sich proliferativ aus neuronalen Stammzellen. Circa 70-90% der Progenitorzellen entwickeln sich zu Neuronen, den restlichen Anteil stellen Gliazellen. In adulten Säugetieren wurde dieser Vorgang in der Subgranulärzone (SGZ) der Gyrus-Dentatus-Region und aus der Subventrikulärzone (SVZ) über den rostralen Migrationstrom im olfaktorischen Bulbus nachgewiesen [29-31]. In den folgenden Jahren gelang es adulte Neurogenese auch im Hippokampus des Menschen nachzuweisen [32]. Im Menschen sollen die neugebildeten Neurone unter anderem Lernverhalten, Gedächtnis und synaptische Plastizität beeinflussen [33]. Weitere Publikationen wiesen auf Zusammenhänge zwischen adulter Neurogenese und Erkrankungen wie Demenz oder Alzheimer hin. Dennoch wird der Nachweis adulter Neurogenese im Menschen noch immer kontrovers diskutiert. Während einige Forschungsgruppen postulieren, dass die adulte Neurogenese im menschlichen Hippocampus kontinuierlich stattfindet [34], kamen andere Forscher:innen zu dem Ergebnis, dass die Neurogenese nachdem Kindesalter auf kaum nachweisbare Raten abnimmt [35]. Beide Forschungsgruppen nutzten spezifische Marker für neuronale Stamm -und Vorläuferzellen. In den durchgeführten Versuchen wurde grundlegend davon ausgegangen, dass während der Neurogenese dieser Marker nachweisbar sein müsse. Obwohl in beiden Fällen Marker-positive Zellen nachgewiesen werden konnten, unterschieden sich die Ergebnisse in Validierung und Interpretation. Daraus folgt, dass technischen und methodische Unterschiede zu einer bedeutenden Variabilität der Ergebnisse führen und die Erforschung der humanen adulten Neurogenese in Zukunft auf zusätzliche Untersuchungsmethoden, wie MRT und NMR-Spektroskopie, angewiesen ist [28].

Neurogene Nische

Regionen, von denen die adulte Neurogenese ausgeht, werden als *neurogenic niche*, neurogene Nischen, bezeichnet. In diesen entwickeln sich Progenitorzellen aus neuronalen Stammzellen. Während 10-30 % der Progenitorzellen zu Gliazellen

differenzieren, entwickelt sich der Hauptanteil zu Neuronen. Grundlegend lässt sich dieser Prozess der adulten Neurogenese in vier Stadien gliedern. In der initialen Proliferationsphase vollzieht sich die Vermehrung der neuronalen Stammzellen/Vorläuferzellen (NSZ) und das Wachstum dieser Zellen. In der nachfolgenden Migrationsphase wandern die Zellen entlang der Migrationsströme zu ihrem Bestimmungsort. In der sich anschließenden Differenzierungsphase entwickeln sich die NSZ zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen [36, 37]. In der finalen Integrationsphase fügen sich die ausdifferenzierten Zellen in die bestehenden neuronalen Netzwerke ein. In vivo sind die Phasen der Neurogenese nicht eindeutig gegeneinander abgegrenzt – es bestehen vielmehr fließende Übergänge. Von der Entstehung einer Progenitorzelle bis zum ausgereiften und integrierten Neuron vergehen circa 28 Tage. Ein großer Anteil der gebildeten Zellen wandert während seiner Ausreifung in die Apoptose. Besonders wichtig für das Langzeitüberleben der heranreifenden Zellen im DG scheint die frühe Integration in das bestehende Netzwerk zu sein. Unter dem Einfluss von GABA sowie den Effekten von MDMA in der Langzeitpotenzierung, bzw. der Langzeitdepression, findet die Maturation dieser Zellen statt [38-41]. Es werden verschiedene fördernde und hemmende Faktoren der adulten Neurogenese beschrieben. Eine wichtige Rolle scheinen allgemeine Wachstumsfaktoren wie VEGF und IGF-1 einzunehmen [42, 43]. Ein hoher Kortisonspiegel bedingt durch Stress und hohes Alter wirkt sich negativ auf die adulte Neurogenese aus [44, 45]. Jedoch scheinen auch unspezifische Stimuli einen großen Effekt auf die Aktivierung der adulten Neurogenese zu haben: haben: Eine abwechslungsreiche Umwelt und körperliche Aktivität wirken sich positiv auf die NMDA-Ausschüttung und das Langzeitüberleben der Zellen aus [46-48].

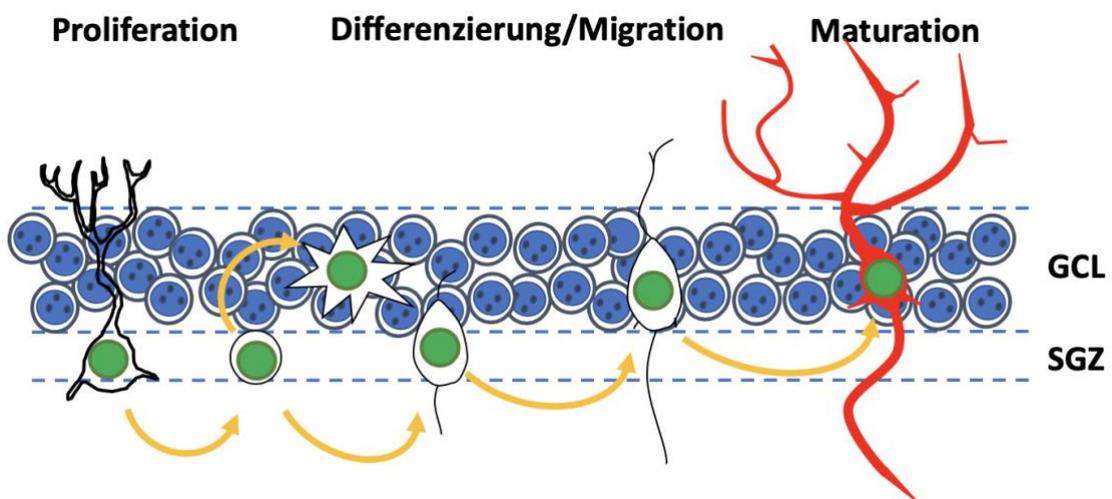


Abb. 5: Adulte Neurogenese im Gyrus Dentatus

Die adulte Neurogenese setzt sich aus den Stadien der Proliferation, Differenzierung, Migration und Maturation zusammen. In der SGZ des Gyrus Dentatus entwickeln sich NPCs, die in der Migrationphase zu ihrem Bestimmungsort wandern. Anschließend entwickeln sich aus diesen Zellen u.a. Astrozyten und Neurone. GCL: Granular-Cell-Layer, SGZ: Subgranulärzone

Adulte Neurogenese im Gyrus Dentatus

Bei der zellulären Entwicklung der adulten Neurogenese im DG lassen sich fünf Unterstadien herleiten. Diese Stadien sind in der Abbildung 6 dargestellt. Die ersten drei Stadien dieser Entwicklung finden im mitotischen Zyklus statt, die Stadien vier und fünf hingegen werden als postmitotisch beschrieben. Die adulte Neurogenese geht von putativen Stammzellen aus, den so genannten Typ-1-Zellen. Die Typ-1-Zellen definieren das Stadium 1 der adulten Neurogenese. Sie zeichnen sich durch den Marker GFAP aus. Folgend differenzieren sich die Typ-1-Zellen unter diversen Signalen in drei Subgruppen von schnell proliferierenden Progenitorzellen, mit jeweils unterschiedlicher Ausprägung von neuronalen Markern: den Typ-2a-, Typ-2b- und Typ-3-Zellen (Stadium zwei bis drei). Typ-2a- und Typ-2b-Zellen unterscheiden sich durch die Ausprägung des neuronalen Markers Doublecortin (DCX). Während der Marker von Typ 2b-Zellen exprimiert wird, fehlt er bei Typ 2a-Zellen. Die Typ-3-Zellen markieren den Wandel von Neuroblasten zur postmitotischen Phase: Sie wandern in die Granularzellschicht ein. Die unreife Granularzelle (Stadium vier) definiert sich durch den Nachweis des Moleküls Calretinin und die Zelle tritt in das postmitotische Stadium ein. Im letzten Stadium (fünf) findet die synaptischen Integration statt: Die Zellen werden Teil des hippocampalen neuronalen Netzwerks und exprimieren, als reife Neurone, den Marker NeuN [31, 37, 49]. Die Abb. fünf zeigt, wie die an der adulten Neurogenese beteiligten Zellen während ihres Reifungsprozesses aus der SGZ in das Stratum granulare des DG wandern. Zudem strecken sich die apikalen Dendriten der Zellen ins ML aus und die Axone finden als Moosfasern Anschluss an die Pyramidenzellen der CA3-Region. Es existieren zwei bekannte kritische Phasen in der Reifung der Zellen, beide sind entscheidend von den Einflüssen der Neurotransmitter bestimmt [47, 50, 51]. Im Besonderen scheint die unterschiedliche Aktivierung der Zellen durch GABA von enormer Bedeutung für die Integration zu sein [52]. Die erste Phase befindet sich innerhalb des Übergangs vom Progenitor- in das Neuroblastenstadium. Die Zellen können in dieser Phase von der umliegenden Mikroglia phagozytiert werden [50]. Zu diesem Zeitpunkt besitzen die Zellen noch keine synaptischen Kontakte, allerdings sind bereits GABA_A-Rezeptoren an der Zelloberfläche ausgebildet. Während dieser Übergangsphase werden die Zellen über

Interneurone mit dem Transmitter GABA tonisch depolarisiert [52, 53]. Die zweite kritische Phase stellt die Integration der jungen noch unreifen Neurone dar. In diesem Abschnitt der Zellentwicklung beginnt die Ausbildung von Synapsen und Dendriten. Der GABA-Einfluss der Interneurone wirkt nun auf die Zellen hypopolarisierend [47, 52, 54]. In der dritten Woche der Zellentwicklung wirkt neben GABA zusätzlich der Transmitter Glutamat aus Axonen des Tractus perforans auf die Zellen ein. Glutamat wirkt depolarisierend auf die Zellen [37, 55]. Mit Beginn der zweiten kritischen Phase sind zudem erstmals Efferenzen der neugebildeten Axone in den Moosfasern zu beobachten. Die Zellen ähneln nach dieser Phase in elektrophysischer Hinsicht bereits den adulten Neuronen [56].

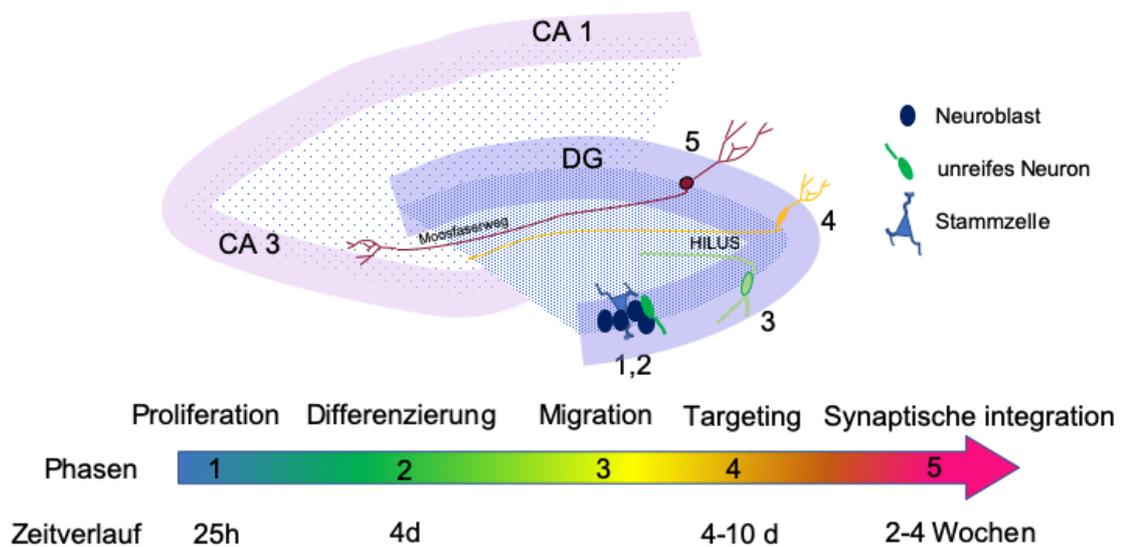


Abb. 6: Neurogenese im Gyrus Dentatus

Dargestellt sind die fünf Phasen der adulten Neurogenese im Gyrus Dentatus (DG): Proliferation, Differenzierung, Migration, Axon/dendrite targeting und synaptische Integration. In der SGZ des DG liegen Stammzellen, von denen Neuroblasten ausgehen. Die Neuroblasten entwickeln sich zu unreifen Neuronen, die ihre Differenzierung durchlaufen. Die unreifen Neurone wandern weiter in die Granularzellschicht des DG. Anschließend entwickeln die Zellen ausgeprägte Axone und Dendriten, um sich abschließend vollständig ins neuronale Netzwerk zu integrieren. In diesem letzten Stadium erstrecken sie ihre Axone zur CA 3-Region des Corpus Ammonis (CA). Die Dendriten der Zellen liegen in der Molekularzellschicht des DG. Während der Proliferation kann in den Zellen der Marker GFAP und nestin nachgewiesen werden.

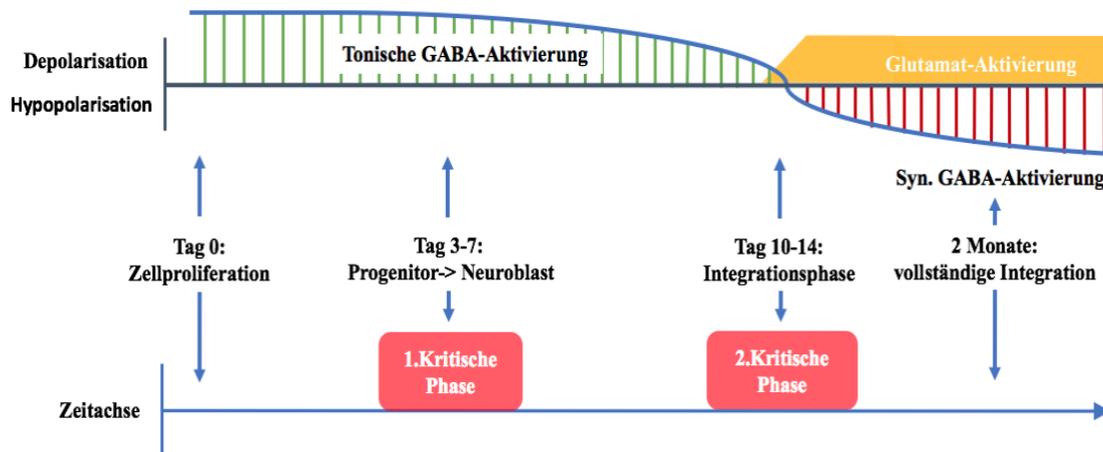


Abb. 7: Elektrophysiologie während der Neurogenese

Darstellung der elektrischen Aktivität der Zellen in Zusammenhang mit den Phasen der Neurogenese. Mit dem Beginn der Zellproliferation wirkt GABA, ausgeschüttet über Interneurone depolarisierend (erregend) auf die Zellen. Beim Übergang vom Progenitor- zum Neuroblastenstadium (Tage 3-7) findet die erste kritische Phase in der Entwicklung der jungen Neurone statt. Die zweite kritische Phase beginnt mit dem Eintritt der Zellen ins Integrationsstadium (Tag 10-14). Zu diesem Zeitpunkt werden die Synapsen der Zellen funktionsfähig und die Wirkung von GABA auf die Zellen ändert sich. In der Integrationsphase hemmt GABA die Neurone. Zusätzlich erreichen glutaminerge Verbindungen die Zellen und wirken depolarisierend. Die jungen Neurone haben nun ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften, wie die ausgereiften Nervenzellen. Nach zwei Monaten ist die Integration vollständig abgeschlossen.

Neuronale Stammzellen und Vorläuferzellen

Die NSZ sind der Ausgangspunkt für die adulte Neurogenese und liegen in der SGZ des Hippokampus [36]. NSZ sind omnipotent und besitzen die Eigenschaft sich zu teilen und zu differenzieren. Sie legen als Stammzellen die Grundlage für die Reifung von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Es ist umstritten, wie die Zellen der GCL zu klassifizieren sind: als Stammzellen oder multipotente Vorläuferzellen [58, 59]. Aus diesem Grund ist die Nomenklatur zwischen Stammzellen, Vorläuferzellen und Progenitorzellen uneinheitlich. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden NSZ und Vorläuferzellen als Synonym benutzt und damit von den Progenitorzellen abgegrenzt. NSZ/Vorläuferzellen sind GFAP-positiv [60]. Sie können sich zu Progenitorzellen differenzieren. Es wurden drei verschiedene Arten von Progenitorzellen (Typ1-3) beschrieben. Die erste Population entstandener Progenitorzellen wird Typ-1-Zelle genannt. Dieser Zelltyp stellt den größten Anteil der Progenitorzellen [60] dar. Die Typ-

1-Zellen sind in der SGZ zu finden und durch ihre triangulären Zellkörper charakterisiert. Sie strecken ihren apikalen Dendriten zur Molekularzellschicht des Gyrus Dentatus aus, dies dient vermutlich der vaskulären Versorgung der Zelle dienen [61]. Die Typ-1-Zellen sind GFAP und nestin-positiv und ähneln den Astrozyten auch in ihren Membraneigenschaften. Sie werden auch als *radial-glia-like-cells* bezeichnet. Im Gegensatz zu Astrozyten wird der Marker S100 β nicht exprimiert [61]. Viele Veröffentlichungen sehen in der Ausbildung einer Typ-1-Zelle den Beginn der adulten Neurogenese. Die Typ-2-Zellen haben kleinere polymorphe Strukturen mit kugeligen Zellkernen. Sie weisen kein GFAP auf, sind jedoch nestin-positiv [62]. Typ-2-Zellen dienen als Verbindung zwischen der Glia-Zell-Linie und der neuronalen Zelllinie [63]. Eine Subgruppe der Typ2-Zellen ist positiv für den Marker DCX und wird als Typ-2b bezeichnet. Der andere Teil der Gruppe ist DCX negativ und wird Typ-2a genannt [64]. Typ-2a-Zellen weisen die höchsten Proliferationsraten der Zellen auf und sind z.B. durch körperliche Aktivität besonders beeinflussbar [62, 64]. Typ-2-Zellen entspringen den Typ1-Zellen und können sich zu Typ3-Zellen differenzieren [65]. Diese werden auch als Neuroblasten bezeichnet und sind nestin-negativ. Sie weisen mehrere neuronale Marker auf (DCX, PSA-NCAM) und haben ihr Ähnlichkeit mit Gliazellen verloren. In der Typ-3-Zelle vollzieht sich die Veränderung von einer proliferierenden Zelle zum unreifen Neuron. Die Typ-3-Zelle tritt in ihrer Entwicklung aus dem Zellzyklus in die postmitotische Phase ein. Die Ausprägung von calretinin markiert den Übergang in die frühe postmitotische Phase. Später wird er bei ausgereiften Neuronen durch calbindin ersetzt [66].

Nervenzellmigration durch das Zytoskelett

Die Migration der Nervenzellen bzw. ihrer Vorläuferzellen unterliegt komplexen Mechanismen, von denen im Folgenden einige vorgestellt werden [67]. Diese Mechanismen sind vor allem für die Migration von Neuroblasten in der SVZ beschrieben, es lassen sich allerdings mit hoher Sicherheit allgemeingültige Prinzipien ableiten. Für die SVZ ist sowohl die Migration von Neuroblasten entlang des rostralen Migrationsstroms zum Bulbus olfaktorius als auch die Migration von Zellen zu Arealen mit neuronaler Schädigung, nachgewiesen [68-70]. Bei neuronaler Schädigung, wie z.B. einem Apoplex wird die Zellproliferation erhöht und die Zellen wandern zum Ort der Läsion. In dieser nehmen sie den Phänotyp der Neurone an der durch die Schädigung

zerstört worden ist. Obwohl die Zellen ein regeneratives Potential besitzen ist die Dimension der Regeneration, die zu Verfügung steht, nicht ausreichend, um große neuronale Defekte zu kompensieren [71]. Zur Migration stehen den Zellen generell verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Das Zytoskelett der Zellen erlaubt eine Fortbewegung entlang ihrer Zellfortsätze. Diese Zellfortsätze erfüllen die Aufgabe von Leitstrukturen und werden als *leading process* bezeichnet. Der *leading process* wird hauptsächlich aus Mikrotubuli gebildet [72, 73]. Im Gegensatz zu den Zellfortsätzen von Fibroblasten oder neutrophilen Granulozyten kann sich der *leading process* über weite Distanz vom Zellkörper entfernen [74]. Der *leading process* bildet an seinem Ende Filopodien aus. Diese Filopodien werden aus F-Aktin aufgebaut und über die Rho-assoziierte Aktin-Nukleatoren Rac1 und Vav3 reguliert [75]. Bei Knock-Out-Modellen, mit Rac1 und Vav3, konnte die fehlende Ausbildung von Filopodien nachgewiesen werden. Bei einer Deletion eines der Aktin-bindenden Proteine wie z.B Drebrin konnten abnormale Gestaltung der Filopodien beobachtet werden. Sowohl eine fehlende Ausbildung, als auch die abnormale Ausbildung der Filopodien führen zu einer fehlerhaften Migration der Neuroblasten [76, 77]. Drebrin scheint darüber hinaus an der Verknüpfung des F-Aktins mit dem Mikrotubuliapparat [78] beteiligt zu sein. Obwohl der *leading process* hochgradig beweglich ist, verbleibt der Zellkern relativ stationär - somit erinnert der *leading process* an einen Fühler. Nur wenn der *leading process* sich an einer Struktur befestigt, wird der Zellkörper und der Zellkern nachgezogen [72, 79]. Um dies zu verwirklichen, bildet der Neuroblast entlang des *leading process* Mikrotubuli aus, die über ein Centrosom mit dem Zellkern verknüpft sind. Das Centrosom verwaltet den Mikrotubuliapparat der Zelle. Vor der Verlagerung des Zellkerns bildet sich eine Schwellung im *leading process* aus. Das Centrosom wandert zu dieser Schwellung [72]. Über die longitudinalen Mikrotubuli wird der Zellkern mit Hilfe von Aktin-Myosin-Interaktion in Richtung des Centrosom bewegt. Sobald der Zellkern den Ort der Schwellung erreicht, stoppt die Bewegung und der Prozess beginnt von Neuem mit dem Ausstrecken des *leading process* [67, 72]. Zum jetzigen Zeitpunkt sind noch nicht alle an der Steuerung dieser Migration beteiligte Prozesse identifiziert, jedoch wurde sowohl eine Beteiligung des cdc42-complex als auch von WAVE1 beobachtet [77, 80]. WAVE1 wurde in diesem Zusammenhang über die Interaktion mit dem Arp2/3-complex als Aktivator des Aktinskeletts beschrieben. Eine weitere entscheidende Rolle bei der Migration der Zellen wird den chemotaktischen Signalen zugeordnet. Neustrophe Faktoren wirken anziehend auf die Zellen [81]. Darüber hinaus sind besonders im

Liquorraum *chemorepellents* nachgewiesen. Diese führen zu einer Zellbewegung in Gegenrichtung der Substanz [82]. In der Summe sind die chemotaktischen Signale ein Regulationsfaktor der Zellbewegung. Die Neuroblasten bewegen sich von der SVZ zum OB im rostralen Migrationsstrom (RMS). Die Neuroblasten bilden über Zelladhäsionsmoleküle eine Kette aus [83, 84]. Die Neuroblasten formen ihre eigene Leitstruktur und wandern in dieser Kette zu ihrem Zielort. Neuroblasten sind ebenfalls in der Lage entlang von Blutgefäßen zu migrieren. Dieser Prozess wurde erstmals im Zusammenhang mit Nervenzellverletzungen entdeckt und später zusätzlich während der adulten Neurogenese in der SVZ [67, 69, 70]. Die Neuroblasten interagieren in der Regel nicht mit dem Endothel der Gefäße, sondern mit einem schmalen Band aus Astrozyten, das die Kapillare begleitet [85]. Die Neuroblasten werden im RMS auch von Astrozyten begleitet, die *glial tubes* ausbilden. Die Astrozyten der *glial tubes* entspringen der *radial glia* [83, 86]. Die Astrozyten können durch Reize, wie z.B. einen Apoplex aktiviert werden. Neuroblasten sind daraufhin in der Lage, entlang der Zellfortsätze der aktivierten Astrozyten, zu migrieren [87, 88].

Adulte Neurogenese und N-WASP

Aktuell existieren kaum Veröffentlichungen, die sich auf den Zusammenhang zwischen N-WASP und der adulten Neurogenese fokussieren. Einige Publikationen konnten jedoch eine Verbindung zwischen der WASP-Familie und der adulten Neurogenese nachweisen [89]. Darüber hinaus ist die Rolle der WASP-Familie und insbesondere von N-WASP im Rahmen der embryonalen Nervenzellentwicklung hinreichend bewiesen. Obwohl die WASP-Familie alle Stadien der Neurogenese beeinflusst, ist sie bei der Migration und der Integration der Nervenzellen von entscheidender Bedeutung. Durch die Ausbildung von Zellfortsätzen und synaptischen Kontakten werden sowohl die Fortbewegung als auch die Interaktion von Nervenzellen ermöglicht. Zudem bestehen Verknüpfungen der WASP-Familie zu den Phasen der Proliferation und der Differenzierung. Die Regulation der WASP-Familie und ihrer Vertreter untereinander sowie die Abgrenzung ihrer Funktion und Lokalisation während der Neurogenese ist Gegenstand aktueller Forschungen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird in den nächsten Jahren die WASP-Familie einschließlich N-WASP und ihre Funktionen im Rahmen der adulten Neurogenese zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus rücken.

Regulation der adulten Neurogenese

Die Regulation der adulten Neurogenese ist das Ziel aktueller Forschung und nicht abschließend geklärt. Forschungsergebnisse erlauben jedoch einen Einblick in einige steuernde Mechanismen und Faktoren. So wurde beobachtet, dass bereits signifikante Unterschiede in der Aktivität und dem Ablauf der Neurogenese zwischen einzelnen Individuen existieren [31]. Es konnte eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, deren Expression bei den beobachteten Versuchstieren eine hohe Variabilität aufweist und somit die Neurogenese beeinflusst [90]. So wird durch ein zunehmendes Lebensalter die Aktivität der Neurogenese deutlich gesenkt. Faktoren, die sich signifikant während des Alterungsprozess des ZNS verändern und zu einer Abnahme der Aktivität führen, konnten im Rahmen von Tierversuchen verifiziert werden. So sinkt der Spiegel der astrozytären Faktoren VEGF, IGF-1 und FGF-2 mit zunehmenden Alter massiv [91, 92]. Diese Faktoren stimulieren normalerweise die Proliferation der Progenitorzellen [92]. Darüber hinaus ist eine Abnahme der Progenitorzellen in der SGZ mit zunehmenden Alter nachgewiesen [45]. Des Weiteren existieren Ergebnisse, welche auf ein erniedrigtes Ansprechen der Zellen auf Glucocorticoide hindeuten. Glucocorticoide sind wichtige Vermittler der Neurogenese und können hemmend auf die Apoptose wirken [44, 93]. Corticosteroide können jedoch bei hohen Wirkungsspiegeln einen negativen Einfluss auf die Neurogenese haben [94]. In einer eindrucksvollen Versuchsreihe konnte die altersbedingte Abnahme der Neurogenese, vermittelt über die hohen Kortisolspiegel, durch eine Adrenektomie aufgehalten werden [95]. Ein weiterer Mechanismus, der sich nachweislich in starkem Maße hemmend auf die adulte Neurogenese auswirkt ist Stress, unter dem es zu einer vermehrten NMDA-Rezeptor-Aktivierung kommt [96-99]. Gealterte Versuchstiere waren in Versuchen besonders anfällig für Stress [100]. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen einen Zusammenhang zwischen Neurogenese und der circadianen Uhr. Eine Derregulierung derselben kann sich negativ auf die Neurogenese auswirken. Zum Beispiel zeigte eine Deletion des Gens *Bmal1* ein vorzeitiges Altern der *neurogenic niche* im DG [101]. Zu den Faktoren die adulte Neurogenese stimulieren zählt unter anderem IL-6. Dieses wird besonders häufig mit Neurotrophenen koassoziiert und forciert eine Differenzierung der Progenitorzellen zu Neuronen [102, 103]. Eine Ausschüttung von IL-6 ist im Zusammenhang mit neuronalen Zellgewebsuntergang zu beobachten. Abgestorbenes Zellgewebe ist ebenfalls eine Stimulanz für die Neurogenese

[104]. Des Weiteren ist die positive Wirkung einer ereignisreichen stimulierenden Umwelt in vielen Veröffentlichungen bestätigt worden. Es scheint ein Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren, neuronalen Plastizität, Hippokampus-abhängigen Lernprozessen und adulter Neurogenese zu bestehen [105-107]. Zusätzlich ist körperliches Training mehrfach als begünstigend für die adulte Neurogenese beschrieben worden [108, 109].

Funktion der adulten Neurogenese

Die exakte Funktion der adulten Neurogenese ist der Gegenstand zahlreicher aktueller Forschungen und kann bislang nicht in ihrem vollen Umfang nachvollzogen werden. Eine fehlerhafte adulte Neurogenese steht u.a. im Zusammenhang mit der Temporal-Lappen-Epilepsie [110]. Zusätzlich existieren Verknüpfungen zwischen der adulten Neurogenese und dem Auftreten von Depressionen [111]. Der derzeitige Wissenstand deutet daraufhin, dass eine enge Verbindung zu Lernprozessen und Erinnerung besteht. Theoretische Modelle lassen einen Zusammenhang zur *pattern separation* möglich erscheinen. Die *pattern separation* ist ein Vorgang, bei dem Informationen des Neokortex zu kleineren Informationseinheiten reduziert werden [112]. Diese Informationsbruchstücke können in der CA3-Region des Hippokampus gespeichert werden. Im DG ist die Dichte an Granularzellen deutlich höher als im enthorinalen Kortex. Die efferenten Informationen des DG haben somit eine höhere Dimension als die afferenten Informationen. Dies erlaubt eine verbesserte Trennschärfe und Mustererkennung. Die Funktionsweise ist mit dem mathematischen Prinzip der *support vector machine* vergleichbar [113]. Eine *support vector machine* unterteilt eine Menge von Objekten auf eine Art und Weise in Klassen, sodass um die Klassengrenzen herum ein möglichst breiter Raum frei von Objekten bleibt. Auf diese Art und Weise ist eine verbesserte Klassifizierung und Unterscheidung erlaubt. In Vivo zeigten Bildversuche beim Menschen eine hohe Aktivität des DG bei der Unterscheidung visueller Bilder mit hoher Ähnlichkeit [114]. Die adulte Neurogenese kann mit der *pattern separation* durch folgende Hypothese in Zusammenhang gebracht werden: Bei zwei aufeinanderfolgenden Ereignissen mit hoher Ähnlichkeit werden die neuen Informationen den neugebildeten Neuronen zugeordnet und die Unterschiede der Ereignisse können erfasst werden. Bei einer nicht existenten adulten Neurogenese können die Unterschiede hingegen nicht dargestellt werden [115]. Verhaltensstudien bei Mäusen zeigen eine enge Korrelation zwischen adulter Neurogenese und *pattern separation*: Mit

Hilfe von Knock-out-Modellen wurden signifikante Unterschiede der *spatial discrimination* bei Anwesenheit der adulten Neurogenese nachgewiesen [116-118]. Die mit *pattern separation* gespeicherten Information können durch eine *pattern completion* wieder abgerufen werden [119].

Tiermodell

Ein großes Hindernis bei der Erforschung der adulten Neurogenese liegt in der Realisierung und Entwicklung von in vivo Untersuchungsmethoden. Häufig werden Proliferationsmarker in Kombination mit *fate-mapping*-Strategien benutzt, um die adulte Neurogenese nachzuvollziehen. Durch diese Konzepte lassen sich proliferierende Zellen kennzeichnen und ihre *fate-determination* nachverfolgen. Obwohl diese Techniken große Fortschritte erlaubt haben, weisen sie Limitationen auf. Da diese Methode, sowohl regional als auch zellulär unspezifisch ist, werden nicht nur die Zielzellen zum Zeitpunkt ihrer Teilung markiert, sondern auch Zellen in anderen Abschnitten des Cortex, sowie in anderen Phasen des Zellzyklus. Versucht man darüber hinaus den Zusammenhang zwischen einem bestimmten Protein und der adulten Neurogenese zu untersuchen, wird das Tiermodell zusätzlich anspruchsvoller. Im Idealfall soll das untersuchte Protein regions- und zellspezifisch entfernt werden. Um diese Anforderungen zu erfüllen, werden Knock-Out-Verfahren genutzt. In dieser Arbeit wurde ein transgenes neuronenspezifisches Tiermodell genutzt. Ein globaler N-WASP Knock-Out ist bereits in der Embryonalentwicklung letal [120]. Aus diesem Grund wurde ein konditionales Knock-Out-Modell genutzt. Mit Hilfe des Promotors CaMk-Cre wurde ein spezifischer konditionaler N-WASP-KO entwickelt, der selektiv und ausschließlich in adulten postmitotischen glutamatergen Neuronen zum Einsatz kommt.

Konditionaler Knock-Out

Ein Knock-Out bezeichnet die vollständige oder teilweise Inaktivierung eines Gens. Es findet entweder eine Deletion oder Insertion durch ein eingefügtes Exon statt. Im konventionellen Knock-Out wird eine embryonale Stammzelle manipuliert und auf Keimbahnebene eingefügt, folglich sind alle Zellen von der Inaktivierung betroffen. Das Knock-Out-Modell wird vor allem durch zwei Faktoren limitiert. Einerseits kann ein

embryonaler Knock-Out zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen führen bzw. nicht mit dem Leben des Versuchstieres vereinbar sein [121]. Andererseits stellt die Zuordnung zu einer bestimmten Zeltsorte oder einem Zellgebiet bei einem unbeschränkten Knock-Out eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Um diese Einschränkung zu umgehen wurden konditionale Knock-Outs entwickelt [122]. Bei konditionalen Knock-Outs ist eine gewebsspezifische und oder eine zeitliche Inaktivierung möglich. Im Allgemeinen wird ein Knock-Out über eine Cre-Rekombinase realisiert, die auf der Cyclischen-recombination (Cre) von Bakteriophagen basieren. Mit Hilfe dieser Cre-Rekombinase kann an einem ausgewählten Genabschnitt über die Katalyse zweier Erkennungsabschnitte (loxP-Elemente genannt) Exzision, Insertion, Translokation und Inversion erfolgen [123]. Soll ein gewebsspezifischer Knock-Out vollzogen werden, muss der Promotor zu einem Protein gehören, welches selektiv in der Zielregion vorkommt. Die Entwicklung von zell- und gewebespezifischen Knock-outs im Nervensystem stellt eine besondere Herausforderung dar: Neurone treten verhältnismäßig früh, während der Entwicklung in die postmitotische Phase, ein und verbleiben in dieser. Es ist nicht gesichert, ob Cre/loxP effektiv in postmitotischen Zellen wirken kann. Darüber hinaus sind neuronale Zellen mit ähnlicher Zytoarchitektur häufig in gleichartigen Strukturen, aber funktionell unterschiedlichen Regionen aufzufinden. Es stellt sich die Frage, ob es möglich ist, ein Gen differenziert in einer Region auszuschalten, die funktionell, jedoch nicht anatomisch abzugrenzen ist [122]. Um den aufgeführten Anforderungen gerecht zu werden und die Herausforderungen des konditionalen KO zu bewältigen wurde CaMkII- α als Promotor gewählt. Dieser ist sowohl stark lokal begrenzt als auch während der perinatalen und pränatalen Phase nicht aktiv.

Ca₂₊/Calmodulin-dependent protein kinase II isoform α (CaMkII α)

Die *Ca₂₊/Calmodulin-dependent-protein-kinase (CaMk)* ist besonders stark im zentralen Nervensystem ausgebildet. Sie nimmt eine entscheidende Rolle als Transduktionskaskade bei neuronalen Prozessen ein [124]. Eine Vielzahl der neuronalen Signale wirken über eine Erhöhung des Ca₂₊-Spiegels der Nervenzellen. CaMkII ist eine von insgesamt vier bekannten Klassen der CaMk. CaMkII ist eine durch den Ca₂₊/Calmodulin-Komplex regulierte spezifische Serin/Threonin-Protein-Kinase. Eine Aktivierung von CaMkII ist über die intrazelluläre Konzentration von Ca₂₊ und

Calmodulin reguliert. Die aktivierte CaMkII initiiert Signalkaskaden über Autophosphorylierungen. CaMkII wird über insgesamt vier Gene codiert und liegt durch alternatives *Splicen* in einer Vielzahl von Isoformen mit unterschiedlicher Lokalisation vor [125]. Die Isoform CaMkII α ist eine der Hauptfraktionen von CaMK und im Hippokampus verortet [126, 127]. CaMkII α ist eng mit der Langzeitpotenzierung und der postsynaptischen Plastizität im Hippokampus verbunden. Eine Defizienz von CaMkII α führt zu Fehlern im *spatial learning* und *fear learning* der Versuchstiere [128-130]. CaMkII- α wurde als gewebsspezifischen Promotor benutzt, um das WASI-Gen in der Zielregion des Versuchsaufbaus auszuknocken.

CaMkII α Cre-Knock-Out

Für den Versuchsaufbau wurde eine CaMkII α Cre-Knock-Out-Linie verwendet, hierfür wurden gefloxtete WASI-Mäuse mit CaMkII α Cre-Mäusen gekreuzt. In der Abb. 5 wird das Kreuzungsschema dargestellt. CaMkII wird hier als zellspezifischer Promotor verwendet, um mit Hilfe von Cre eine Deletion des gefloxteten WASI-Gen im Hippokampus durchzuführen. Bei den Nachkommen sind beide Veränderungen im genetischen Code vorhanden und das Gen wird beim Ablesen des homologen Gens ausgeknockt. In Versuchen zeigte sich, dass CaMkII α als Promotor auf das Proencephalon begrenzt ist und somit einen stark lokal begrenzten Knock-Out ermöglicht. Darüber hinaus ist gelungen mit Hilfe dieses Promotors Deletionen in postmitotischen Neuronen zu erreichen. Mittels CaMKII abhängiger DNA-Fragmente ist es möglich, den Knock-Out auf den Hippokampus zu begrenzen [122, 131]. Der CaMkII α -Promotor ist während der embryonalen Entwicklung nicht wirksam [132]. Die CaMkII α Ausbildung beginnt postnatal, somit ist CaMkII α , während der KO-kritischen Phasen des Wachstums nicht aktiv und die Wahrscheinlichkeit von entwicklungsassoziierten Störungen ist geringer [122, 133]. Die Ausprägung von CaMkCre beginnt ab der dritten postnatalen Woche [122], sodass der KO zu diesem Zeitpunkt aktiv wird.

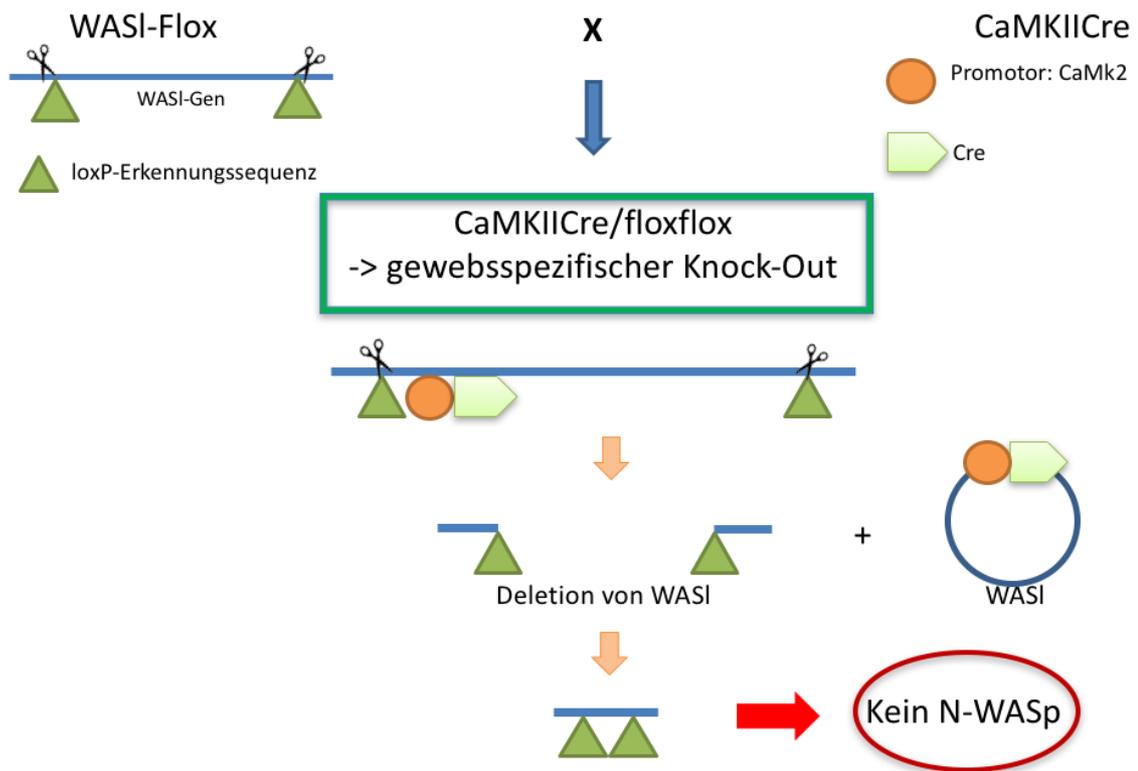
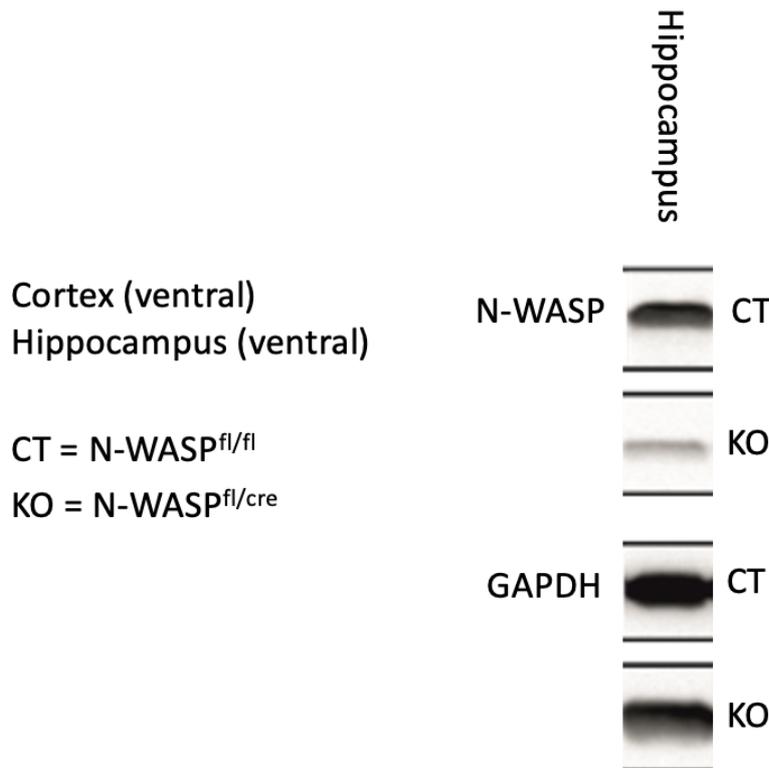


Abb. 8: N-WASp-Knock-Out

Eine Maus mit dem WASI-Flox, markiert durch zwei loxP-Erkennungssequenzen, wird mit einer CaMKIICre-positiven Maus gekreuzt. Die daraus entstehende Generation wird als CaMKIICre/floxflox bezeichnet. Der Promotor CaMKII lagert sich mit Cre an die loxP-Erkennungssequenz in den Zielzellen an. Durch Cre wird das gefloxtete Gen WASI ausgeschnitten. Durch den DNA-Reparatur-Mechanismen erfolgt eine Verknüpfung des unterbrochenen Strangs. Im genetischen Code der KO-Maus fehlt nun das Gen, welches für N-WASP codiert. Folglich kann N-WASP in den betroffenen Zellen nicht mehr synthetisiert werden.

Analyse des hippocampalen N-WASP-Gehalts mittels Western-Blot

Die Absicherung des N-WASP-KO auf Proteinebene erfolgte mit einem Western-Blot. Hierbei wurden Analysen von Proben des Hippokampus von KO- und WT-Tieren durchgeführt. Als Ladekontrolle diente das *Housekeeper*-Protein GAPDH. Die Ergebnisse des Western-Blots zeigten eine signifikante Reduktion von N-WASP in den KO-Tieren in Vergleich zu den WT-Tieren. Der Western-Blot wurde durch Nouri Parivash in Kooperation mit Prof. Reza Ahmadian aus dem Institut der Biochemie II durchgeführt.



Western Blots from Nouri Parivash (AG Prof. Ahmadian, Biochemie II)

Abb. 9: Western-Blot-Analyse N-WASP

Der Western-Blot zeigt eine signifikante Reduktion des hippocampalen N-WASP-Gehalts in N-WASP-KO-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden WT und der GAPDH-Expression. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Aufbau der Hippokampus-Formation

Der Hippokampus der Maus befindet sich im Temporallappen. Er ist entlang seiner rostro-caudal-Achse gebogen, wobei sich der dorsale bzw. anteriore Anteil horizontal befindet, während der ventrale bzw. posteriore Anteil zur Hirnbasis ausgerichtet ist. Der Hippokampus besteht im Wesentlichen aus drei Anteilen: dem Cornu Ammonis (CA), dem Gyrus Dentatus (DG) und dem Subiculum. Im Koronarschnitt stellt sich der Hippokampus mit zwei unterschiedlich großen entgegengesetzten Bogenformen dar. Das Subiculum bildet mit dem CA den größeren Bogen. Das CA wird in die vier Sektoren CA1-CA4 unterteilt. Die CA1-Region projiziert sich auf den superioren Anteil des Hippokampus. CA2 befindet sich in der Nähe des Umschlagpunktes. CA3 nimmt den Großteil des unteren Bogenanteils ein. Die CA4-Region hingegen befindet sich im DG [134]. Dieser liegt dem CA wie eine Kappe auf. Der DG lässt sich zytologisch in drei

Schichten unterteilen: Ein zellarmes Stratum moleculare (ML), ein zellreiches Stratum granulare (GCL) und ein polymorphes Hilum, in welchem sich die CA4-region befindet. Zwischen dem Hilum und dem Stratum granulare liegt die subgranuläre Zone (SGZ), der Ursprung der neuronalen Stammzellen. Im ML befinden sich die vertikal angeordnete apikalen Dentriten der Neurone aus dem GCL, sowie horizontal eingehende afferente Fasern. Im DG liegen dichtgepackt die Zellkörper der granulären Neurone. Die Axone dieser Neurone werden als Moosfasern bezeichnet und verlaufen durch den Hilus, dort geben sie Kollaterale an örtliche Neurone ab, zu den Pyramidenzellen der CA3-Region.

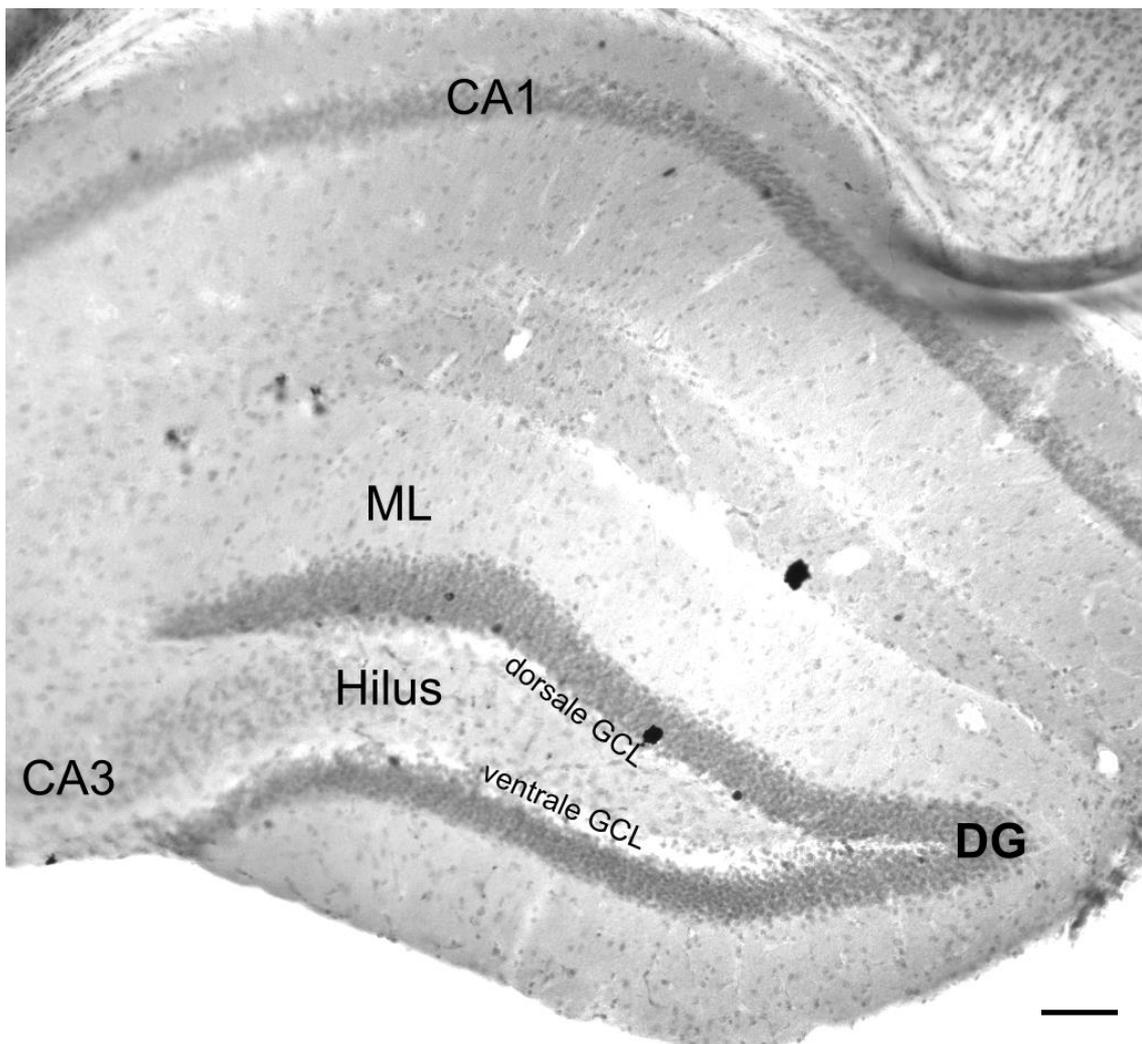


Abb. 10: Gyrus Dentatus und Hippokampus-Formation

Die größere der beiden bogenförmigen Strukturen besteht aus dem Cornu Ammonis, die kleinere wird vom DG gebildet. Links: Die CA1-Region befindet sich am dorsalen Anteil des größeren Bogens. Die CA3-Region setzt sich in den Hilus und damit auch in den DG fort. Die GCL des DG stellt sich kräftig kontrastiert und im Vergleich dicker dar. Sie umschließt das Hilum. Die ML liegt der GCL auf. Es wird zwischen einer ventralen zur Schädelbasis gerichteten und einer dorsalen zum Cortex gerichteten GCL unterschieden. Maßstabsleiste = 50 μ m

Subgranulärzone

Die adulte Neurogenese im DG beginnt in der SGZ. Diese grenzt die GCL und den Hilus voneinander ab. Nur in dieser Zone des Hippokampus existiert die Population der NSZ, deshalb wird SGZ als *neurogenic niche* bezeichnet. In der SGZ können die NSZ zu Progenitorzellen der Typen A, B und C proliferieren. Zusätzlich enthält die SGZ Zellverbände von Mikroglia, Oligodendrozyten, Astrozyten und Immunzellen. Zuführende Blutgefäße erlauben die Ausbildung von astrozytären und vaskulären Nischen. Das Zusammenspiel dieser Zellen ist wesentlich an der Regulation und dem Ablauf der Neurogenese beteiligt [135-137]. Die vaskuläre Nische erlaubt eine vielfältige Modulation der Zellen. Die Nähe zu Blutgefäßen scheint überhaupt erst die passende Umgebung zu bieten, in der Stammzellen wachsen und proliferieren können. Die vaskuläre Nische ist grundlegend an der Differenzierung der Zellen beteiligt und unterstützt die Migration [69, 137]. Wachstumsfaktoren wie VEGF und IGF-1 sind als wichtige Regulatoren in der Aktivierung der Zellproliferation nachgewiesen, während Cortisol eine hemmende Wirkung besitzt. [42, 43, 135, 138]. Die astrozytäre Nische interagiert ebenfalls mit den NSZ/Progenitorzellen und bestimmt unter anderem die Differenzierung der Zellen. Proliferierende Zellen weisen einen engen räumlichen Bezug zu Astrozyten auf [138]. In Bereichen mit einer *neurogenic niche* haben Astrozyten die Möglichkeit auf NSZs einzuwirken. Sie sind in der Lage zu sein, über eigene astrozytäre Faktoren und Zell-Zell-Verbindungen, direkt die NSZ zu beeinflussen [139]. Unter anderem wurde IL-6 als Stimulanz für NSZ identifiziert. IL-6 vermittelt im ZNS normalerweise inflammatorische Reaktionen. Der Faktor scheint darüber hinaus an der Neurogenese, der Gliogenese und Zellentwicklung beteiligt zu sein. Besonders interessant ist, dass IL-6 die Versorgung der Zellen mit Neurotrophinen gewährleisten kann. Neurotrophine wirken sich positiv auf das Langzeitüberleben von Zellen aus [102]. Darüber hinaus fördert IL-6, die Differenzierung der NSZ/Progenitorzellen zu Neuronen [140]. Die Faktoren FGF-2, IGF-1, VEGF werden ebenfalls von Astrozyten ausgeschüttet. Alle drei Faktoren stimulieren die adulte Neurogenese. So ist z.B. der IGF-1-Spiegel mit der Neurogenese korreliert [141]. Die Spiegel dieser drei Wachstumsfaktoren sinken mit zunehmendem Alter und sind sehr wahrscheinlich mit der Abnahme der Neurogenese im alternden DG assoziiert. Insbesondere nimmt jene Astrozytenfraktion, die FGF-2 sezerniert deutlich ab, während die Gesamtpopulation der

Astrozyten konstant bleibt [91]. Zusammenfassend benötigt die SGZ als *neurogenic niche* ein komplexes Umfeld, welches auf vielfältige Art den Prozess der Neurogenese reguliert.

Ausblick

Langfristig liegt großes Potenzial in der Erforschung der adulten Neurogenese. Dieses Potential setzt sich aus folgenden Aspekten zusammen: Es ist bekannt, dass eine Reihe von Erkrankungen mit einer Fehlregulation der Neurogenese verknüpft sind. Beschrieben ist z.B. der Zusammenhang von adulter Neurogenese mit Temporal-Lappen-Epilepsien, chronischen Schmerzsyndromen, Angststörungen und Depressionen [142-144]. Mit hoher Wahrscheinlichkeit werden im Laufe der nächsten Dekade noch weitere Erkrankungen mit Bezug zur adulten Neurogenese identifiziert. Es besteht die Hoffnung, dass bei näherer Kenntnis über die Regulation der adulten Neurogenese, unter sowohl physiologischen als auch unter pathologischen Umständen, die Entwicklung individueller Therapiekonzepte möglich wird. Der zweite Aspekt betrifft die Rolle der adulten Neurogenese in der Stammzelltherapie. Neurologische Läsionen bewirken einen Verlust von Nervenzellen. Die Neurodegenerativen Erkrankungen sind ebenfalls durch das Absterben von Neuronen charakterisiert. Parkinson und demenzielle Syndrome werden den neurodegenerativen Erkrankungen zugeordnet. In mehreren Studien wurde bereits bewiesen, dass adulte Neurogenese nach zerebralen Infarkten verstärkt stattfindet und sogar eine Migration zum betroffenen Ischämieareal möglich ist [145-147]. Die genaue Regulation dieser Abläufe ist Gegenstand intensiver Forschungen und zurzeit noch nicht in ihrer gesamten Komplexität erfasst. Allerdings liegen bereits wichtige Kenntnisse über Aktivatoren und Hemmer der Neurogenese vor. Eine essentielle Rolle scheint beispielsweise der Hormonhaushalt und seine Veränderung mit höherem Alter zu spielen [95]. Zudem wurde bereits mehrfach der positive Einfluss von Bewegung, Lernen und einer abwechslungsreichen Umgebung auf die Neurogenese festgestellt [105, 108, 109]. Diese positiven Aktivatoren könnten sich über eine Entwicklung neuer spezieller Sport- und Bewegungskonzepte nutzen lassen. Im Fokus stehen würden neben Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen und neurologischen Traumata auch Menschen mit zunehmendem Lebensalter. Sollten in naher Zukunft die Steuerung und Faktoren vollständig identifiziert und verstanden worden sein, besteht die Hoffnung auf eine aktive Rekrutierung der adulten Neurogenese. Wenn dieser Schritt erreicht werden sollte, sind

die Möglichkeiten der Nutzung fast unbegrenzt. N-WASP gehört zur WASP-Familie. Als wichtige Regulatoren des Aktinskeletts rückt die WASP-Familie im letzten Jahrzehnt zunehmend in den Mittelpunkt der Forschung. Eine besondere Rolle nehmen sie bei dynamischen Aktinprozessen ein. Diese erlauben unter anderem die Migration von Zellen. Für N-WASP wurden wichtige Funktionen bei der Invasion und Adhäsion von Zellen beschrieben. Darüber hinaus scheint N-WASP im engen Bezug zu der Migration und Metastasierung von Tumorzellen zu stehen [5, 148, 149]. Zudem ist N-WASP bei einigen Tumorentitäten überexprimiert [150]. Ähnlich wie bei der adulten Neurogenese besteht bei N-WASP bzw. der gesamten WASP-Familie ein hoher Forschungsbedarf. Die WASP-Familie sowie die verknüpfte Aktivierungskaskade bieten neue Angriffspunkte für *target therapie*. Auf lange Sicht kann mit neuen Therapien bei der Behandlung von metastasierenden Tumoren gerechnet werden.

Fragestellung

Die Neubildung von Nervenzellen und ihre Integration in neuronale Netzwerke ist aktinabhängig. Bei einer Deletion des WAS1-Gens durch einen konditionalen *Knock-Out* wird N-WASP nicht synthetisiert. Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen adulten Neurogenese und N-WASP sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1) *Wie wirkt sich das Fehlen von N-WASP auf die adulte Neurogenese aus?*

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wird die Anzahl der BrdU-positiven Zellen der Knock-Out-Versuchstiere mit den dazu gehörigen Wildtyp-Versuchstieren verglichen. Es stehen Versuchsgruppen mit 1 Tag und 28 Tagen Überlebenszeit nach BrdU-Applikation zur Verfügung, um differenziert die Überlebenszeit der neugebildeten Zellen zu beurteilen.

2) *Ist die Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen in Astrozyten oder Neurone durch die N-WASP-Defizienz verändert?*

Zur Beantwortung dieser Frage wird eine Phänotypisierung der Zellen mit Hilfe der Marker DCX, GFAP und NeuN durchgeführt

Material und Methoden

Versuchstiere

Die Tierexperimente wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Zur Untersuchung der Fragestellung wurden CaMkIICre-Knock-Out-Mäuse mit einer gewebespezifischen Defizienz des N-WASP (N-Wasp^{fl/fl} CaMKII α -Cre^{+/+}) und ihre entsprechenden Wildtypen (N-WASP^{+/+}CaMKII α -Cre^{-/-}) gezüchtet. Insgesamt standen 13 Wildtypen und 12 Knock-out-Mäuse zur Verfügung. Der Stichprobenumfang der Tiere einen Tag (1d) nach BrdU-Applikation umfasste sechs Tiere in der Wildtyp-Gruppe und fünf Tiere in der Knock-out-Gruppe. Der Stichprobenumfang der Tiere 28 Tag (28d) nach BrdU-Applikation umfasste acht Tiere in der Wildtyp-Gruppe und sieben Tiere in der Knock-out-Gruppe. Für die Versuche wurden erwachsene Tiere in einer Altersspanne zwischen 2,5 und 4 Monaten und einem durchschnittlichen Gewicht von 30g ausgewählt. Die Tierversuche wurden von Frau Dr. Stahr durchgeführt. Alle Tierversuche wurden im Einklang mit den europäischen Richtlinien 2010/63/EU durchgeführt und die Tierversuchsgenehmigung liegt unter Tiernummer 84-02.04.2012.A102, genehmigt durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen vor. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe hatte nach dem Abschluss der BrdU-Injektion eine Überlebenszeit von einem Tag. Anhand dieser Gruppe wurde hauptsächlich die initiale Proliferation untersucht. Die zweite Versuchsgruppe wurde 28 Tage nach der letzten BrdU-Injektion perfundiert. Diese Gruppe erlaubte eine Analyse des Langzeitüberlebens der Zellen so wie eine nähere Untersuchung der Neurogenesestadien.

Applikationsschema

Die Abbildung 10 veranschaulicht das Applikationsschema. Den Versuchstieren wurde über 3 Tage zweimal täglich in der Lichtphase morgens (zwischen 8 und 9 Uhr) und abends (zwischen 17 und 18 Uhr) BrdU (100mg BrdU pro Kilo Körpergewichts in einer 0,9% Kochsalzlösung) appliziert. Für die Zeitpunkte der Untersuchung erfolgte die erste

Probenentnahme zur Bestimmung der Proliferation einen Tag nach Abschluss der letzten BrdU-Applikation. Die Untersuchung der Migration, Differenzierung und Integration fand 28 Tage nach der letzten Applikation statt. Der 28-Tageszeitraum wurde gewählt, weil sich während dieser Zeitspanne eine neuronale Stammzelle zu einem ausgereiften Neuron entwickelt.

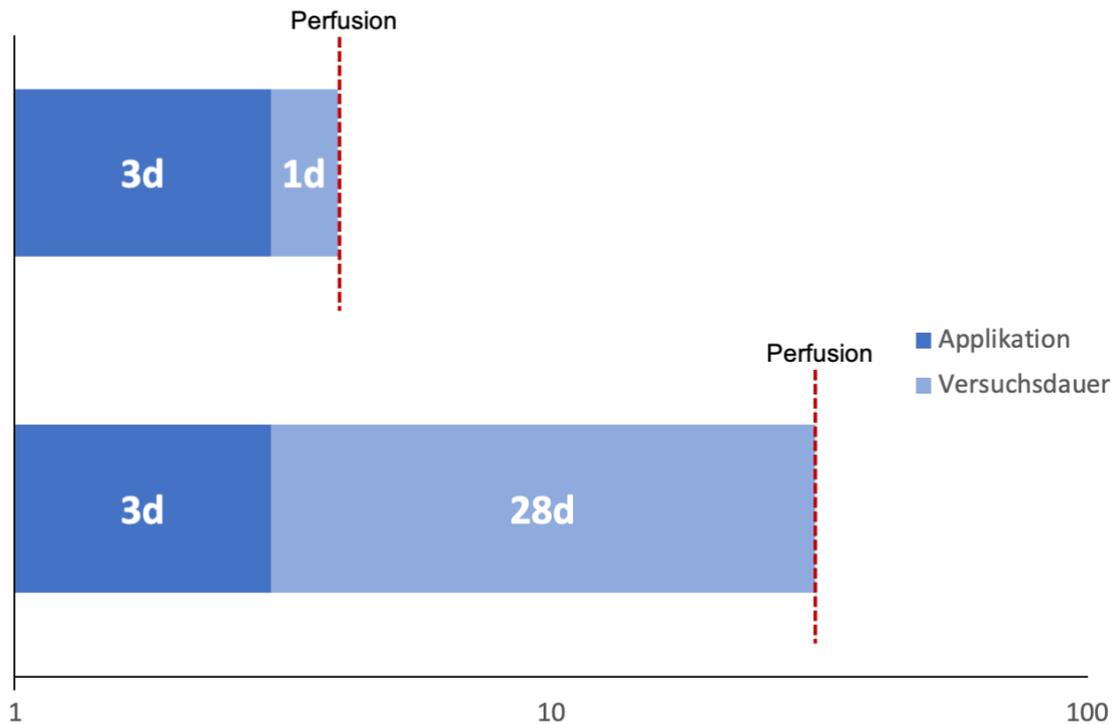


Abb. 11: Applikationsschema BrdU

Beide Versuchsgruppen werden drei Tage (3d) lang morgens und abends mit einer BrdU-Dosis von 100mg/Kg Körpergewicht behandelt. Die Überlebenszeit der ersten Gruppe betrug nach Abschluss der letzten BrdU-Applikation einen Tag (1d). Die zweite Gruppe wurde 28 Tage (28d) nach Beendigung der letzten BrdU-Injektion perfundiert.

Untersuchung der Stadien der Neurogenese

Proliferation

Die Proliferation ist die erste Phase der Neurogenese, sie besteht aus der Bildung von Progenitorzellen. Um die Proliferation zu analysieren, stand uns eine Gruppe von Tieren zur Verfügung, die einen Tag nach der letzten BrdU-Injektion perfundiert worden sind. Mit Hilfe des Markers BrdU wurden die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus markiert, sodass die BrdU-positiven Zellen in der Hippokampus-Region den sich proliferierenden

Zellen im ersten Stadium der Neurogenese entsprachen. Um das Langzeitüberleben der Zellen zu beurteilen, stand uns ebenfalls eine Gruppe von Tieren zur Verfügung, die 28 Tage nach der letzten BrdU-Applikation perfundiert worden ist.

Migration und Differenzierung

Diese beiden Phasen der Neurogenese werden mit Hilfe des Markers DCX untersucht. Dieser erlaubt jedoch keine Unterscheidung zwischen der Migration und Differenzierung, da der Marker in beiden Phasen vorhanden ist. Da sich die Frage nach dem Langzeitüberleben stellt und die Zellen sich nach einem Tag nicht im Stadium Migration und Differenzierung befinden können, wird die immunhistochemische Kolo-kalisation nur an der 28 Tage Versuchsgruppe durchgeführt.

Integration

Das letzte Stadium der Neurogenese ist die Integration. Diese Analyse wird ebenfalls ausschließlich an der 28-Tage-Versuchsgruppe durchgeführt, da auch in diesem Fall das Langzeitüberleben der Zellen analysiert werden soll. Es erfolgt eine immunhistochemische Kolo-kalisation mit den Markern NeuN und BrdU.

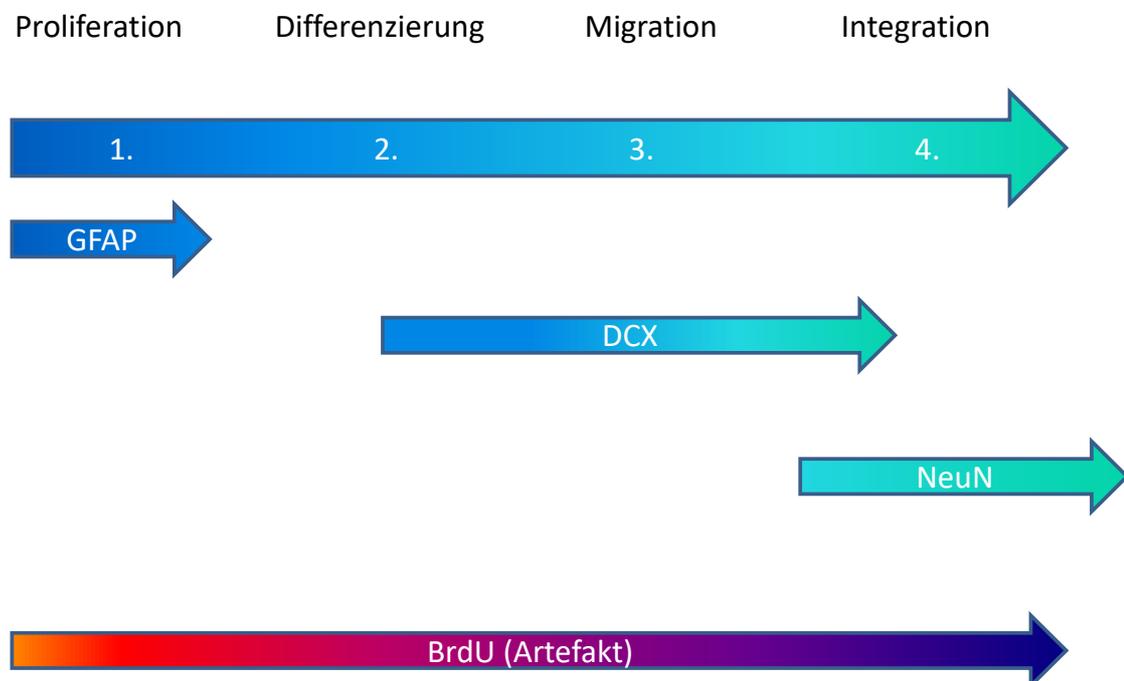


Abb. 12: Stadien der Neurogenese und ihre Marker

Die Abbildung veranschaulicht die Stadien der Neurogenese im longitudinalen Verlauf mit den zugeordneten Markern. In der Proliferation ist der Marker GFAP nachweisbar. Ab der Differenzierung bis zur Integration ist DCX verifizierbar. In der Phase der Integration und darüber hinaus bilden die Zellen NeuN aus. Durch die BrdU-Applikation der Mäuse

wird künstlich BrdU in sich entwickelnde Zellen eingebracht. Es bleibt über den gesamten Verlauf der Neurogenese nachweisbar.

Marker

BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine)

BrdU ist ein Thymidin-Analogon und wurde benutzt, um proliferierende Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zu kennzeichnen. BrdU stellte im Paper von Miller/Nowakowski 1988 [151] einen Durchbruch beim *Labeln* von neugeborenen Zellen im Gehirn dar. In der heutigen Forschung wird BrdU vorzugsweise bei der Untersuchung von Proliferationsstadien in situ verwendet. BrdU wird intraperitoneal appliziert. Über die BrdU-Dosierung kann zwischen der Markierung der S-Phase und sonstigen Prozessen, wie DNA-Reparatur, Gen-Duplikation und *Re-Entry-Zyklen* unterschieden werden [152]. Bei einer einmaligen BrdU-Applikation werden jedoch nur bis zu 10% der Zellen markiert [153]. BrdU ist zudem nach Einbau in die DNA bis zu 2 Jahre nachweisbar [154].

GFAP (Glia fibrillary acidic protein)

GFAP markiert im erwachsenen Gehirn neben reifen Astrozyten auch einen Großteil der neu entstandenen proliferierenden Zellen der SGZ und SVZ. Es wurde nachgewiesen, dass nicht nur die Vorläufer astrozytärer Zellen GFAP-positiv sind, sondern auch die Vorläufer von Neuronen und Oligodendrozyten eine Ausprägung für GFAP aufweisen. Versuche mit transgenen Mäusen zeigten deutlich, dass von GFAP-positive-Progenitorzellen der Hauptteil der adulten Neurogenese ausgeht [155]. GFAP wird besonders entlang der Zellausläufer ausgebildet, während es am Zellkörper kaum ausgeprägt ist.

DCX (Doublecortin)

DCX ist ein spezifischer neuronaler Marker im Gehirn. DCX ist eng mit dem Mikrotubuliapparat verknüpft und scheint nach aktuellen Studien nicht nur die Mikrotubuli zu stabilisieren, sondern auch deren Polymerisation voranzutreiben [156,

[157\]](#) DCX ist während der postmitotischen Phase, besonders in der Migration und Differenzierung ausgeprägt. Reife Neurone exprimieren kein DCX. Aufgrund seiner Dynamik und Spezifität gilt DCX als Goldstandard beim Markieren von Zellen während der Neurogenese.

NeuN (Neuron-specific nuclear antigen)

Reife Neurone exprimieren den Marker NeuN. Eine Ausnahme stellen die Purkinje-Zellen, die mitralen Zellen und die Granularzellschicht im Bulbus olfaktorius dar. NeuN wird als spezifischer Marker von Neuronen eingesetzt, um die postmitotische Phase der Neurogenese zu bestimmen. NeuN differenziert jedoch nicht zwischen neu entstanden Neuronen und bereits vorhandenen Zellen, deshalb wurde eine zusätzliche BrdU-Markierung verwendet, um die adulte Neurogenese spezifischer zu betrachten.

Chemikalien

- Xylazin (Rompun), Bayer
- Ketaminhydrochlorid, Actavis
- Heparin-Natrium, ratiopharm
- Isofluran, Piramal
- Triton x-100, Sigma-Aldrich
- OCT-compound, VWR chemicals
- H₂O₂
- HCL,
- Borsäure (H₃BO₃), Sigma-Aldrich
- Gelatine, Sciencelab.com, Inc.
- Natriumacetat, Sigma-Aldrich
- 2-Propanol, Sigma-Aldrich
- Ethylene glycol, Sciencelab.com, Inc
- Kresylviolett, Merck
- Salzsäure rauchend, 37%, Roth
- Entellan, Merck
- KCl

- Saccharose, Sigma
- Natriumphosphat monobasic, Merck
- Natriumphosphat dibasic, Merck
- Polyvinylpyrrolidone, Sigma

Seren

- Normal Goat Serum (lot x0927; Vector laboratories)

Antikörper

- Anti-DCX antibody (rb polyclonal) (Best.-Nr# ab18723), abcam
- Anti-NeuN (rb polyclonal) (Best.-Nr# MAB5324), Milipore
- Anti-BrdU (rt monoclonal) (Best.-Nr# OBT0030CX), Serotec
- Anti-GFAP (rb polyclonal) (Best.-Nr# 0334), DAKO
- Alexa Fluor 488 (Goat anti rb) (Best.-Nr# A11034), life technologies
- Alexa Fluor 568 (Goat anti rb) (Best.-Nr# A11036), life technologies

Geräte

- Schlittenmikrotom (Frigomobil®), Reichert-Jung
- Kryostat
- BZ-9000 (Fluoreszenz-Mikroskop), Keyence

Lösungen

Citratpuffer (pH 6):

- Stocklösung A: 50 mM Citronensäure-Monohydrat in 27,8 M destilliertem Wasser
- Stocklösung B: 0,1 M Natriumcitrat-Dihydrat in 55,5 M destilliertem Wasser
- 1 M Stocklösung A und 4,6 M Stocklösung B mit destilliertem Wasser auf 55,5 M aufgefüllt

10x PBS (pH 7,4):

- 80 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 15 mM KH₂PO₄
- 27 mM KCl
- 1,4 M NaCl
- In 44,4 M dis H₂O aufgelöst und auf 55,5 M aufgefüllt

1xPBS (pH 7,4):

- 5,7 M 10x PBS in 50 M dis H₂O

PBS-T 0,2%:

- 5,6 M 1x PBS + 200 0,031 mM x-100 Triton

PBS-T Serum 5%:

- 5,6 M PBS-T 0,2% + 0,3 M Normal Goat Serum
- H₂O₂ 0,6%
- 60 mM PBS + 3 mM H₂O₂

2N HCL:

- 0,2 M 12N HCL (37%) + 4,6 M dis H₂O

ABC Kits (Vector laboratories)

- 30 µl Reagenz A + 30 µl Reagenz B in 0,14 M PBS-T 0,2%

DAB (SIGMAFAST)

- 1 Tablette in 0,28 M 1xPBS; H₂O₂
- 1 Tablette in 0,28 M 1xPBS; DAB

Kyroprotektionlösung

- 4 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 14 mM Na_2HPO_4 wasserfrei
- 0,3 M NaCl
- 22,2 M A. bidest
- pH-Wert 7,3
- 1,75 M Sucrose
- 0,18 M Polyvinyl pyrrolidone
- 10,7 M Ethylene glycol
- 78 M MiliQWasser

Kresylviolett:

- 0,2 M $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$
- 17 M H_2O dest.
- 0,05 M CH_3COOH
- 0,31 mM Kresylviolett
- 15 min bei 60°C auflösen und filtrieren

Gelatine

- 6 mM Gelatine
- 0,2 mM Chrom. (III)-potasium-sulfat-dodecahydrat
- 11,1 M destilliertes Wasser

Immunhistochemie

Perfusion

Die Fixierung des Hirngewebes für die immunhistochemischen Auswertungen erfolgte über die Anwendung der Perfusionstechnik. Nach gründlicher Ketamin-Xylazin-Narkose

(Isofluran-Piramal/Heparin-Natrium5000) wurde den Versuchsmäusen (in Rückenlage fixiert) das Abdomen bis zum Ansatz des Brustbeins (Sternum) geöffnet. Nach Präparation und Fixierung des Herzens mittels Klemmen wurde die Punktion des rechten Vorhofs ausgeführt und die Tiere mit 2 min PBS (0,1M;4°C) über eine Perfusionsnadel entblutet. Die folgende Fixierung des Gewebes wurde über die Einleitung von 4% Paraformaldehyd (PFA;4°C) für 8 min realisiert. Zusätzlich erfolgte nach Präparation der Gehirne eine Fixierung in 4% PFA über 24h bei 4°C. Zur Kyroprotektion wurden die Gehirne in 20% Saccharose, bis zum Absinken der Präparate, inkubiert. Die beiden Hemisphären wurden sagittal geteilt: die eine Hemisphäre wurde ohne zusätzliche Fixierung bei -30°C tiefgefroren, während die andere nach Behandlung in Isopentan in Tissuetec fixiert wurde. Beide Hemisphären wurden bei -80°C gelagert. Für die Immunhistochemischen Analysen wurden die Proben einerseits unter Verwendung eines Schlittenmikrotoms (Frigomobil) koronar in 40µm dicke Schichten geschnitten und andererseits mittels Kyrostat in 20µm dicke Sagitalschnitte unterteilt. Die Konservierung der Schnitte erfolgte in Kyroprotektionlösung bei -20°C.

Statistische Auswertung

Die Primärdaten wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2010 für Windows gesammelt und tabellarisch geordnet. Es erfolgten Berechnungen zur Abschätzung der Gesamtzellzahlen. Die Wildtypen wurden dabei jeweils mit den zugehörigen Knock-Outs verglichen. Die Statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Prism 8 v.8.2.0 für macOS Mojave. Die Werte wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Bei vorliegender Normalverteilung wurde ein parametrischer t-Test (student t-test) gewählt, um die Mittelwerte der Nullhypothese gegenüber Alternativhypothese auf die statistische Signifikanz zu überprüfen. Bei nicht vorhandener Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Die Nullhypothese bezeichnet die Annahme, dass kein Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen existiert. Standardisiert sollte der p-Wert bei einem zweiseitigen Test unter der 5%igen Standardabweichung liegen, um von einer signifikanten Abweichung auszugehen. Liegt der p-Wert unter 0.05, ist die Nullhypothese zugunsten der Alternativhypothese abzulehnen. Liegt der p-Wert über 0.05, ist die Nullhypothese beizubehalten.

Immunhistochemische Färbung BrdU bei freiflotierenden Schnitten

Die Lokalisation sich teilender Zellen fand mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen statt. Repräsentativ wurde jeder sechste Schnitt gefärbt. Für die immunhistochemische Färbungen wurden die Gehirnschnitte einen Tag vor Beginn des Protokolls aus der Lagerung bei -20°C entnommen und in eine Lösung aus 1xPBS über Nacht bei 4°C gelagert, um die Kryoprotektionlösung abzuwaschen und die Schnitte zu reinigen. Im ersten Arbeitsschritt wurden die Präparate sechsmal in PBS-T 0,2% aufbereitet, um mögliche Verunreinigungen zu beseitigen. Das Triton übernimmt dabei die Aufgabe eines Detergens und reduziert die Oberflächenspannung und permeabilisiert zusätzlich die Membranen um ein Eindringen des Antikörpers in die Zelle zu erleichtern. Anschließend wurden die Präparate mit 0,6% H_2O_2 behandelt und erneut dreimal in PBS-T 0,2% gereinigt. Im folgenden Schritt erfolgte eine Inkubation in 2N HCL und eine anschließende Neutralisation mit 0,1 M Borsäure zur Demaskierung von BrdU und eine vierfache Aufbereitung mit PBS-T 0,2%. Daraufhin wurden die Schnitte zum Blocken mit PBS-T- Serum 5% behandelt. Im letzten Schritt des ersten Tages wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper Rat-monoclonal-anti-BrdU in PBS-T-Serum gelöst (1:800) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zu Beginn des zweiten Tages wurden die Schnitte in PBS-T 0,2% dreimal aufbereitet. Im Anschluss wurden die Präparate zum Blocken der unspezifischen Antikörperreaktionen in PBS-T Serum 5% behandelt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Goat-anti-Rat-IgG-biotin, welcher in PBS-T-Serum (1:500) gelöst wurde. Nach einer erneuten Reinigung wurden die Schnitte mit dem ABC-Kit behandelt und zusätzlich mit DAB inkubiert, um den Effekt zu verstärken. Nach einer abschließenden Aufbereitung erfolgte das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger mit anschließender Trocknung.

Immunhistochemische Färbung BrdU auf Objektträgern

Die Lokalisation sich teilender Zellen fand mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen statt. Repräsentativ wurde jeder sechste Objektträger gefärbt. Die Objektträger wurden zwei Stunden vor Beginn des Färbvorgangsauf der Wärmeplatte positioniert. Zuerst erfolgte eine Antigen-Demaskierung für dreimal vier Minuten mit kochendem Citratpuffer. Unter tröpfelnden VE-Wässern wurde für 20 Minuten die Abkühlung

vollzogen. Anschließend wurden die Objektträger in einer Küvette in TBST für fünf Minuten gereinigt. Im folgenden Schritt wurde die Schnitte für eine Stunde mit 1*PBST-Serum 3% blockiert. Anschließend wurden die Objektträger mit dem primären Antikörper Rat-monoclonal-anti-BrdU in PBS-T-Serum gelöst (1:800) und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Präparate dreimal fünf Minuten in TBST gereinigt. Daraufhin folgte die Inkubation mit dem sekundär-AK Goat-anti-Rat-IgG-biotin, der in PBS-T-Serum (1:500) für eine Stunde bei Raumtemperatur gelöst wurde. Anschließend wurden die Objektträger für dreimal fünf Minuten in PBST aufbereitet. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit dem ABC-Kit von Vectastain für eine Stunde inkubiert. Es erfolgte eine erneute Waschung für zweimal fünf Minuten in PBST und eine anschließende Farbreaktion mit DAB. Nach einer abschließenden Reinigung mit PBST für dreimal zehn Minuten wurden die Objektträger mit Gelatine beschichtet und nach dem Trocknen mit Entellan gedeckelt.

Kresylviolett-Gegenfärbung

Die aufgezogenen Schnitte wurden mit Kresylviolett bei 60°C für 3 Minuten gefärbt und anschließend für zweimal eine Minute in 70%igem Isopropanol entfärbt. Daraufhin erfolgte für jeweils zweimal die Dauer von einer Minute eine Inkubation mit 97%igem Isopropanol und 100%igem Isopropanol. Abschließend wurden die Präparate mit Hilfe von Xylazin kristallisiert und noch nass mit Entellan eingedeckt. Die Kresylviolett-Gegenfärbung fungierte als Hintergrundfärbung und koloriert die Neurone dezent bläulich. So konnte eine bessere Unterscheidung der histologischen Schichtungen des Gyrus Dentatus bei der Auswertung ermöglicht werden.

Immunfluoreszenz

Die Kolokalisation und Subtypisierung der Zellen wurde über das Verfahren der Immunfluoreszenz realisiert. Repräsentativ wurde jeder 12te Schnitt gefärbt. Die Schnitte wurden einen Tag vor Beginn der Färbung aus der Lagerung bei -20°C entnommen und mit einer Behandlung in PBS bei 4°C von der Kryoprotektionlösung befreit. Im ersten Schritt wurden die Schnitte 6fach in PBS-T 0,2 % gewaschen, um Verunreinigungen zu beseitigen und die Zellmembran zu permeabilisieren. Folgend wurden die Präparate mit

2N HCL bei 37°C behandelt, um eine Denaturation der DNA zu ermöglichen. Anschließend wurde eine Neutralisation mit 0,1M Borsäure vorgenommen. Danach erfolgte eine erneute Waschung mit PBS-T 0,2%. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte zur Blockung in PBS-T Serum 5% behandelt und daraufhin mit dem primären Antikörper über Nacht inkubiert. Im weiteren Verlauf des Protokolls wurden die Schnitte zu Beginn mehrfach in PBS-T 0,2% gereinigt. Zur Blockierung der unspezifischen Antikörperreaktionen erfolgte eine Behandlung mit PBS-T Serum 5%. Anschließend wurden die Präparate mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper inkubiert, dieser und die folgende Reinigung mit PBS-T 0,2 % wurden in Dunkelheit durchgeführt, um ein Verblässen der Immunfluoreszenz zu verhindern. Abschließend wurden die Schnitte mit Gelatine auf einen Objektträger aufgezogen und in Dunkelheit getrocknet. Nach dem Trocknen der Schnitte erfolgte mit Hilfe von Entellan das Eindeckeln der Objektträger und die weitere Lagerung bei 4°C.

Immunfluoreszenz-Analyse am BZ9000

Die Analyse der Immunfluoreszenz-Färbung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskop BZ9000, Keyence. Für die primäre Auswertung wurde das Objektiv mit 40facher Vergrößerung im *single-channel-view-Modus* gewählt und die BrdU+-Zellen in der Hippokampusregion gezählt. Mit der Funktion *saturated Pixel* wurde die Beleuchtungszeit angepasst, um ein zusätzliches Ausbleichen der Färbung zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen fokussiert und mit Hilfe der Funktion *Z-Stacks* wurden die Grenzen der Zellen dargestellt, um die gesuchten Zellen in der *Z-Ebene* zu isolieren. Daraufhin erfolgte ein Wechsel in den *multi-channel-view-Modus*, der es ermöglicht die verschiedenen Fluoreszenzen parallel zu vergleichen. Die Fotos wurden gespeichert und anschließend im Analyser-Programm des Keyence mit den Funktionen *Haze-Reduction* (Rauschreduktion) und *Blackbalance* (Schwarzanpassung) bearbeitet. Im folgenden Schritt wurden die *Z-Stacks* beider Färbungen übereinandergelegt, ein sogenanntes *overlay* wurde erzeugt, um doppeltpositive Zellen darzustellen. Bei Bedarf wurde eine 3D-Analyse dieses *Overlays* angefertigt. Mit Hilfe dieses Verfahrens war es möglich, die Menge der doppelt-positiven Zellen zu bestimmen. Die erfasste Zellanzahl auf den Objektträgern wurde mit der Anzahl der Schnittserien multipliziert, um ein Maß für die Gesamtanzahl zu erhalten. Die Zellen wurden nach ihrer Lage wie in der Abb. 12 schematisch dargestellt, der GCL oder der SGZ zugeordnet.

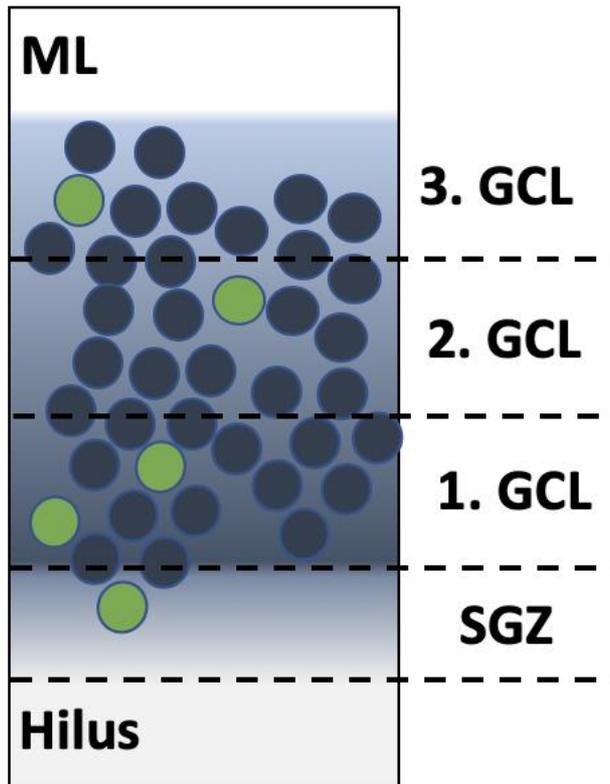


Abb. 13: Schematische Darstellung zur Kategorisierung der Zellen nach ihrer Lage im DG.

Die Schematische Darstellung zeigt die Zuordnung der Zellen im DG. Die SGZ wurde als zwei Zellen breiter Bereich entlang der inneren Grenze der GCL zum Hilus hin definiert. Die GCL wurde in ein inneres, mittleres und äußeres Drittel geteilt. Die grünen Zellen stellen BrdU-positive Zellen dar.

Ergebnisse

BrdU: 1d Anzahl der proliferierenden Zellen Knock-Out gegen Wildtyp im DG

Bei der Analyse von BrdU-positiven Zellen im Hippokampus mit einem Tag Überlebenszeit nach BrdU-Injektion konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der proliferierenden Zellen festgestellt werden. Zur besseren Beurteilung wurde der Hippokampus in SGZ und die Körnerzellschicht in drei Anteile gegliedert. Es wurde zwischen den Schichten SGZ, 1. Granularzellschicht, 2. Granularzellschicht und 3. Granularzellschicht unterschieden. Auch die Analyse dieser selbsterstellten Schichten Knock-Out gegen den Wildtyp zeigte keine statische Auffälligkeit im t-test zwischen KO und WT. Die Ergebnisse (siehe Abbildung 13) sprechen dafür, dass kein Unterschied

zwischen der Proliferation und dem Überleben der Zellen in Wildtyp- und Knock-Out-Tieren existiert.

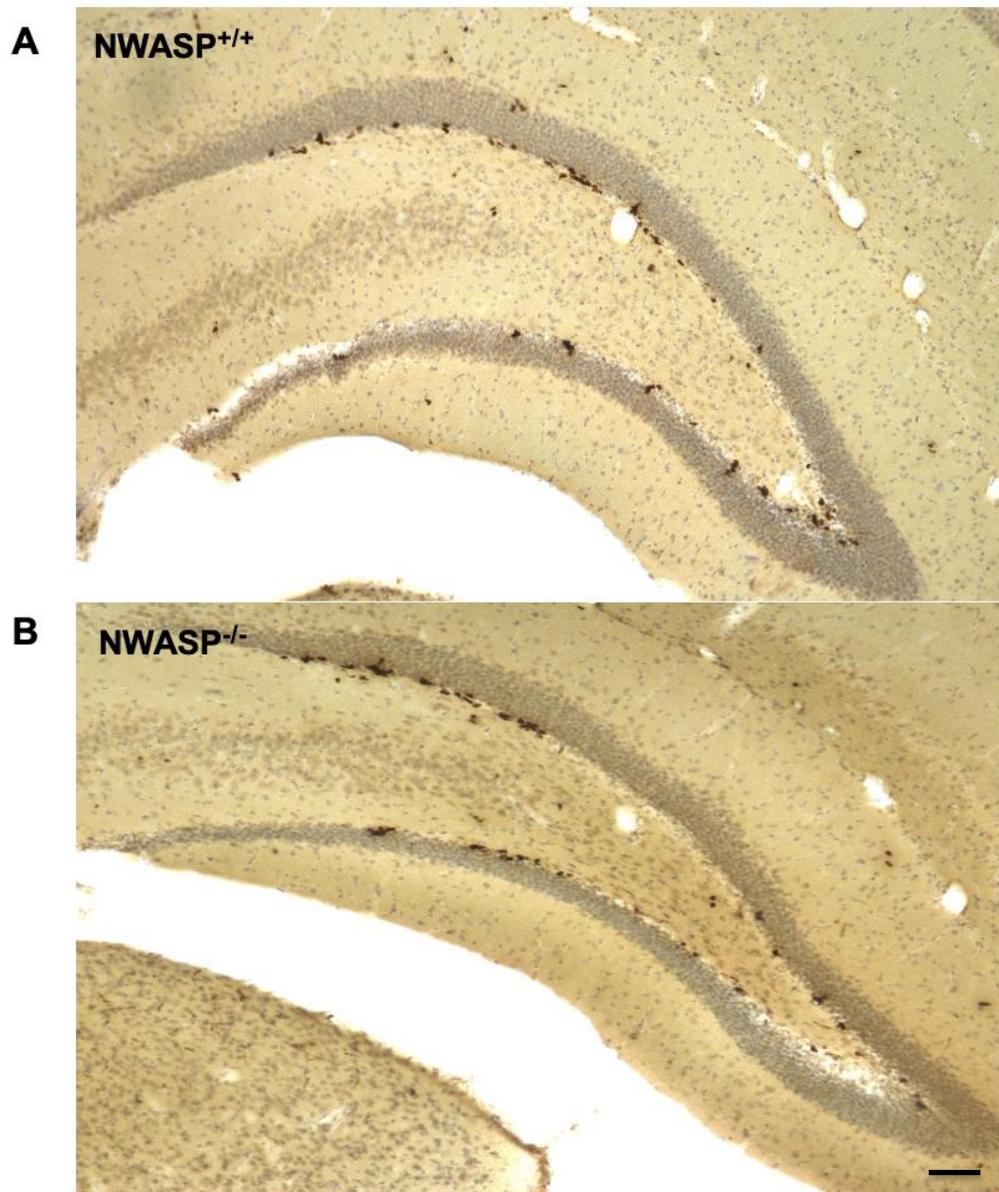


Abb. 14: Mikrofotografien der immunhistochemischen Färbungen 1d WT gegen KO.

Die Fotografien zeigen die immunhistochemische Färbung gegen den Marker BrdU. Einen Tag nach BrdU-Injektion verteilen sich die BrdU markierten Zellen auf die SGZ, sowie die Granularzellschicht der N-WASP-WT-Mäuse (A) und N-WASP-KO-Mäuse (B). Es konnte kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Anzahl der markierten Zellen beobachtet werden. Maßstabsleiste = 50 μ m

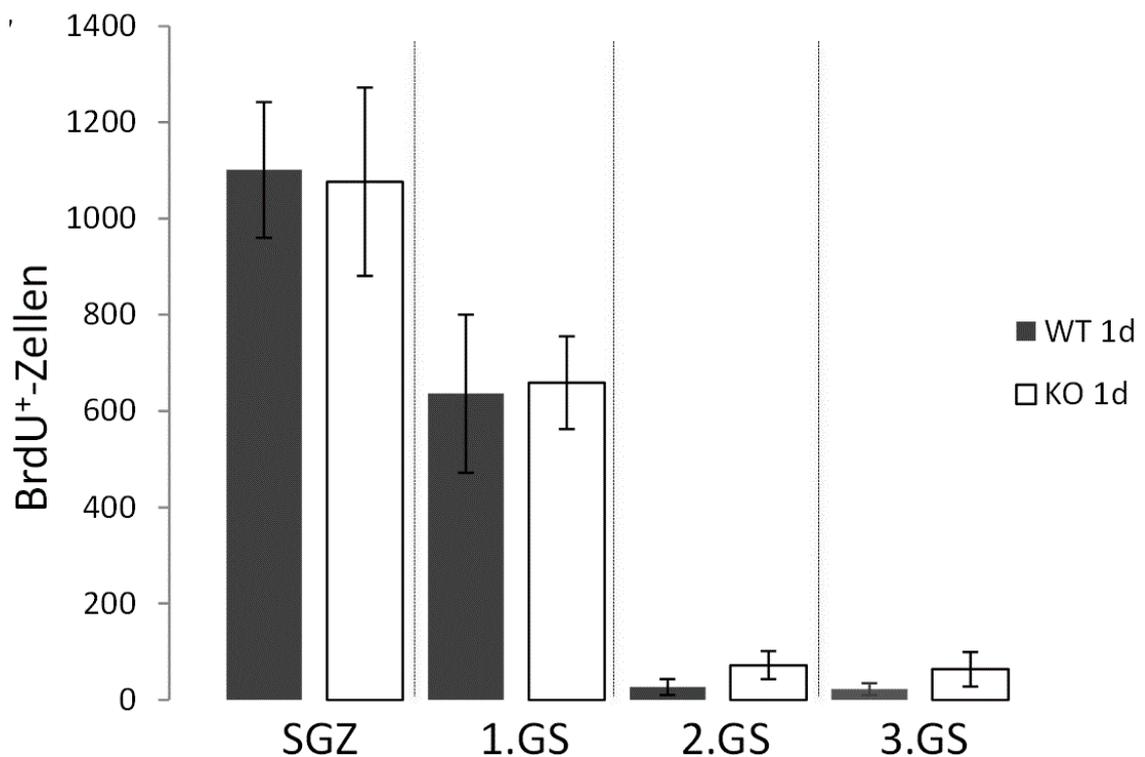
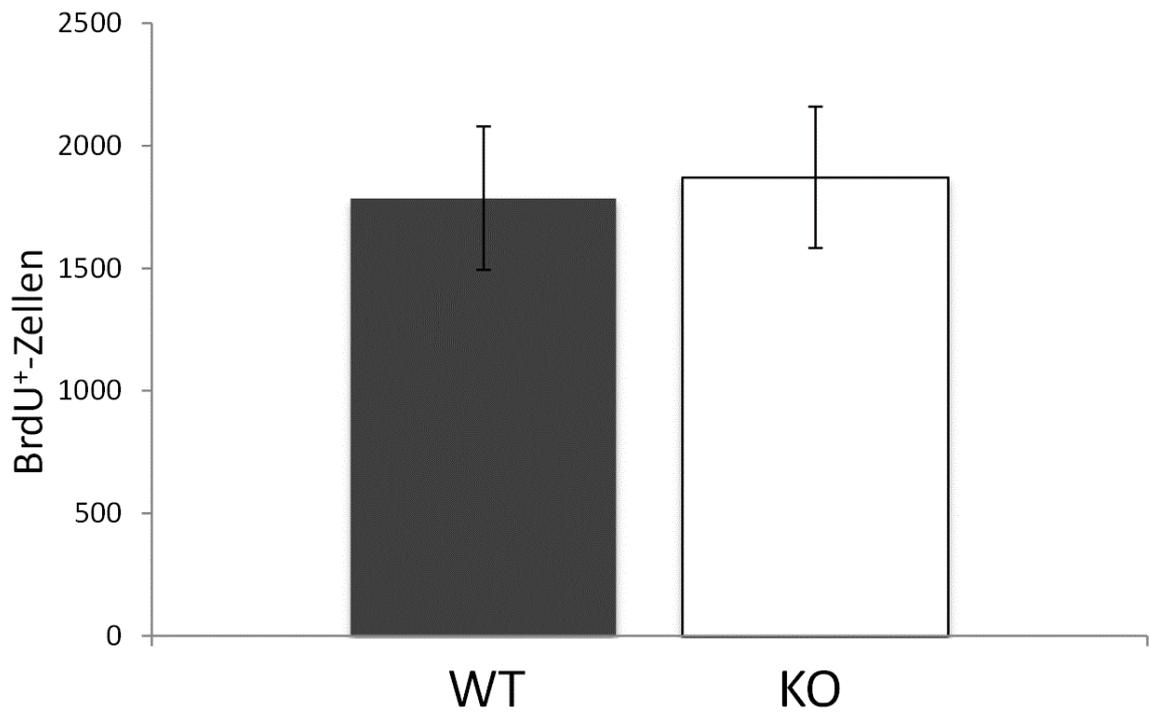


Abb. 15: Auswertung 1-Tages-Überlebenszeit (1d) KO gegen WT im DG

Die Graphen stellen die Auswertung der Mittelwerte statistisch dar. Auf der X-Achse sind die Gruppen von Knock-Out und Wildtyp dargestellt. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der BrdU-positiven Zellen eingetragen. Es werden verschiedene Schichten (SGZ, 1. Granularzellschicht (1.GS), 2. Granularzellschicht (2.GS), 3. Granularzellschicht (3.GS)) und die Mittelwerte des Knock-Outs in in weiß mit dem Wildtyp in schwarz verglichen. Die schwarzen Balken stellen Abweichungen Signifikanzniveaus nach oben und unten dar. Der Stichprobenumfang der Tiere einen Tag (1d) nach BrdU-Applikation umfasste sechs Tiere in der Wildtyp-Gruppe und fünf Tiere in der Knock-out-Gruppe

BrdU: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG

Die Analyse der BrdU-positiven Zellen im Hippokampus mit 28 Tagen Überlebenszeit nach BrdU-Applikation zeigte keine signifikante Abweichung beim Vergleich von KO und WT. Der DG wurde in drei Abschnitte gegliedert, um eventuelle Unterschiede bei Migration oder Differenzierung darzustellen (1.GS, 2.GS, 3GS). Zusätzlich wurde erneut auch die SGZ in den Vergleich miteinbezogen. Der Vergleich der Abschnitte untereinander mit Hilfe des t-test lieferte keine Hinweise auf eine statistische Korrelation. Keine der Schichten wies bei der Zählung der BrdU-positiven Zellen statistisch relevante Abweichungen zwischen KO und WT auf. Aus der abschließenden Beurteilung der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass keine Unterschiede bei Überlebenszeit der KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe vorhanden sind.

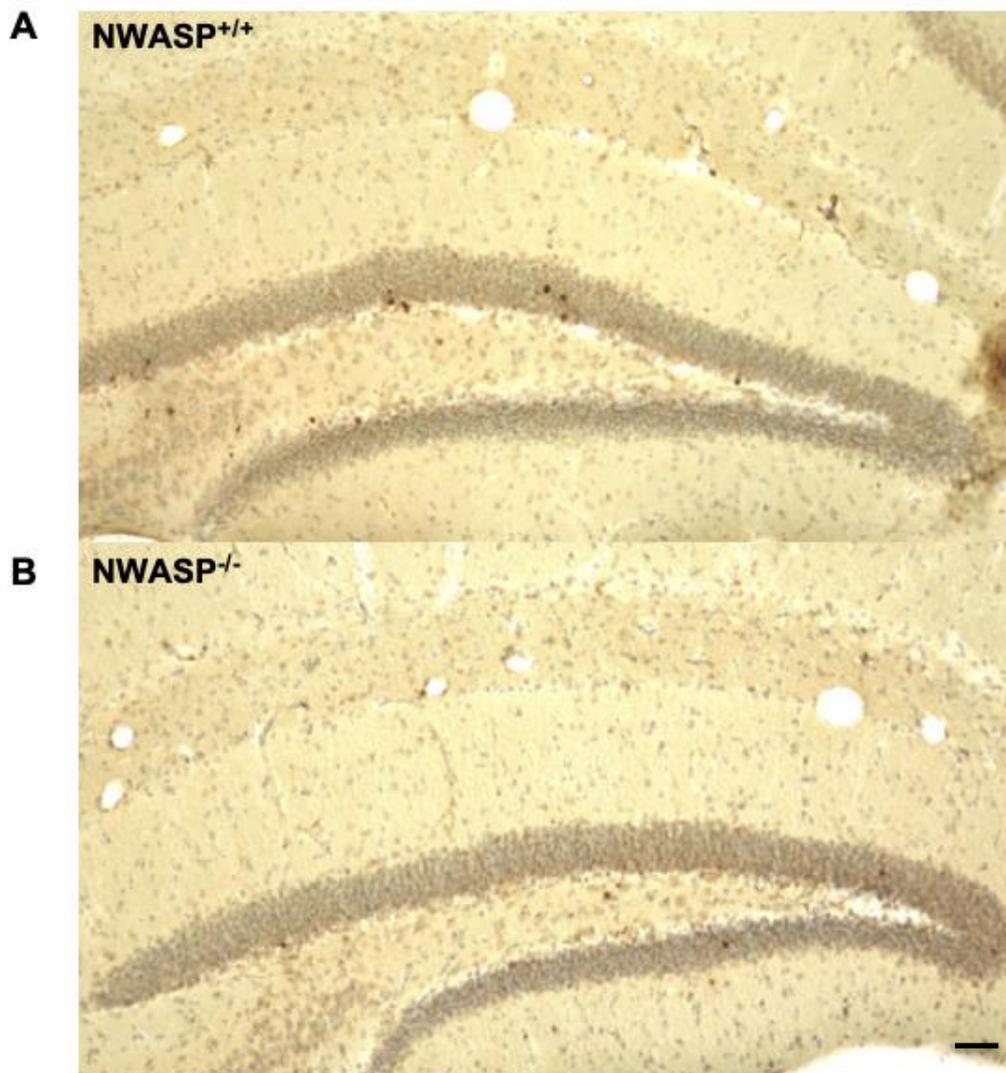


Abb. 16: Mikrofotografien der immunhistochemischen Färbungen 28d WT gegen KO.

Die Fotografien zeigen die immunhistochemische Färbung gegen den Marker BrdU. 28 Tage nach BrdU-Injektion verteilen sich die BrdU markierten Zellen auf die SGZ, sowie die Granularzellschicht der N-WASP-WT-Mäuse (A) und N-WASP-KO-Mäuse (B). Es konnte kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Anzahl der markierten Zellen beobachtet werden. Maßstabsleiste = 50 μ m

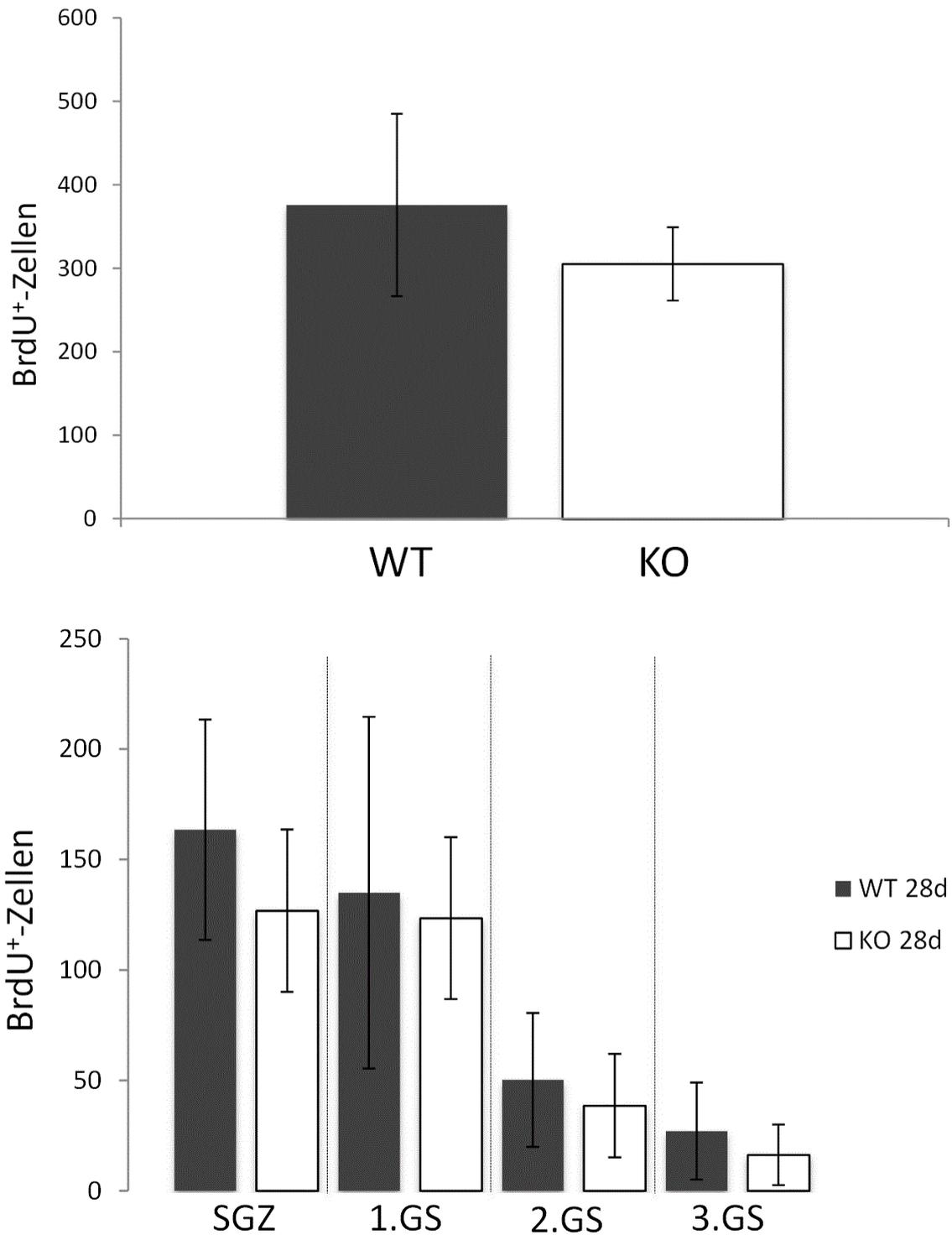


Abb. 17: Auswertung 28-Tage-Überlebenszeit (28d) KO gegen WT im DG

Die Graphen stellen die Auswertung der Mittelwerte statistisch dar. Auf der X-Achse sind die Gruppen von Knock-Out und Wildtyp eingetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der BrdU-positiven Zellen dargestellt. Es werden verschiedene Schichten (SGZ, 1. Granularzellschicht (1.GS), 2. Granularzellschicht (2.GS), 3. Granularzellschicht (3.GS)) und die Mittelwerte des Knock-Outs in weiß mit dem Wildtyp in grau verglichen. Die schwarzen Balken stellen Abweichungen eines Signifikanzniveaus nach oben und unten dar. Der Stichprobenumfang der Tiere 28 Tage (28d) nach BrdU-Applikation umfasste acht Tiere in der Wildtyp-Gruppe und sieben Tiere in der Knock-out-Gruppe

DCX: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG

Der Marker DCX ist mit den Stadien der Migration und Differenzierung assoziiert. Die Analyse der Kolo-kalisation von BrdU und DCX im DG gibt Aufschluss über den Verlauf von Migration und Differenzierung in der postmitotischen Phase. Der Vergleich erfolgte zwischen KO-Modell und WT-Modell in Hinblick auf die Anzahl der doppelt-positiven Zellen. Mit Hilfe des t-test wurde die statistische Signifikanz überprüft. Die Auswertung zeigt keine Differenzen, die über die das statische Maß des t-test hinausgehen, somit existiert kein Unterschied in den Phasen der Migration und Differenzierung bei KO und WT.

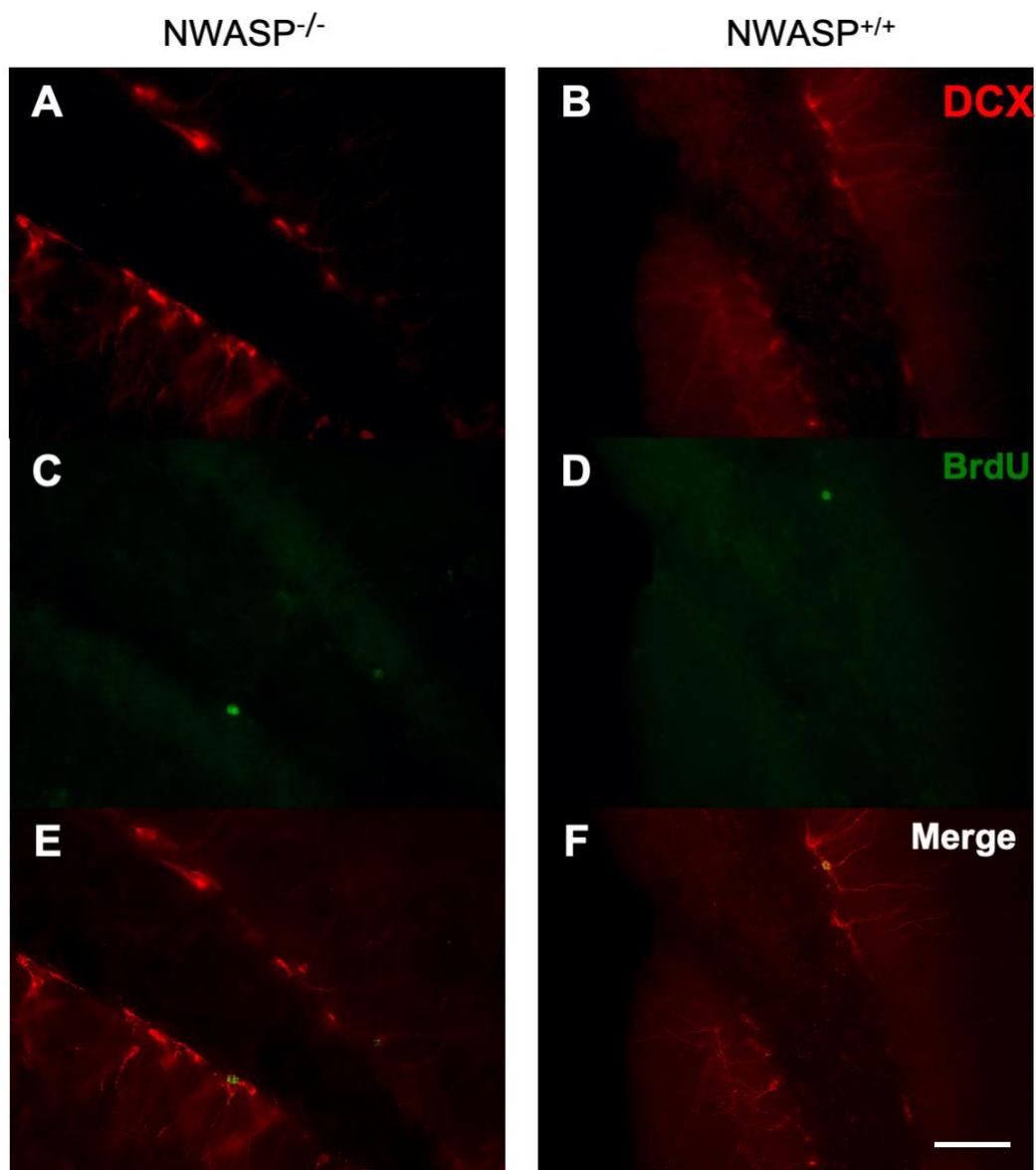


Abb. 18: Immunfluoreszenz-Mikrofotografien DCX und BrdU im DG 28d WT gegen KO.

Die Immunfluoreszenz-Fotografien zeigen die Doppelfärbung gegen den Marker DCX (rot) in N-WASP-KO (A) und N-WASP-WT (B) Mäusen sowie den Marker BrdU (grün) in N-WASP-KO (C) und N-WASP-WT (D) Mäusen. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Anzahl der doppelt-positiven DCX/BrdU- Zellen zwischen N-WASP-KO (E) und N-WASP-WT (F) Tieren beobachtet werden. Maßstabsleiste = 50 μm

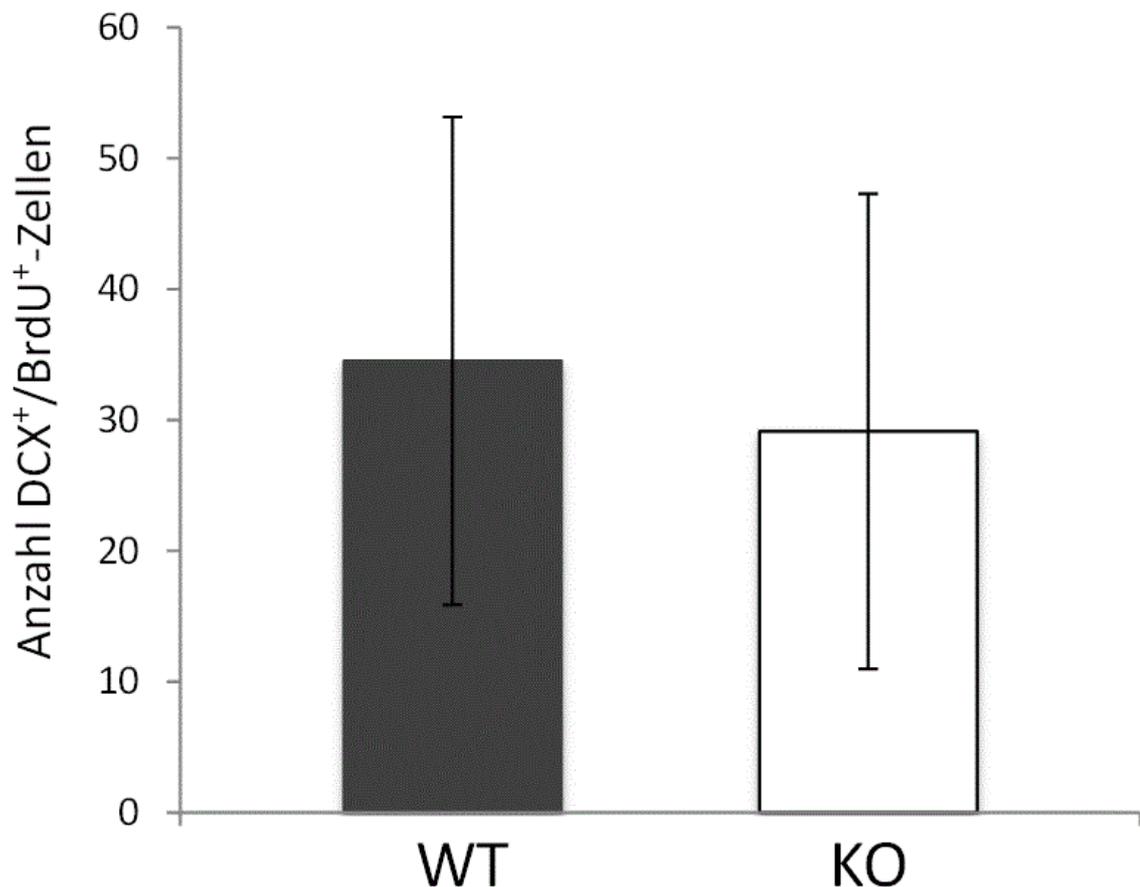


Abb. 19: Auswertung Kolokalisation BrdU und DCX

Die Graphen stellen die Auswertung der Mittelwerte statistisch dar. Auf der X-Achse sind die Mittelwerte der Gruppen von Knock-Out und Wildtyp eingetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der BrdU-positiven Zellen bzw. der doppelt-positiven Zellen dargestellt. Es wurden die Mittelwerte der BrdU-positiven und der doppelt-positiven Zellen des Knock-Outs in weiß mit dem Wildtyp in grau verglichen. Die schwarzen Balken stellen Abweichung eines Signifikanzniveaus nach oben und unten dar. Der Stichprobenumfang der Tiere 28 Tage (28d) nach BrdU-Applikation umfasste acht Tiere in der Wildtyp-Gruppe und sieben Tiere in der Knock-out-Gruppe

GFAP: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG

Wie bereits beschrieben, ist der Marker GFAP besonders im Stadium der Proliferation ausgeprägt. Die Analyse der Kolokalisation von BrdU und GFAP im DG gibt Aufschluss über den Verlauf von Proliferation, des initialen Abschnitts der Neurogenese. Es wurde das KO-Modell mit dem WT-Modell auf die Anzahl der doppelt-positiven Zellen verglichen. Die statistische Auswertung der Zellzahl unter Berücksichtigung des t-Tests

konnte keinen Hinweis auf signifikante Unterschiede beim Ablauf der Proliferation liefern.

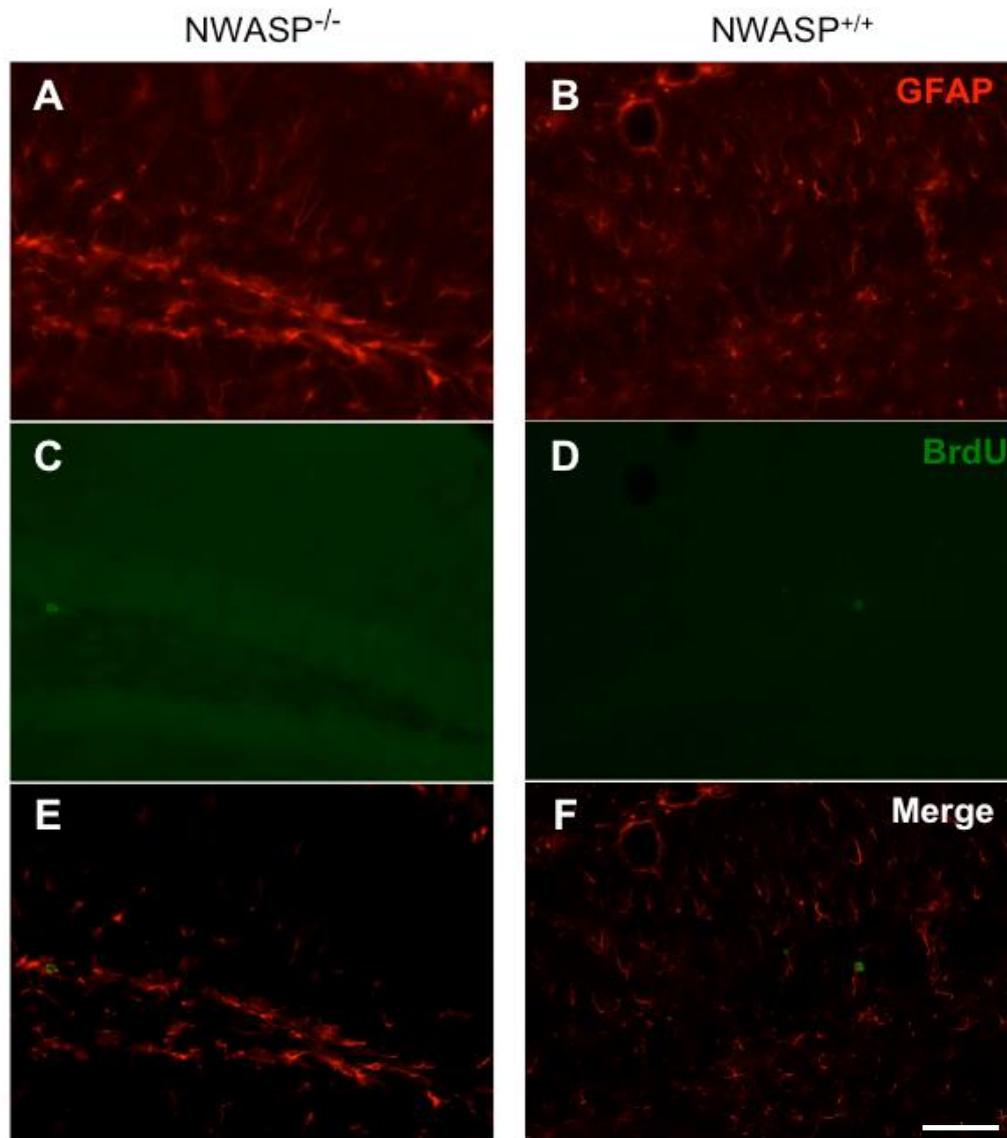


Abb. 20: Immunfluoreszenz-Mikrofotografien GFAP und BrdU im DG 28d WT gegen KO.

Die Immunfluoreszenz-Fotografien zeigen die Doppelfärbung gegen den Marker GFAP (rot) in N-WASP-KO (A) und N-WASP-WT (B) Mäusen sowie den Marker BrdU (grün) in N-WASP-KO (C) und N-WASP-WT (D) Mäusen. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Anzahl der doppelt-positiven GFAP/BrdU- Zellen zwischen N-WASP-KO (E) und N-WASP-WT (F) Tieren beobachtet werden. Maßstabsleiste = 50 μ m

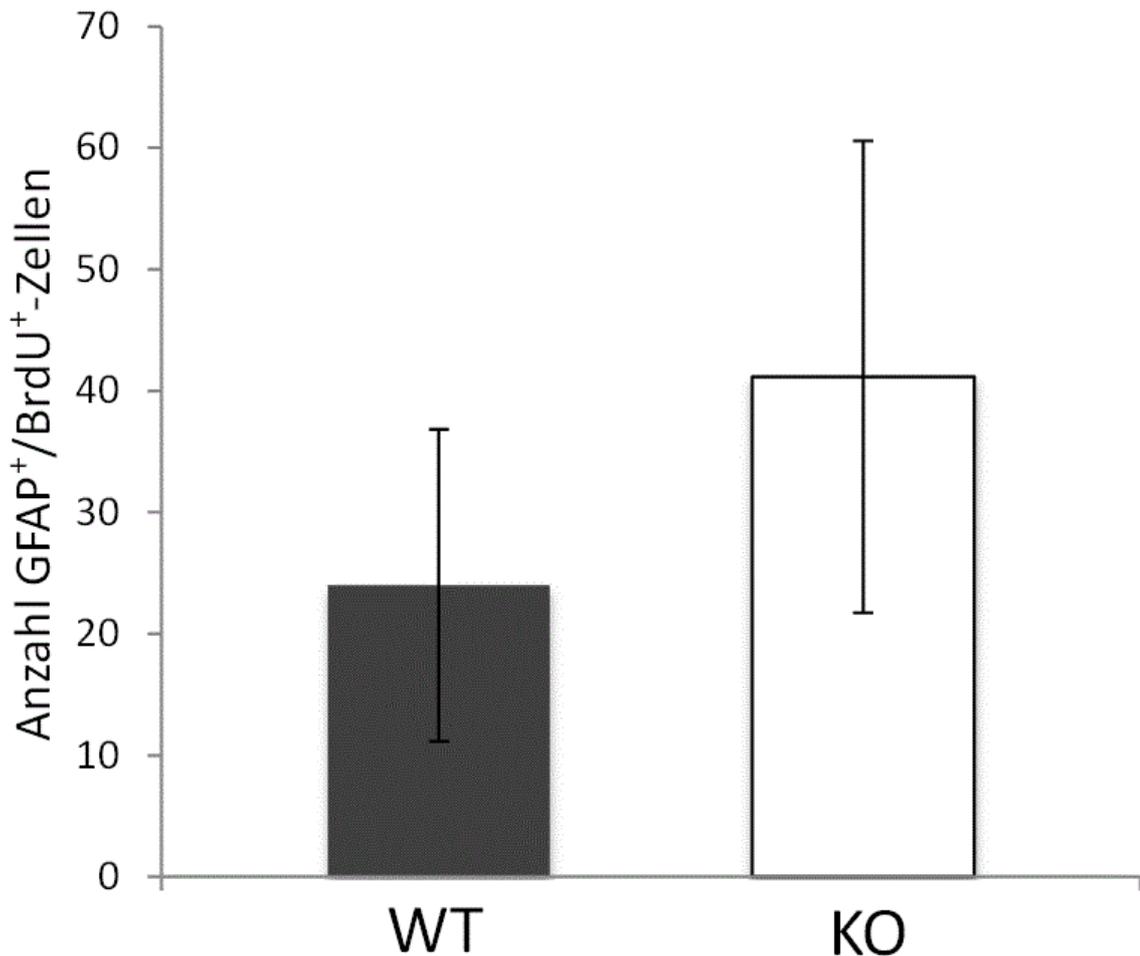


Abb. 21: Auswertung Kolokalisation BrdU und GFAP im DG

Die Graphen stellen die Auswertung der Mittelwerte statistisch dar. Auf der X-Achse sind die Mittelwerte der Gruppen von Knock-Out und Wildtyp aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der BrdU-positiven Zellen bzw. der doppelpositiven Zellen aufgetragen. Es wurden die Mittelwerte der BrdU-positiven und der doppel-positiven Zellen des Knock-Outs in weiß mit dem Wildtyp in grau verglichen. Die schwarzen Balken stellen Abweichung eines Signifikanzniveaus nach oben und unten dar. Der Stichprobenumfang der Tiere 28 Tage (28d) nach BrdU-Applikation umfasste acht Tiere in der Wildtyp-Gruppe und sieben Tiere in der Knock-out-Gruppe

NeuN: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im DG

Während der Phase der Integration hat NeuN als Marker eine besondere Relevanz. Die Analyse der Kolokalisation von BrdU und NeuN im DG erlaubt eine Aussage über den letzten Schritt der Neurogenese in der postmitotischen Phase. Die Gegenüberstellung von KO-Tieren und WT-Tieren erfolgte unter Berücksichtigung des t-Tests. Die Auswertung wurde über die Anzahl der BrdU-positiven, der doppel-positiven und des prozentualen Anteils der doppel-positiven an den BrdU-positiven Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse (siehe Abbildung 21) lassen keine Schlussfolgerung auf einen Unterschied beim Ablauf der Neurogenese in der Phase der Integration zu.

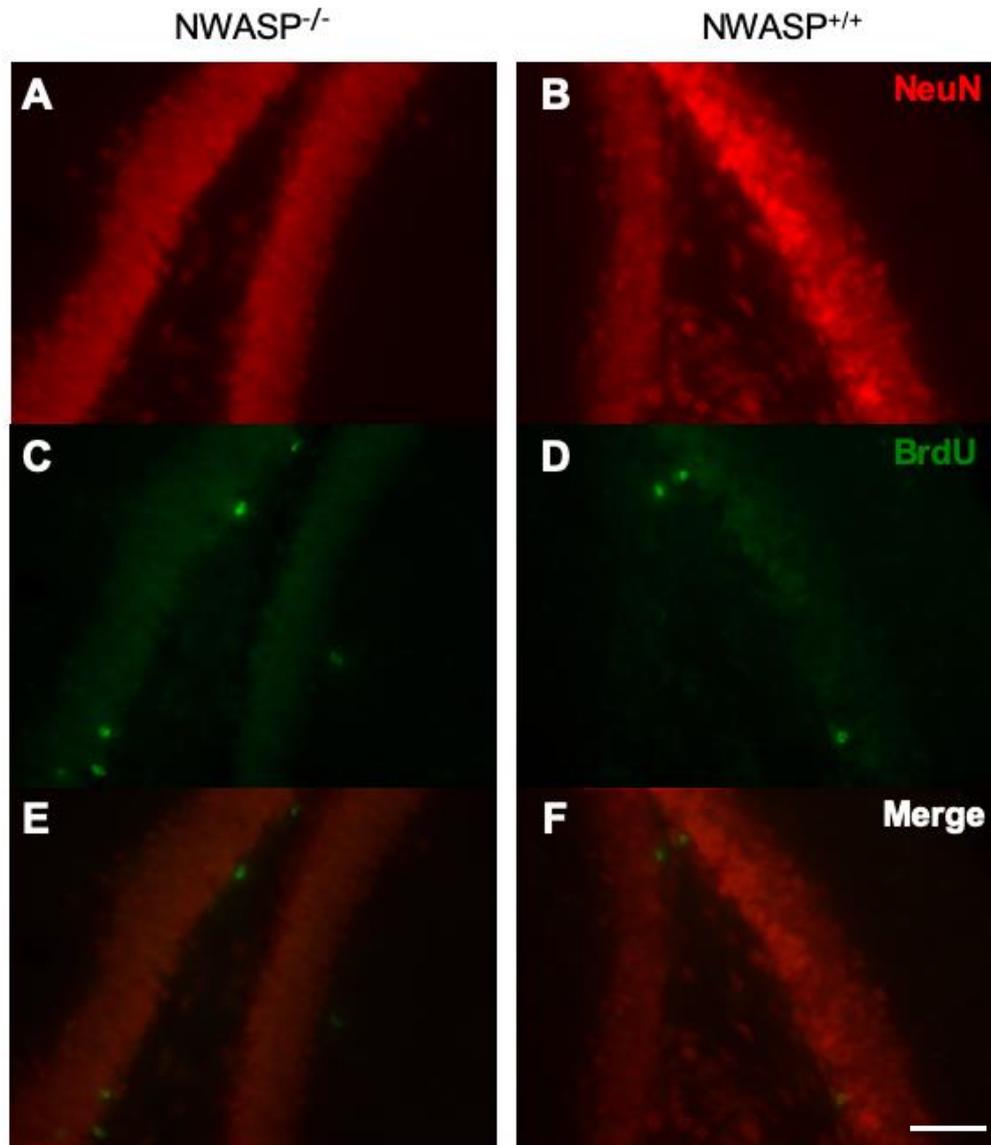


Abb. 22: Immunfluoreszenz-Mikrofotografien NeuN und BrdU im DG 28d WT gegen KO.

Die Immunfluoreszenz-Fotografien zeigen die Doppelfärbung gegen den Marker NeuN (rot) in N-WASP-KO (A) und N-WASP-WT (B) Mäusen sowie den Marker BrdU (grün) in N-WASP-KO (C) und N-WASP-WT (D) Mäusen. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Anzahl der doppelt-positiven NeuN/BrdU- Zellen zwischen N-WASP-KO (E) und N-WASP-WT (F) Tieren beobachtet werden. Maßstabsleiste = 50 μ m

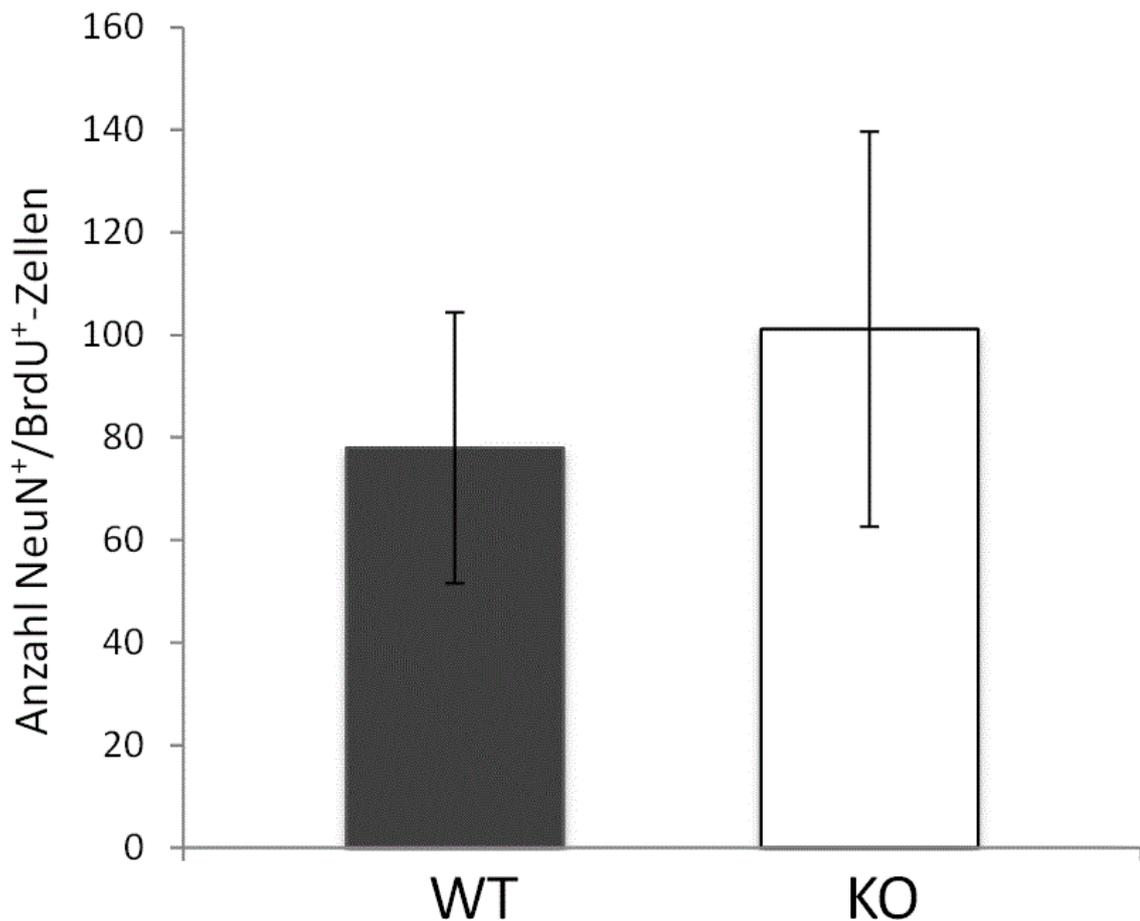


Abb. 23: Auswertung Kolo-kalisation BrdU und NeuN im DG

Die Graphen stellen die Auswertung der Mittelwerte statistisch dar. Auf der X-Achse sind die Mittelwerte der Gruppen von Knock-Out und Wildtyp aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der BrdU-positiven Zellen bzw. der doppelt-positiven Zellen aufgetragen. Es wurden die Mittelwerte der BrdU-positiven und der doppelt-positiven Zellen des Knock-Outs in weiß mit dem Wildtyp in grau verglichen. Die schwarzen Balken stellen Abweichung eines Signifikanzniveaus nach oben und unten dar. Der Stichprobenumfang der Tiere 28 Tage (28d) nach BrdU-Applikation umfasste acht Tiere in der Wildtyp-Gruppe und sieben Tiere in der Knock-out-Gruppe.

BrdU: 28d Überlebenszeit Vergleich Knock-Out gegen Wildtyp im OB

Die Analyse der BrdU-positiven Zellen im OB mit 28 Tagen Überlebenszeit nach BrdU-Applikation zeigte keine signifikante Abweichung beim Vergleich von KO und WT. Der Vergleich der Abschnitte untereinander mit Hilfe des t-test lieferte keine Hinweise auf eine statistische Korrelation. Keine der Schichten wies bei der Zählung der BrdU-positiven Zellen statistisch relevante Abweichungen zwischen KO und WT auf. Aus der abschließenden Beurteilung der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass bezogen auf die Überlebenszeit keine Unterschiede zwischen der KO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe vorhanden sind.

Diskussion

Tiermodell

Der verwendete spezifische, konditionale CaMkII-Cre-N-WASP-KO ist hoch selektiv und ausschließlich in adulten postmitotischen, glutaminergen Neuronen wirksam. Der KO ist auf Proteinebene mit Hilfe eines Western-Blot abgesichert worden. In diesem Tiermodell konnte mit dem gewählten KO kein signifikanter Effekt auf die adulte Neurogenese nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie schließen die hochwahrscheinliche Bedeutung von N-WASP auf die Adulte Neurogenese nicht aus. So sind die Vertreter der WASP-Familie nachweislich am Ablauf der adulten Neurogenese beteiligt. Über das Aktinskelett vermitteln diese Proteine speziell die Fortbewegung und synaptische Plastizität. Weitergehend ist ihre tragende Rolle in allen Phasen der Nervenzellentwicklung nachgewiesen. Zur weiteren umfassenden und definitiven Abklärung einer grundsätzlichen Rolle von N-WASP in der adulten Neurogenese sind Untersuchungen in zusätzlichen Tiermodellen mit spezifischem N-WASP-KO unter Kontrolle alternativer Gen-Promotoren notwendig. Von besonderem Interesse wären u.a. glia-spezifische N-WASP-KO, oder auch Nestin-Cre- und Schwanzzell-spezifische N-WASP-KO-Modelle. Vergleichsarbeiten mit einem Nestin-Cre-N-WASP-KO konnten in den Versuchstieren eine Deregulierung des Aktinskeletts beobachten, welche über eine eingeschränkte Zellmotilität zu der Ausbildung eines Hydrocephalus führten [158]. In Tiermodellen mit einem Schwanzzell-N-WASP-KO wurden funktionelle und strukturelle Defizite in der Myelinisierung von peripheren Nervenzellen festgestellt [159]. Im Rahmen von Knock-out-Modellen mit TrkB, einem anderen *downstream-effektors* des Aktinskeletts, konnte eine eingeschränkte Proliferation und Neurogenese der NPC beobachtet werden [160]. In diesem Zusammenhang wäre auch ein Gliazell-spezifischer N-WASP-KO von großem Interesse, da z.B. Astrozyten an der Entwicklung von Synapsen und der synaptischen Plastizität beteiligt ist.

CaMkII

CaMkII ist ein Schlüsselement im Rahmen der Ausbildung der synaptischen Plastizität. In KO-Versuchen mit Mäusen konnte eine herabgesetzte LTP und eine negative

Beeinflussung der neuronalen Plastizität und des Gedächtnisses nachgewiesen werden [161, 162]. CaMkII kommt in den Isoformen α , β , γ und δ vor. Während in der Entwicklung nur die γ und δ Isoformen exprimiert werden, sind im adulten Organismus vor allem die α und β Formen relevant [163]. Die Distribution von CaMkII wurde in Versuchen mit Hilfe von CaMkII-GFP-Mäusen eindrucksvoll dargestellt. Insbesondere die Granularzellen und die Pyramidenzellen der Hippokampusformation wiesen ausgeprägte GFP-Reaktionen auf. Bei Mutationen in CaMkII α oder CaMkII β , wurden schwerwiegende kognitive Veränderungen, sowohl beim Menschen als auch in Mäusen nachgewiesen. Beim Menschen wurden eingeschränkte Intelligenz und schwerwiegende Störungen der synaptischen Plastizität beobachtet. Bei Mäusen wurden zudem Lerndefizite nachgewiesen. [164] [165] [166]. Bei einer selektiven Eliminierung von CaMkII α aus neugebildeten Granularzellen des DG wurde ein Anstieg der dendritischen Verzweigungen festgestellt, welcher jedoch zeitgleich mit einer Verminderung von reifen Synapsen und des Langzeitüberlebens einherging [167]. Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Rolle von CaMkII α bei der Stabilisierung von heranwachsenden Synapsen und Dendriten [168]. Dem gegenüber erwies sich ein Doppel-KO von CaMkII α und CaMkII β sowohl in embryonalen als auch in adulten Mäusen als letal. Obwohl die LTP vollständig aufgehoben wurde, konnten keine gravierenden morphologischen Veränderungen in den Doppelmutanten registriert werden [164]. In einem mit dieser Arbeit vergleichbaren CaMkII α -hKO-Modell in NSCs konnte im Vergleich zum WT eine erhöhte Menge an unreifen Neuronen während der adulten Neurogenese beobachtet werden. Darüber hinaus waren die Neurone nicht in der Lage die Phänotypen, reifer Neurone in Bezug auf Morphologie und Rezeptorexpression anzunehmen [169]. Zusammengefasst weisen diese Veröffentlichungen die entscheidende Bedeutung von CaMkII bei der Integration und synaptischen Verschaltung von Nervenzellen während der Neurogenese auf. Zudem scheint sich CaMkII erst auf die finale Phase der Neurogenese auszuwirken. Somit ist anzunehmen, dass bei einem CaMkII-N-WASP-KO erst in der Phase der Integration, bzw. in der darauffolgenden synaptischen Verschaltung und LTP signifikante Unterschiede zu erwarten sind. Wie zuvor beschrieben, können morphologische Veränderungen auftreten, sie sind jedoch nicht obligat. In jedem Fall wären ergänzende und weiterführende morphologische Untersuchung der Dendriten und elektrophysiologische Untersuchung der LTP mit einem CaMkII-N-WASP-KO von großem Interesse.

Zusammenhang von N-WASP und der Proliferation

Die Ergebnisse aus der Auswertung der Proliferation bei den Tieren mit einem Tag Überlebenszeit zeigen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen KO und WT existiert. Die Analyse der 28-Tage-Überlebenszeit beweist, dass auch das Langzeitüberleben der Zellen nach der Proliferation nicht signifikant voneinander abweicht. Zusätzliche Kolokalisationen mit dem Marker GFAP lieferten keine divergierenden Ergebnisse. Aktinfilamente knüpfen bei der Mitose an das Zentromer der Chromosomen an [170]. Der Spindelapparat besteht jedoch aus Mikrotubuli. Die Möglichkeit, dass die Mitose auch ohne die Hilfe des Aktinskeletts stattfinden könnte, scheint denkbar. Betrachtet man jedoch den aktuellen Forschungsstand sollte die These verworfen werden. Aus dem Paper von Melendez lässt sich ableiten, dass das Aktinskelett über eine RhoA-GTPase-KO-Modell blockiert wird. In der Mitose fielen im Vergleich zum WT deutlich niedrigere Mitoseraten auf [171]. Zusätzlich unterstützen die Aktinstrukturen die Verteilung des Chromatins [172]. Das Paper von Chen zeigt deutlich, dass Zellen bei veränderter bzw. veränderter Aktinstruktur in die Apoptose eintreten [170]. Die durchgeführten Auswertungen lassen darauf schließen, dass CaMkII-N-WASP-KO keinen unverzichtbaren Einfluss auf die Aktivierung des Aktinskeletts in der Proliferation hat. Da N-WASP vor allem über den Arp2/3-Komplex die Aktinsynthese steuert und sich der Einfluss des Arp2/3-Komplex besonders auf die Verzweigung von Aktinfilamenten im Bereich von Zellausläufern fokussiert, scheint das Ergebnis der Arbeit in diesem Zusammenhang zunächst nicht nachvollziehbar. Zusätzlich liegen Bilanzen vor, die zeigen, dass N-WASP bei der Akkumulierung von Kinetochoren beteiligt ist. Bei einer Deletion von N-WASP zeigten sich Störungen des Zellzyklus mit verminderten Proliferationsraten [173]. Allerdings existieren ebenfalls Hinweise, die zeigen, dass die Zytokinese, der abschließende aktinvermittelte Schritt der Mitose, nicht maßgeblich vom N-WASP-Arp2/3-Signalweg abhängig ist [174]. Sowohl der Aktinnukleationsfaktor Formin als auch der WSP1-Arp2/3-Signalweg sind bei der Reifung und *cleavage furrow* – wichtigen Stationen des Zellzyklus – beteiligt [175, 176]. Zusammenfassend muss erwähnt werden, dass es in der aktuellen Forschung nur wenige Veröffentlichungen zum Zusammenhang zwischen N-WASP und der Proliferation existieren. Diese Veröffentlichungen liefern teils widersprüchliche Hinweise auf die Beteiligung von N-WASP in der Proliferation. Hinsichtlich der Ergebnisse dieser Arbeit kann die Annahme vertreten werden, dass die dynamischen Aktinprozesse entweder über andere Mitglieder der WASP-Familie vermittelt werden.

Als weitere Möglichkeit könnte der Arp2/3-Komplex neben Formin und *tandem-monomer-binding nucleators* eine untergeordnete Rolle in der Proliferation einnehmen. Darüber hinaus könnte der gewählte Genpromotor CaMkII zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Wirkung kommen, sodass N-WASP in dieser Phase der Neurogenese noch vorhanden ist.

Migration

Die Migration der Zellen wurde mit Hilfe des Markers GFAP untersucht. In der Auswertung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen KO und WT. Das Krankheitsbild WAS ist von ausgeprägten Migrationsstörungen und chemotaktischen Dysregulation der betroffenen Zellen geprägt. Zudem steht die Überexpression von N-WASP im Verdacht, bei einigen Tumorentitäten Progression und Metastasierung zu fördern [149, 177]. Außerdem reguliert N-WASP die kortikale Nervenzellmigration bei der Entwicklung des Proencephalons [178]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre besonders in der Phase der adulten Neurogenese ein Unterschied zu erwarten gewesen. Bei der Migration von Neuronen ist Aktin als Baustein für den dynamischen Auf- und Abbau von Zellausläufern unerlässlich. Die Zellmigration ist von chemotaktischen Signalen abhängig und beruht auf der amöboiden Zellfortbewegung: hier spielen dynamische Aktinskelette eine entscheidende Rolle. Der schnelle Auf- und Abbau von Aktin, sowie die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien, erlaubt eine Zellbewegung zum Bestimmungsort. Die Dynamik des Aktinskeletts ist außerordentlich komplex reguliert. Aktinstrukturen werden nicht nur linear gebildet, vielmehr steuert eine Vielzahl von Mechanismen Form, Funktion und Verzweigung. Interessanterweise zeigen Versuche, dass beim Wegfall bekannter Regulationsfaktoren nicht unbedingt die gesamte Migration der Zellen gestört sein muss [179, 180]. Vielmehr muss zwischen der Ausbildung der Axone und ihrer Verzweigung unterschieden werden [181]. Darüber hinaus ist die Rolle von Aktinnukleationsfaktoren komplexer als bisher angenommen. So kann der Arp2/3-Komplex die Ausbildung terminaler Verzweigung nicht nur fördern, sondern darüber hinaus auch hemmen [182]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das genaue Zusammenspiel der Faktoren untereinander noch nicht abschließend geklärt und die genaue Rolle der Faktoren schwierig vorauszusehen ist. Es scheint jedoch gesichert, dass N-WASP an der Ausbildung der Axone beteiligt ist. Bei Versuchen mit N-WASP-Knock-Out-Modellen ist die atypische Ausbildung von Axonen beschrieben

worden [183, 184]. Darüber hinaus beteiligt sich N-WASP an der Myelinisierung der Axone im peripheren und zentralen Nervensystem [185, 186]. Eine aktuelle Veröffentlichung stellt die These auf, dass N-WASP besonders bei dreidimensionalen Zellausläufern, wie zum Beispiel der synaptischen Verschaltung große Relevanz besitzt, während zweidimensionale Strukturen von alternativen Nukleationsfaktoren vorangetrieben werden [7]. WAVE und WRP scheinen zumindest für migrierende Neurone der SVZ in größerem Maße an der Migration beteiligt zu sein als N-WASP. So zeigen aktuelle Publikationen, dass WAVE bei Tumorzellen hochreguliert ist und unter Umständen mit der erhöhten Invasivität und der Bildung von Metastasen in Zusammenhang stehen könnte [187, 188]. WAVE und das engassoziierte WRP sind besonders an der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt. Die Bildung von Lamellipodien ist besonders wichtig für die Entstehung des *leading process*, der die Zellbewegung initiiert [189]. Die Ausbildung von Filopodien und Podosomen hingegen ist nach neueren Erkenntnissen von N-WASP abhängig. Jedoch zeigten Versuche mit Fibroblasten, dass die Ausbildung von Filopodien paradoxerweise auch bei einer N-WASP Defizienz möglich ist [190]. Die Bildung von Filopodien kann auch in Abwesenheit von WAVE stattfinden und wird darüber hinaus sogar von WAVE gehemmt [191, 192]. Bei einer Defizienz von WRP wurden Migrationsfehler von Zellen beschrieben [193]. Ebenfalls mit in abschließende Überlegungen einzubeziehen ist die mutmaßliche Eigenschaft des WASP-interacting SH3 Protein (WISH) den Arp2/3-Komplex unabhängig von N-WASP zu aktivieren [194]. Zusätzlich werden für WAVE und N-WASP im Aufbau jeweiliger Strukturen antagonistische Rollen vermutet: So wurde bei einer Deletion von WAVE der N-WASP-Arp2/3-Komplex signifikant hochreguliert [7]. Ganz andere Fragen wirft hingegen die Möglichkeit auf, dass die Wanderungen von Zellen auch entgegen der gängigen Lehrmeinung unabhängig von Filopodien stattfinden könnten [177, 179, 195]. Stattdessen muss davon ausgegangen werden, dass extrazelluläre Einflüsse eine tragende Rolle spielen. Denkbar ist überdies, dass ähnlich wie bei der Proliferation postuliert, der N-WASP-Arp2/3-Komplex bzw. sogar der WASP-family-Arp2/3-Signalweg zugunsten von anderen Nukleationsfaktoren nur eine untergeordnete Stellung einnimmt. Ebenso wäre es möglich, dass die Migration von bereits bestehenden Zellen vermittelt wird, welche nicht vom CaMkII-Cre-Knock-Out erfasst wurden. So bewegen sich die Zellen des OB bekanntermaßen entlang von Blutgefäßen, Astrozyten und Gliazellen [67]. Tatsächlich ist die Migrationsstrecke für Zellen des Immunsystems und der SVZ deutlich komplexer und länger als die der adulten

Neurogenese im Hippokampus, sodass hier eventuell auch eine suboptimal funktionierendes Aktinskelett der Rolle gerecht werden könnte. Des Weiteren könnte auch in dieser Phase der gewählte Genpromotor CaMkII noch nicht zur Ausprägung gekommen sein, sodass die Neurone während der Migration keine N-WASP-Defizienz aufwiesen.

Differenzierung

Bei der Differenzierung entstehen aus pluripotenten Stammzellen hochspezialisierte Zellen. Über Genexpression werden die Prägungen der Zellen bestimmt: Neben der Größe, der Form, dem Membranpotenzial und der metabolischen Aktivität werden auch die zellulären Ausläufer einer Zelle reguliert. Diese Mechanismen sind zweifelsfrei von Aktin abhängig. Aus der Stammzelle können sich Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone entwickeln. Für die Differenzierung von Neuronen ist insbesondere die Entwicklung von Neuriten, Dendriten und Spines essentiell. Diese sind bedeutsam für die synaptischen Kontakte der Zellen. Synapsen vermitteln über Transmitter die Differenzierung neugebildeter Neurone. Entscheidend sind in dieser Phase die Auswirkung der Neurotransmitter GABA und Glutamat [54, 55]. Über Langzeitpotenzierung und Langzeitdepression wird die synaptische Plastizität moduliert: Die Langzeitpotenzierung fördert Aktinpolymerisation, steigert das Volumen und verstärkt die Synapse. Die Langzeitdepression hingegen wirkt sich hemmend auf Synapsengröße und Aktinpolymerisation aus [196]. Neuriten sind Zellfortsätze des Neurons, sie können sich entweder zu einem Neuron oder zu einem Axon entwickeln. Die Entstehung von Neuriten hängt von der Ausbildung des Aktinskeletts ab [197]. Somit wird die Interaktion zwischen N-WASP und Kofaktoren für reguläre Ausbildung von Neuriten im Hippokampus benötigt: Eine Inhibition von N-WASP resultiert in einer verminderten Neuritenausbildung [198]. Umgekehrt führt eine Überexpression von N-WASP zu einer erhöhten Anzahl und Verzweigung der Neuriten [183]. Zusätzlich sind auch WAVE und andere weniger bekannte Mitglieder der WASP-Familie wie JMY an der Modulation von Neuriten wesentlich beteiligt [199, 200]. Dendriten und ihre Spines sind kleine aus Aktin bestehende Strukturen des Zellskeletts. Ihre Beweglichkeit ist bedingt durch ständige Neuorganisation, im Rahmen der Polymerisation und des *remodelings*. Sie kommunizieren als postsynaptische Struktur direkt mit Neurotransmittern und errichten somit neuronale Schaltkreise und sind unerlässlich für

die Aufrechterhaltung von normalen Gehirnfunktionen [188]. Eine verringerte Dichte wirkt sich in verschlechterter Gedächtnisleistung sowie vielfältigen neurologischen und psychischen Störung aus. Eine erhöhte Anzahl hingegen kann Epilepsien auslösen [201]. Dendriten und Spines formen sich auf der Grundlage von Filopodien und haben somit einen direkten Bezug zum N-WASP-Arp2/3-Signalweg. Die Hemmung von N-WASP resultiert in einer deutlich verringerten Anzahl von Spines [202]. Diese werden in veränderter Form, Dichte und Größe dennoch gebildet [203]. Die Entstehung ist nicht alleine von N-WASP abhängig auch andere Signalwege der WASP-Familie haben eine hohe Relevanz, wie z.B. WAVE1-2, WIP und WRP [200, 204-206]. Zudem beteiligen sich auch Nukleationsfaktoren außerhalb der WASP-Familie, wie z.B. Formin1 an Synapto- und Dendritogenese [207]. Als weiterer interessanter Aspekt ist Cortactin, ebenfalls ein Aktivator des Arp2/3-Komplex näher zu betrachten. Dieser nimmt im Normalfall eine gegenüber N-WASP untergeordnete Rolle ein und wird deshalb auch als schwacher NPF bezeichnet. Er aktiviert den Arp2/3-Komplex synergistisch zu N-WASP, jedoch wird die Akkumulation von Cortactin mit Aktinmonomeren von N-WASP gehemmt. Somit könnte Cortactin unter Umständen wichtige Funktionen bei einem Ausfall übernehmen [9]. Zusammenfassend wirkt sich N-WASP besonders über die Bildung von Neuriten, Dendriten und Spines auf die Differenzierung neuronaler Zellen aus. Zudem ist herausgearbeitet worden, dass N-WASP zwar ein wichtiger, jedoch nicht der einzige Faktor der Regulation ist. Anschließend muss kritisch hinterfragt werden, inwieweit mit dem gewählten Versuchsmodell eine Veränderung der synaptischen Plastizität abgebildet werden kann. Es könnte argumentiert werden, dass eine unzureichende synaptische Plastizität zu einer Abnahme des Langzeitüberlebens der Zellen führt, die Datenlage ist hier jedoch alles andere als eindeutig. So existieren Hinweise, dass die frühe, durch Apoptose gesteuerte, Überlebensphase der Neurone bereits einsetzt, bevor sie Kontakte mit ihrer Zielregion ausbilden [208]. Ein Großteil der proliferierenden Zellen geht in den ersten zwei Wochen in die Apoptose. Hingegen werden Zellen, die diese Phase überstanden haben in der Regel dauerhaft ins neuronale Netzwerk integriert [52]. Die erste kritische Phase findet in der Proliferation und damit mutmaßlich unabhängig von N-WASP statt. Die zweite kritische Phase vollzieht sich mit dem Eintreten der Synapsen in ihre Funktionsfähigkeit. Es muss folglich diskutiert werden, inwieweit sich die Effekte eines N-WASP-KO auf Synapto- und Dendritogenese im Bezug zum Langzeitüberleben auswirken. Somit ist die Veränderung der Zellen durch einen KO von N-WASP aufgrund der Komplexität der Vorgänge schwer zu beurteilen.

In dem erhobenen Datensatz zeigte der Vergleich zwischen WT und KO im gemessenen Untersuchungszeitraum keine signifikanten Unterschiede beim Überleben der Zellen. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerungen zu, dass sich ein N-WASP-Knock-Out über eine vermutete Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität nicht mit dem Langzeitüberleben der Zellen korrelieren lässt. Darüber hinaus kann unter N-WASP-KO keine qualitative Aussage über die Funktion oder Dysfunktion der neugebildeten Neurone im Hippokampus getroffen werden. Eine weitere mögliche Auswirkung zwischen WT und KO hätte eine Verschiebung im Verhältnis zwischen den verschiedenen Zelllinien darstellen können. Jedoch bleibt der prozentuelle Anteil der Zellen, die nach 28 Tagen – also nach Abschluss ihrer Maturation – NeuN exprimieren, zwischen WT und KO konstant. NeuN ist der Marker reifer Neurone. Folglich liegen keine Abweichungen in der Ausprägung der Zelllinien vor. Ergänzende elektrophysiologische und dendritenmorphologische Untersuchungen von Neuronen, sowie Verhaltenstests der Tiere in CaMKII-N-WASP-KO-Modellen könnten entscheiden Erkenntnisse zu subtilen Veränderungen offenbaren.

Integration und synaptische Verschaltung

In der Phase der Integration fügen sich die neugebildeten Neurone in das bestehende Netzwerk der Zellen ein [209]. Netzwerke sind dynamische Systeme, die ständiger struktureller und funktioneller Reorganisation unterliegen. Trotz dieser Reorganisation behält das Netzwerk unter physiologischen Bedingungen seine Grundfunktion bei und verstärkt mit neugebildeten Neuronen die eigene Aktivität. Diese regelt reziprok die Entstehung, die Entwicklung und die Integration neuer Zellen [210]. Die Zellen sind am Ende ihrer Entwicklung in Form, Funktion und ihren elektrophysiologischen Eigenschaften nicht mehr von den Zellen des Netzwerks zu unterscheiden. Synaptische Verbindungen sorgen für eine Stimulation, die essentiell für das Langzeitüberleben der Zellen ist. Im Hippokampus sind die Prozesse der Langzeitpotenzierung und der Langzeitdepression äußerst relevant [196]. Insbesondere die Ausschüttung von GABA treibt die Reifung und Integration der Zellen voran [52]. Die Modulation der Synapsen im Rahmen der synaptischen Plastizität unterliegt ähnlichen Prinzipien wie ihre Entstehung: Diese kann zuerst rein funktionell über eine Förderung oder Hemmung der Effizienz stattfinden. Darüber hinaus ist auch eine Vergrößerung bzw. Neubildung oder Verkleinerung – bis zum kompletten Abbau – der Synapse möglich [211]. In neuronalen

Netzwerken erfolgt in dieser Weise ständige Informationsmodulation. Der Auf- und Abbau wird über Aktinnetzwerke vollzogen. Die Regulierung wird von Vertretern der WASP-Familie und anderen potenten Aktin-Nukleationsfaktoren, wie z.B. N-WASP, WAVE1-2, WIP, ENA/VASP und Formin bestimmt [207, 212-214]. Zum Beispiel wirkt sich ein Fehlen von WAVE1 auf die Morphologie der Axone und dendritischen Spines aus. Darüber hinaus wurden Änderungen in der Interaktion der synaptischen Partner beschrieben [215]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich neuronale Zellen einer Vielzahl von Aktivatoren bedienen, um komplexe Änderungen des Zytoskeletts herbeizuführen. Dies geschieht mit dem Ziel den Anforderungen, der neuronalen Netzwerke in Bezug auf Formation und Modulation gerecht, zu werden [216]. Die Defizienz von N-WASP wirkt sich mindestens auf die Anzahl der Synapsen (vergleiche die Diskussion zum Thema Differenzierung) aus. Darüber hinaus sind Veränderungen in der Dynamik der Synapsen sehr wahrscheinlich. Damit könnte sich ein Fehlen von N-WASP auf die gesamte neuronale Plastizität auswirken. Besonders in diesem Stadium der adulten Neurogenese wären Unterschiede in Bezug auf das Überleben der Zellen zwischen WT und KO zu erwarten gewesen. Es ist jedoch sehr schwierig, Aussagen über die Veränderung einzelner Zellen in Bezug auf das gesamte neuronale Netzwerk zu tätigen. Die aktuelle Auswertung der Daten weist nicht auf Unterschiede zwischen N-WASP positiven und negativen Linien hin: Es zeigten sich weder Unterschiede bei der Analyse von WT und KO nach 28 Tagen, noch bei der Kolokalisation der Zellen mit NeuN. Ein länger gefasster Untersuchungszeitraum könnte eine deutliche Veränderung der Datenlage zeigen, da die kritische Phase für die Integration von Zellen ins neuronale Netzwerke bis zu drei Monate zu dauern [39, 217]. Wie zuvor herausgearbeitet, muss eine Veränderung der LTP sowie der synaptischen Verbindung nicht obligat mit einer Veränderung der Morphologie einhergehen. Aus diesem Grund sind ergänzende und weiterführende morphologische Untersuchung der Dendriten und elektrophysiologische Untersuchung der LTP mit einem CaMkII-N-WASP-KO sowie Verhaltenstest mit hippokampalen Fokus zur weiteren Beurteilung erforderlich.

WASP-Familie

Die WASp-Familie besteht unter anderem aus N-WASP, WASP und WAVE/SCAR. In den letzten Jahren wurden zunehmend weitere Vertreter dieser Gruppe beschrieben, wie z.B. WHAMM, WASH und JMY. Sie zeigen, wie schon im Einführungsteil

ausgearbeitet, große Gemeinsamkeiten in Aufbau, Aktivierung und Funktion auf. Alle Mitglieder der WASP-Familie verfügen über die Eigenschaft den Arp2/3-Komplex zu aktivieren. Diese Aktivierung findet mit Hilfe der gemeinsamen VCA-Region statt. Der Arp2/3-Komplex reguliert die Aktinpolymerisation an sogenannten *barbed-ends* oder auch Verzweigungen von F-Aktinstrukturen. Die vom Arp2/3-Komplex geförderten Verzweigungen sind von großer Bedeutung für den Aufbau von Zellausläufern, insbesondere von Filopodien und Lamellipodien. Darüber hinaus ist er auch an intrazellulären Prozessen beteiligt. Aktuelle Veröffentlichungen sind bemüht die Alleinstellungsmerkmale und Unterschiede einzelner Vertreter der WASP-Familie herauszuarbeiten. Gleichwohl existieren zwischen den Publikationen zum Teil Unterschiede oder sogar Widersprüche. Die Mitglieder der WASP-Familie sind, trotz ihrer gemeinsam *downstream*-Regulation von Arp2/3, innerhalb der Zelle unterschiedlichen Lokalisationen zugeordnet [218]. Somit ist WAVE vor allem bei der Ausbildung von Lamellipodien beobachtet worden. Durch diese Funktion ist WAVE mit hoher Wahrscheinlichkeit an Zellmigration, Invasion und Metastasierung beteiligt [188, 219]. WASP und N-WASP beteiligen sich an der Einstülpung der Plasmamembran im Rahmen der Endo- und Phagozytose [220]. Darüber hinaus besitzt N-WASP die Fähigkeit Filopodien, Dendriten und Synapsen auszubilden [221]. WASP, WASH und WHAMM, JMY sind in Zellorganellen, wie zum Beispiel Nucleus, Golgi-Apparat und Endosomen anzutreffen. Hier entfalten sie ihre Funktion auch teilweise unabhängig vom Arp2/3-Komplex. Somit ist WASP beispielsweise in die Chromatinverteilung miteinbezogen [222-225]. Ursprünglich wurde WASP nur in hämopoetischen Zellen beschrieben. Nach aktuellem Erkenntnisstand scheint WASP jedoch auch in anderen Zellarten, wie zum Beispiel Neuronen vorzukommen [226]. Für die Mitglieder der WASP-Familie lassen sich weitreichende Homologien beschreiben. Die VAC-Region ist definierend für alle Vertreter. Darüber hinaus weisen sie untereinander zusätzliche Ähnlichkeiten auf (vgl. die Abbildung „WASP-Family“ der Einleitung). Der Aufbau entscheidet unter anderem in welcher Form die Proteine vorliegen. N-WASP und WASP sind typischerweise in autoinhibierter Form vorhanden. WAVE und WASH hingegen liegen an den *WAVE-regulating-complex* (WRC) gebunden vor [227, 228]. Kofaktoren wie WRC sind zur Modulation der Signalwege relevant. WIP hemmt ohne adäquaten Reiz die Interaktion zwischen N-WASP und dem *downstream-effector* Nck und stellt zusätzlich einen Zusammenhang zwischen den Membran Lipiden und der Aktivierung des Zytoskeletts in dendritischen Spines her. [206, 229]. Neuronen ohne WIP bilden

vergrößerte dendritische Spines aus [230]. Zudem kann WISH die Autoinhibition von N-WASP lösen und darüber hinaus auch unabhängig den Arp2/3-Komplex aktivieren [194]. Überdies bestimmt die Struktur, welche Signalwege in das Aktinskelett oder darüber hinaus integriert werden können. Insbesondere N-WASP ist, bedingt durch seinen Aufbau, in der Lage vielfältige intra- und extrazelluläre Signale einzugliedern. Dies wird u.a. durch die GBD-Region effektiert, die *Rho-family-GTPasen* und Cdc42 bindet [231]. Zusätzlich unterscheiden sich die Mitglieder der WASP-Familie in ihrer Aktinnukleationsaktivität. In vitro weißt WAVE1/Scar1, die langsamste Nukleationsrate auf. Hingegen besitzt WASP eine bis zu 16fach, N-WASP eine bis zu 70fach, höhere Aktivität [16]. Dabei scheint der Grund für die unterschiedliche Aktivität nicht der zusätzlichen WH2-Gruppe geschuldet zu sein. Der Arp2/3-Komplex benötigt zu seiner Aktivierung zwei WH2-Bindungen [232]. Es müssen folglich zwei Proteine gebunden werden [8]. Zur Erinnerung: Für eine effektive Aktinpolymerisation benötigt der Arp2/3-Komplex zwei mit Aktinmonomeren beladene VCA-Regionen [233]. Jedoch ist zu vermuten, dass die VA-Region von WAVE/SCAR, WASP und N-WASP den Arp2/3-Komplex mit ähnlich hoher Affinität binden. Stattdessen ist mutmaßlich eine veränderte Anzahl der Aminosäuren in der A-Region für die höhere Nukleationsrate verantwortlich. Somit konnte bei einer Veränderung der WAVE/Scar Aminosäuresequenz eine signifikant schnellere Aktinpolymerisation gemessen werden [16]. N-WASP besitzt zwei WH2-Regionen und es wird angenommen, dass dies die deutliche höhere Bindungskraft zum Aktin erklärt. Die Aufgabenverteilung der Proteine, auch untereinander, scheint komplexer als zunächst angenommen. Interessanterweise ist sowohl eine gegenseitige Hemmung als auch eine Synergie möglich. Somit sind WAVE und WASP in enger Zusammenarbeit für die Ausbildung der *Leading Edge* verantwortlich [234]. Die beiden Proteine konkurrieren nicht in ihrer Funktion, vielmehr findet eine Überlappung statt. Somit ist zu vermuten, dass WASP für die Rekrutierung von WAVE zur Membran verantwortlich ist. Bei einem WASP-KO wurde demnach eine größere Zerstreuung von WAVE beobachtet [226]. Im Falle eines WAVE-KO kann WASP an der *Leading Edge* wichtige Aufgaben kompensieren. Dieser Effekt scheint über die unterschiedliche Bindungsstärke zu Rac1 einem Vertreter der *Rho-family-GTPasen*, gesteuert zu werden. Somit besitzt Rac1, üblicherweise eine höhere Bindungsaffinität zu WAVE. Bei einer Auslassung von WAVE wird indessen vermehrt WASP rekrutiert [235]. Im Gegensatz dazu scheinen N-WASP und WAVE ihre Expression gegenseitig negativ zu regulieren und um verschiedene Typen der Zellmigration zu konkurrieren. Demnach ist es

vorstellbar, dass sich N-WASP und WAVE bei der 3D-Invasion als Antagonisten gegenüberstehen. Beim Wegfallen des Scar/WAVE-Komplex zeigte sich eine deutliche Erhöhung der durch N-WASP vorangetriebenen Invasionen [7]. Zusammenfassend ist die WASP-Familie an vielen zellulären Vorgängen, von Genexpression über Migration bis hin zu Zellorganellen, beteiligt. Ihre Bindungsstellen erlauben die Interpolierung extra- und intrazellulärer Stimuli. Hochinteressant und noch nicht überschaubar ist ihre Interaktion untereinander sowie die Ausprägung in den Zelllinien des Körpers. Störungen der WASP-Familie stehen mit hoher Wahrscheinlichkeit im Zusammenhang mit neuropsychologischen Krankheitsbildern und könnten sich als neue Ansätze in Therapieentwicklungen verfolgen lassen. Der enge Bezug zur Migration und Invasion lässt sie zudem als mögliche Angriffsstelle antitumoröser Therapien erscheinen [236]. Mit hoher Sicherheit werden im Verlauf der nächsten Jahre offene Fragen in Bezug auf die WASP-Familie geklärt werden können und zusätzlich neue Aspekte aufgeworfen werden.

Gliazellen

Die Funktionen, Regulierungen und Aufgaben von Gliazellen im zentralen Nervensystem erfahren in wissenschaftlichen Veröffentlichungen zunehmend mehr Beachtung. Neurone und Gliazellen werden aus NPCs gebildet. Ein Knock-Out von N-WASP wirkt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die Gliazellen aus. Die Ausbildung der Morphologie der Astrozyten ist abhängig von einer Modulierung des Arp2/3-Komplex durch WAVE, Pick1 und N-WASP. Ein N-WASP-KO führt zu einer Reduktion der Komplexität der Morphologie und einem vergrößerten Zellkörper. Ein Verlust von WAVE hingegen reduziert die Verzweigungen der Astrozytenausläufer. Die Deletion von Pick1, einem Hemmstoff des Arp2/3-Komplex, resultiert in einer erhöhten Komplexität der Zellausläufer [237]. Oligodendrozyten sind bei einer Depletion von N-WASP nicht in der Lage Zellfortsätze auszubilden und die Myelinisierung der Axone nimmt ab [186, 238]. Gliazellen weisen über die gemeinsame Abstammung hinaus einen engen Bezug zu Nervenzellen auf. Sie sind von großer Wichtigkeit für das Überleben unreifer Neurone in der Entwicklung: Sie phagozytieren reaktive Sauerstoffspezies und bilden Rezeptoren aus, die Glutamat aus dem synaptischen Spalt entfernen. Diese beiden Mechanismen verhindern ein neurotoxisches Milieu [239, 240]. Ihre Anzahl steht den Neuronen im Cortex ungefähr im Verhältnis 4:1 gegenüber [241]. Ihre Zell-Zell-Kontakte

im ZNS sind komplex reguliert. Eine Missbildung der Glia ist wahrscheinlich mit der Ausbildung von neurologischen Entwicklungsstörungen assoziiert [242]. Sie beeinflussen und modulieren neuronale Migration, Axon-Ausbildung und Wachstum [243, 244]. *Radial glia* ist bedeutend für die Steuerung der Migration unreifer Neurone unter physiologischen und pathologischen Bedingungen: Neurone wandern entlang der *radial Glia* zu ihrem Bestimmungsort. In Versuchen mit Fischen zeigte sich, dass sie möglicherweise neuronale Reparaturmechanismen über die Ausschüttung von Somatostatin fördern [245, 246]. Obwohl noch lediglich rudimentäre Daten vorliegen wird ihnen ein bedeutender Anteil an der Differenzierung von Zellen zugesprochen [247]. Zudem regulieren Gliazellen die Ausbildung und Wechselwirkung von Synapsen und beeinflussen demzufolge die synaptische Plastizität von Netzwerken [248]. Somit kommt es bei einer Dysregulation der Mikroglia zu einer Auswirkung auf das synaptische Netzwerk [249]. Astrozyten stellen Kontakte zu unreifen Neuronen her und fördern die Reifung und Bildung aktiver Synapsen über die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren [250]. Sie beteiligen sich an der Selektion der Synapsen. Bei diesem Prozess werden geeignete Synapsen gefördert, während Ungeeignete verloren gehen. Darüber hinaus werden einige Synapsen von Astrozyten phagozytiert [251]. Die Astrozyten stehen mit den Synapsen in engerem Kontakt als lange angenommen: Sie bilden nanoskopisch kleine Ausläufer, die als perisynaptische astrozytische Prozesse (PAP) mit den Synapsen direkt kommunizieren. Das Auftreten von PAPs ist im gesamten Gehirn zu beobachten, wobei topographische und individuelle Unterschiede im Grad der Ummantelung der Synapse existieren. Publikationen beschreiben die PAPs bereits als strukturell und funktionell integrale Bestandteile der Synapsen [252]. Bei einer Unterdrückung der astrozytären Filopodien über eine Hemmung der GTPase Rac1 und des Rho-A-Signalwegs wurde eine Beeinträchtigung der neuronalen Reifung beobachtet. Rac1 und Rho-A sind bedeutende *downstream-effectors* der WASP-Familie [253]. Die Auswirkung der Gliazellen auf Neurone findet dabei jedoch nicht einseitig statt: Nervenzellen beeinflussen reziprok die Reifung und Diversität von Astrozyten [254]. Die Kommunikation und Plastizität von Netzwerken wird über den Neurotransmitter *Re-uptake* der Astrozyten ausschlaggebend beeinflusst. Somit werden die Glutamatrezeptoren der Astrozyten bei hoher Aktivität hochreguliert, während sie bei niedriger Aktivität runterreguliert werden [255]. Es existieren Hinweise, die zeigen, dass die Kommunikation der PAPs mit den Synapsen über den Tag-Nacht-Rhythmus gesteuert wird. Der Grad der Ummantelung der Synapsen mit PAPs ist während den Wachphasen

und vermehrter neuronaler Aktivität höher. Die Aktivität der Astrozyten wird über die Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt gefördert. Die Astrozyten reagieren über die Ausschüttung von Gliotransmittern [253, 256, 257]. Sie können G-Protein gesteuert sogenannte Gliotransmitter ausschütten, welche auf die Aktivität von Synapsen und anderen Gliazellen einwirken können. Zudem sind sie in der Lage die Ionenzusammensetzung im synaptischen Spalt zu modifizieren [258]. Des Weiteren werden Auswirkungen auf die Langzeitpotenzierung beschrieben [259]. Über Ausschüttung von Gliotransmittern mit zeitgleich erhöhter Aktivität im synaptischen Spalt kann es zu einer Verstärkung der Synapse, vermutlich durch den vermehrten Einbau von AMPA-Rezeptoren, kommen. Darüber hinaus kann eine hohe Aktivität einer Synapse zu einer Vermehrung der astrozytären Kontakte zur Selbigen führen. Hingegen ist in Phasen vermehrter Ruhe eine Abnahme der synaptischen Ummantelung beschrieben. Aufgrund dieser komplexen Regulierungen und Einflussnahme wird auch von einer astrozytären Plastizität gesprochen. Astrozyten können möglicherweise auch Informationen außerhalb des synaptischen Netzwerks zur Verfügung stellen: z.B. von vaskulären Zellen und Immunzellen [260, 261]. Darüber hinaus zeigte sich bei einer Aktivierung der Astrozyten eine erhöhte synaptische Plastizität und eine Verbesserung der Gedächtnisleistung [262]. Bei Versuchen mit einer Depletion der Mikroglia wurden Abnahmen der synaptischen Formationen deutlich [263]. Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung, da auch der adulten Neurogenese ein großer Stellenwert in der Gedächtnisfunktion zugeschrieben wird. Ausdifferenzierte Gliazellen besitzen darüber hinaus die beachtliche Qualität zurück in Progenitorzellen zu konvertieren oder sich sogar zu Neuronen transdifferenzieren zu können. Im Zuge dessen sind sie in der Lage wiederum Gliazellen und Neurone zu bilden, die als Reserve bei neuronalen Verletzungen dienen könnten [264-267]. Zusammengefasst zeigen diese Publikationen, dass neuronale Entwicklung ohne den Einfluss von Gliazellen kaum möglich ist. Es muss erwähnt werden, dass zur Rolle der Glia im Zusammenhang mit neuronaler Entwicklung, Migration und synaptischer Plastizität aktuell noch viel Grundlagenforschung durchgeführt wird. Somit sind Regulation, Funktionsweisen und Bedeutung noch nicht vollständig erfasst. Der große Anstieg an Publikationen in den letzten Jahren verdeutlicht das zunehmende Interesse der Forschung und an diesen Zelllinien.

Literaturverzeichnis

1. Binder, V., et al., *The genotype of the original Wiskott phenotype*. N Engl J Med, 2006. **355**(17): p. 1790-3.
2. Derry, J.M.J., H.D. Ochs, and U. Francke, *Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome*. Cell, 1994. **78**(4): p. 635-644.
3. Miki, H., K. Miura, and T. Takenawa, *N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases*. EMBO J, 1996. **15**(19): p. 5326-35.
4. Fukuoka, M., H. Miki, and T. Takenawa, *Identification of N-WASP homologs in human and rat brain*. Gene, 1997. **196**(1-2): p. 43-8.
5. Takenawa, T. and S. Suetsugu, *The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 37-48.
6. Takenawa, T. and H. Miki, *WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 10): p. 1801-9.
7. Tang, H., et al., *Loss of Scar/WAVE Complex Promotes N-WASP- and FAK-Dependent Invasion*. Current Biology, 2013. **23**(2): p. 107-117.
8. Padrick, S.B., et al., *Arp2/3 complex is bound and activated by two WASP proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. E472-9.
9. Helgeson, L.A., et al., *Interactions with actin monomers, actin filaments, and Arp2/3 complex define the roles of WASP family proteins and cortactin in coordinately regulating branched actin networks*. J Biol Chem, 2014. **289**(42): p. 28856-69.
10. Miki, H. and T. Takenawa, *Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(1): p. 73-8.
11. Rohatgi, R., et al., *Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26448-52.
12. Okrut, J., et al., *Allosteric N-WASP activation by an inter-SH3 domain linker in Nck*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**(47): p. E6436-E6445.
13. Carlier, M.F., et al., *GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) with actin-related protein (ARP2/3) complex*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21946-52.
14. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
15. and, H.N.H. and T.D. Pollard, *Regulation of Actin Filament Network Formation Through ARP2/3 Complex: Activation by a Diverse Array of Proteins*. Annual Review of Biochemistry, 2001. **70**(1): p. 649-676.
16. Zalevsky, J., et al., *Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities*. Current Biology, 2001. **11**(24): p. 1903-1913.
17. Koronakis, V., et al., *WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**(35): p. 14449-14454.

18. Miki, H., et al., *Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP*. Nature, 1998. **391**: p. 93.
19. Stradal, T.E.B., et al., *Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins*. Trends in Cell Biology, 2004. **14**(6): p. 303-311.
20. Yamaguchi, H., et al., *Two tandem verprolin homology domains are necessary for a strong activation of Arp2/3 complex-induced actin polymerization and induction of microspike formation by N-WASP*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(23): p. 12631-12636.
21. Yamaguchi, H., H. Miki, and T. Takenawa, *Two verprolin homology domains increase the Arp2/3 complex-mediated actin polymerization activities of N-WASP and WAVE1 C-terminal regions*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **297**(2): p. 214-219.
22. Volkman, B.F., et al., *Structure of the N-WASP EVH1 Domain-WIP Complex: Insight into the Molecular Basis of Wiskott-Aldrich Syndrome*. Cell, 2002. **111**(4): p. 565-576.
23. Miki, H., et al., *Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 93-6.
24. Yang, C. and T. Svitkina, *Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(5): p. 402-8.
25. Pollard, T.D., *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 2007. **36**.
26. D Korn, E., M.-F. Carlier, and D. Pantaloni, *Actin polymerization and ATP hydrolysis*. Vol. 238. 1987. 638-44.
27. Martín-Benito, J., et al., *Structure of eukaryotic prefoldin and of its complexes with unfolded actin and the cytosolic chaperonin CCT*. The EMBO Journal, 2002. **21**(23): p. 6377-6386.
28. Gage, F.H., *Adult neurogenesis in mammals*. Science, 2019. **364**(6443): p. 827.
29. Alvarez-Buylla, A. and D.A. Lim, *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. Neuron, 2004. **41**(5): p. 683-6.
30. Chiasson, B.J., et al., *Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics*. Journal of Neuroscience, 1999. **19**(11): p. 4462-4471.
31. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2005. **28**: p. 223-50.
32. Roy, N.S., et al., *In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 271-7.
33. Anacker, C. and R. Hen, *Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility — linking memory and mood*. Nature Reviews Neuroscience, 2017. **18**(6): p. 335-346.
34. Boldrini, M., et al., *Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging*. Cell Stem Cell, 2018. **22**(4): p. 589-599.e5.
35. Sorrells, S.F., et al., *Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults*. Nature, 2018. **555**(7696): p. 377-381.
36. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. Science, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
37. Zhao, C., W. Deng, and F.H. Gage, *Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis*. Cell, 2008. **132**(4): p. 645-60.

38. Deisseroth, K. and R.C. Malenka, *GABA Excitation in the Adult Brain: A Mechanism for Excitation- Neurogenesis Coupling*. Neuron, 2005. **47**(6): p. 775-777.
39. Ge, S., et al., *A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain*. Neuron, 2007. **54**(4): p. 559-66.
40. Gould, E., et al., *Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation*. Nat Neurosci, 1999. **2**(3): p. 260-5.
41. Song, S., et al., *Highly Nonrandom Features of Synaptic Connectivity in Local Cortical Circuits*. PLOS Biology, 2005. **3**(3): p. e68.
42. Fabel, K., et al., *VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(10): p. 2803-12.
43. Trejo, J., E. Carro, and I. Torres-Aleman, *Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus*. Vol. 21. 2001. 1628-34.
44. Gould, E., C.S. Woolley, and B.S. McEwen, *Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death*. J Comp Neurol, 1991. **313**(3): p. 479-85.
45. Kuhn, H.G., H. Dickinson-Anson, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation*. J Neurosci, 1996. **16**(6): p. 2027-33.
46. Tashiro, A., H. Makino, and F.H. Gage, *Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage*. J Neurosci, 2007. **27**(12): p. 3252-9.
47. Tashiro, A., et al., *NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus*. Nature, 2006. **442**(7105): p. 929-33.
48. Praag, H.v., et al., *Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2005. **25**(38): p. 8680-8685.
49. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Neurogenesis in the adult hippocampus*. Novartis Found Symp, 2000. **231**: p. 220-35; discussion 235-41, 302-6.
50. Sierra, A., et al., *Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis*. Cell stem cell, 2010. **7**(4): p. 483-495.
51. Ming, G.L. and H. Song, *Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions*. Neuron, 2011. **70**(4): p. 687-702.
52. Ge, S., et al., *GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain*. Nature, 2006. **439**(7076): p. 589-93.
53. Bhattacharyya, B.J., et al., *The chemokine stromal cell-derived factor-1 regulates GABAergic inputs to neural progenitors in the postnatal dentate gyrus*. J Neurosci, 2008. **28**(26): p. 6720-30.
54. Esposito, M.S., et al., *Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development*. J Neurosci, 2005. **25**(44): p. 10074-86.
55. Toni, N., et al., *Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus*. Nat Neurosci, 2007. **10**(6): p. 727-34.
56. Mongiat, L.A. and A.F. Schinder, *Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network*. Eur J Neurosci, 2011. **33**(6): p. 1055-61.
57. Palmer, T.D., et al., *Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS*. J Neurosci, 1999. **19**(19): p. 8487-97.

58. Babu, H., et al., *Enriched Monolayer Precursor Cell Cultures from Micro-Dissected Adult Mouse Dentate Gyrus Yield Functional Granule Cell-Like Neurons*. PLoS One, 2007. **2**(4).
59. Bull, N.D. and P.F. Bartlett, *The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell*. J Neurosci, 2005. **25**(47): p. 10815-21.
60. Seri, B., et al., *Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus*. The Journal of Neuroscience, 2001. **21**(18): p. 7153-7160.
61. Filippov, V., et al., *Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2003. **23**(3): p. 373-382.
62. Sohur, U.S., et al., *Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1473): p. 1477-97.
63. Steiner, B., et al., *Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis*. Glia, 2006. **54**(8): p. 805-14.
64. Kronenberg, G., et al., *Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli*. J Comp Neurol, 2003. **467**(4): p. 455-63.
65. Kempermann, G., et al., *Milestones of neuronal development in the adult hippocampus*. Trends in Neurosciences, 2004. **27**(8): p. 447-452.
66. Brandt, M.D., et al., *Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2003. **24**(3): p. 603-613.
67. Kaneko, N., M. Sawada, and K. Sawamoto, *Mechanisms of neuronal migration in the adult brain*. Journal of Neurochemistry, 2017. **141**(6): p. 835-847.
68. Lazarini, F. and P.-M. Lledo, *Is adult neurogenesis essential for olfaction?* Trends in Neurosciences, 2011. **34**(1): p. 20-30.
69. Yamashita, T., et al., *Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum*. J Neurosci, 2006. **26**(24): p. 6627-36.
70. Bovetti, S., et al., *Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb*. J Neurosci, 2007. **27**(22): p. 5976-80.
71. Arvidsson, A., et al., *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke*. Nat Med, 2002. **8**(9): p. 963-70.
72. Schaar, B.T. and S.K. McConnell, *Cytoskeletal coordination during neuronal migration*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(38): p. 13652-13657.
73. Koizumi, H., et al., *Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain*. Nat Neurosci, 2006. **9**(6): p. 779-86.
74. Hatten, M.E., *New directions in neuronal migration*. Science, 2002. **297**(5587): p. 1660-3.
75. Shinohara, R., *A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors*. Nature Neuroscience, 2012. **15**(373-380): p. S371-S372.
76. Sonogo, M., et al., *Drebrin regulates neuroblast migration in the postnatal mammalian brain*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126478.
77. Khodosevich, K., P.H. Seeburg, and H. Monyer, *Major signaling pathways in migrating neuroblasts*. Front Mol Neurosci, 2009. **2**: p. 7.

78. Worth, D.C., et al., *Drebrin contains a cryptic F-actin-bundling activity regulated by Cdk5 phosphorylation*. J Cell Biol, 2013. **202**(5): p. 793-806.
79. Edmondson, J. and M. Hatten, *Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study*. The Journal of Neuroscience, 1987. **7**(6): p. 1928-1934.
80. Wong, K., et al., *Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway*. Cell, 2001. **107**(2): p. 209-21.
81. Ng, K.L., et al., *Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling*. Science, 2005. **308**(5730): p. 1923-7.
82. Nguyen-Ba-Charvet, K.T., et al., *Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream*. J Neurosci, 2004. **24**(6): p. 1497-506.
83. Lois, C., J.M. Garcia-Verdugo, and A. Alvarez-Buylla, *Chain migration of neuronal precursors*. Science, 1996. **271**(5251): p. 978-81.
84. Chazal, G., et al., *Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse*. J Neurosci, 2000. **20**(4): p. 1446-57.
85. Le Magueresse, C., et al., *Subventricular zone-derived neuroblasts use vasculature as a scaffold to migrate radially to the cortex in neonatal mice*. Cereb Cortex, 2012. **22**(10): p. 2285-96.
86. Alves, J.A., et al., *Initial stages of radial glia astrocytic transformation in the early postnatal anterior subventricular zone*. J Neurobiol, 2002. **52**(3): p. 251-65.
87. Thored, P., et al., *Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke*. Stem Cells, 2006. **24**(3): p. 739-47.
88. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.
89. Njoo, C., et al., *The Cannabinoid Receptor CB1 Interacts with the WAVE1 Complex and Plays a Role in Actin Dynamics and Structural Plasticity in Neurons*. PLoS Biol, 2015. **13**(10): p. e1002286.
90. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(1): p. 129-36.
91. Shetty, A.K., B. Hattiangady, and G.A. Shetty, *Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes*. Glia, 2005. **51**(3): p. 173-86.
92. Jin, K., et al., *Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice*. Aging Cell, 2003. **2**(3): p. 175-83.
93. Cintra, A., et al., *Basic fibroblast growth factor and steroid receptors in the aging hippocampus of the brown Norway rat: immunocytochemical analysis in combination with stereology*. Neurochem Int, 1994. **25**(1): p. 39-45.
94. Montaron, M.F., et al., *Lifelong corticosterone level determines age-related decline in neurogenesis and memory*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(4): p. 645-54.
95. Cameron, H.A. and R.D. McKay, *Restoring production of hippocampal neurons in old age*. Nat Neurosci, 1999. **2**(10): p. 894-7.

96. Alonso, R., et al., *Blockade of CRF1 or V1b receptors reverses stress-induced suppression of neurogenesis in a mouse model of depression*. *Molecular Psychiatry*, 2003. **9**: p. 278.
97. Coe, C.L., et al., *Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile Rhesus monkeys*. *Biological Psychiatry*, 2003. **54**(10): p. 1025-1034.
98. Gould, E., et al., *Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Tree Shrew Is Regulated by Psychosocial Stress and NMDA Receptor Activation*. *The Journal of Neuroscience*, 1997. **17**(7): p. 2492-2498.
99. Gould, E., et al., *Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998. **95**(6): p. 3168-3171.
100. Simon, M., B. Czeh, and E. Fuchs, *Age-dependent susceptibility of adult hippocampal cell proliferation to chronic psychosocial stress*. *Brain Res*, 2005. **1049**(2): p. 244-8.
101. Ali, A.A.H., et al., *Premature aging of the hippocampal neurogenic niche in adult Bmal1- deficient mice*. *Aging (Albany NY)*, 2015. **7**(6): p. 435-49.
102. Otten, U., et al., *Cytokines and neurotrophins interact in normal and diseased states*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **917**: p. 322-30.
103. Barkho, B.Z., et al., *Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation*. *Stem Cells Dev*, 2006. **15**(3): p. 407-21.
104. Gould, E. and P. Tanapat, *Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat*. *Neuroscience*, 1997. **80**(2): p. 427-36.
105. Kempermann, G., D. Gast, and F.H. Gage, *Neuroplasticity in old age: Sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment*. *Annals of Neurology*, 2002. **52**(2): p. 135-143.
106. Kempermann, G. and F.H. Gage, *Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: Effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal*. *Hippocampus*, 1999. **9**(3): p. 321-332.
107. Garthe, A., I. Roeder, and G. Kempermann, *Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis*. *Hippocampus*, 2016. **26**(2): p. 261-271.
108. Kronenberg, G., et al., *Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus*. *Neurobiol Aging*, 2006. **27**(10): p. 1505-13.
109. Marlatt, M.W., et al., *Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice*. *Developmental Neurobiology*, 2012. **72**(6): p. 943-952.
110. Parent, J.M. and D.H. Lowenstein, *Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain?*, in *Progress in Brain Research*. 2002, Elsevier. p. 121-131.
111. Jacobs, B.L., H. van Praag, and F.H. Gage, *Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression*. *Molecular Psychiatry*, 2000. **5**: p. 262.
112. O'Reilly, R.C. and J.L. McClelland, *Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: Avoiding a trade-off*. *Hippocampus*, 1994. **4**(6): p. 661-682.
113. Baker JL. Is there a support vector machine hiding in the dentate gyrus? *Neurocomputing* 52: 199–207, 2003
114. Bakker, A., et al., *Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus*. *Science*, 2008. **319**(5870): p. 1640-2.

115. Aimone, J.B., et al., *Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition*. *Physiol Rev*, 2014. **94**(4): p. 991-1026.
116. Creer, D.J., et al., *Running enhances spatial pattern separation in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(5): p. 2367-72.
117. McTighe, S.M., et al., *A new touchscreen test of pattern separation: effect of hippocampal lesions*. *Neuroreport*, 2009. **20**(9): p. 881-5.
118. Sahay, A., et al., *Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation*. *Nature*, 2011. **472**(7344): p. 466-70.
119. Neher, T., S. Cheng, and L. Wiskott, *Memory Storage Fidelity in the Hippocampal Circuit: The Role of Subregions and Input Statistics*. *PLOS Computational Biology*, 2015. **11**(5): p. e1004250.
120. Snapper, S.B., et al., *N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility*. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(10): p. 897-904.
121. Joyner, A.L. and F. Guillemot, *Gene targeting and development of the nervous system*. *Curr Opin Neurobiol*, 1994. **4**(1): p. 37-42.
122. Tsien, J.Z., et al., *Subregion- and Cell Type-Restricted Gene Knockout in Mouse Brain*. *Cell*, 1996. **87**(7): p. 1317-1326.
123. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988. **85**(14): p. 5166-5170.
124. Yamauchi, T., *Neuronal Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II—Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005. **28**(8): p. 1342-1354.
125. Wang, P., et al., *Identification of alternative splicing variants of the β subunit of human Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with different activities*. *FEBS Letters*, 2000. **475**(2): p. 107-110.
126. Coultrap, S.J. and K.U. Bayer, *CaMKII regulation in information processing and storage*. *Trends Neurosci*, 2012. **35**(10): p. 607-18.
127. Wang, X., et al., *Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice*. *Brain Res*, 2013. **1518**: p. 9-25.
128. Fujii, H., et al., *Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII α and Calcineurin*. *Cell Reports*, 2013. **3**(4): p. 978-987.
129. Haribabu, B., et al., *Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase*. *The EMBO Journal*, 1995. **14**(15): p. 3679-3686.
130. Goodell, D.J., T.A. Benke, and K.U. Bayer, *Developmental restoration of LTP deficits in heterozygous CaMKII α KO mice*. *J Neurophysiol*, 2016. **116**(5): p. 2140-2151.
131. Mayford, M., et al., *The 3'-untranslated region of CaMKII α is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996. **93**(23): p. 13250-13255.
132. Burgin, K.E., et al., *In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain*. *J Neurosci*, 1990. **10**(6): p. 1788-98.

133. Burgin, K., et al., *In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain*. The Journal of Neuroscience, 1990. **10**(6): p. 1788-1798.
134. Reznikov, K.Y., *Cell proliferation and cytogenesis in the mouse hippocampus*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 1991. **122**: p. 1-74.
135. Ehninger, D. and G. Kempermann, *Neurogenesis in the adult hippocampus*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 243-50.
136. Mercier, F., J.T. Kitasako, and G.I. Hatton, *Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network*. J Comp Neurol, 2002. **451**(2): p. 170-88.
137. Palmer, T.D., A.R. Willhoite, and F.H. Gage, *Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis*. J Comp Neurol, 2000. **425**(4): p. 479-94.
138. Wurmser, A.E., et al., *Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage*. Nature, 2004. **430**(6997): p. 350-6.
139. Liebmann, M., et al., *Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice*. Neurosci Lett, 2013. **545**: p. 40-5.
140. Oh, J., et al., *Astrocyte-derived interleukin-6 promotes specific neuronal differentiation of neural progenitor cells from adult hippocampus*. J Neurosci Res, 2010. **88**(13): p. 2798-809.
141. Anderson, M.F., et al., *Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain*. Brain Res Dev Brain Res, 2002. **134**(1-2): p. 115-22.
142. Gandy, K., et al., *Pattern Separation: A Potential Marker of Impaired Hippocampal Adult Neurogenesis in Major Depressive Disorder*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 571.
143. Grilli, M., *Chronic pain and adult hippocampal neurogenesis: translational implications from preclinical studies*. J Pain Res, 2017. **10**: p. 2281-2286.
144. Danzer, S.C., *Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis*. Exp Neurol, 2012. **233**(1): p. 22-32.
145. Urrea, C., et al., *Widespread cellular proliferation and focal neurogenesis after traumatic brain injury in the rat*. Restor Neurol Neurosci, 2007. **25**(1): p. 65-76.
146. Ernst, C. and B.R. Christie, *Temporally specific proliferation events are induced in the hippocampus following acute focal injury*. J Neurosci Res, 2006. **83**(3): p. 349-61.
147. Nakayama, D., et al., *Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex*. Eur J Neurosci, 2010. **31**(1): p. 90-8.
148. Hou, J., et al., *N-WASP promotes invasion and migration of cervical cancer cells through regulating p38 MAPKs signaling pathway*. Am J Transl Res, 2017. **9**(2): p. 403-415.
149. Liu, G., et al., *SP1-induced up-regulation of lncRNA SNHG14 as a ceRNA promotes migration and invasion of clear cell renal cell carcinoma by regulating N-WASP*. Am J Cancer Res, 2017. **7**(12): p. 2515-2525.
150. Carmona, G., et al., *Lamellipodin promotes invasive 3D cancer cell migration via regulated interactions with Ena/VASP and SCAR/WAVE*. Oncogene, 2016. **35**(39): p. 5155-69.
151. Miller, M.W. and R.S. Nowakowski, *Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system*. Brain Res, 1988. **457**(1): p. 44-52.

152. Taupin, P., *BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation*. Brain Res Rev, 2007. **53**(1): p. 198-214.
153. Filippov, V., et al., *Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes*. Mol Cell Neurosci, 2003. **23**(3): p. 373-82.
154. Eriksson, P.S., et al., *Neurogenesis in the adult human hippocampus*. Nature Medicine, 1998. **4**: p. 1313.
155. Garcia, A.D., et al., *GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain*. Nat Neurosci, 2004. **7**(11): p. 1233-41.
156. Gleeson, J.G., et al., *Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons*. Neuron, 1999. **23**(2): p. 257-71.
157. Francis, F., et al., *Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons*. Neuron, 1999. **23**(2): p. 247-256.
158. Jain, N., et al., *Conditional N-WASP knockout in mouse brain implicates actin cytoskeleton regulation in hydrocephalus pathology*. Exp Neurol, 2014. **254**: p. 29-40.
159. Jin, F., et al., *N-WASp is required for Schwann cell cytoskeletal dynamics, normal myelin gene expression and peripheral nerve myelination*. Development, 2011. **138**(7): p. 1329-37.
160. Li, Y., et al., *TrkB Regulates Hippocampal Neurogenesis and Governs Sensitivity to Antidepressive Treatment*. Neuron, 2008. **59**(3): p. 399-412.
161. Goodell, D.J., T.A. Benke, and K.U. Bayer, *Developmental restoration of LTP deficits in heterozygous CaMKII α KO mice*. J Neurophysiol, 2016. **116**(5): p. 2140-2151.
162. Elgersma, Y., J.D. Sweatt, and K.P. Giese, *Mouse Genetic Approaches to Investigating Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function in Plasticity and Cognition*. The Journal of Neuroscience, 2004. **24**(39): p. 8410-8415.
163. Donai, H., et al., *Induction and alternative splicing of delta isoform of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II during neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells and during brain development*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **85**(1-2): p. 189-99.
164. Kool, M.J., et al., *CAMK2-Dependent Signaling in Neurons Is Essential for Survival*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2019. **39**(28): p. 5424-5439.
165. Elgersma, Y., et al., *Inhibitory autophosphorylation of CaMKII controls PSD association, plasticity, and learning*. Neuron, 2002. **36**(3): p. 493-505.
166. Stephenson, J.R., et al., *A Novel Human CAMK2A Mutation Disrupts Dendritic Morphology and Synaptic Transmission, and Causes ASD-Related Behaviors*. J Neurosci, 2017. **37**(8): p. 2216-2233.
167. Arruda-Carvalho, M., et al., *Conditional Deletion of α -CaMKII Impairs Integration of Adult-Generated Granule Cells into Dentate Gyrus Circuits and Hippocampus-Dependent Learning*. The Journal of Neuroscience, 2014. **34**(36): p. 11919-11928.
168. Wu, G.-Y. and H.T. Cline, *Stabilization of Dendritic Arbor Structure in Vivo by CaMKII*. Science, 1998. **279**(5348): p. 222-226.

169. de Koning, A., et al., *Derivation of neural stem cells from an animal model of psychiatric disease*. Translational Psychiatry, 2013. **3**(11): p. e323-e323.
170. Chen, H. and R. Han, *Characterization of Actin Filament Dynamics during Mitosis in Wheat Protoplasts under UV-B Radiation*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20115.
171. Melendez, J., et al., *RhoA GTPase is dispensable for actomyosin regulation but is essential for mitosis in primary mouse embryonic fibroblasts*. J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 15132-7.
172. Szerlong, H., et al., *The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(5): p. 469-76.
173. Park, S.J. and T. Takenawa, *Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for accurate chromosome congression and segregation*. Mol Cells, 2011. **31**(6): p. 515-21.
174. Bompard, G., G. Rabeharivelo, and N. Morin, *Inhibition of cytokinesis by wiskostatin does not rely on N-WASP/Arp2/3 complex pathway*. BMC Cell Biology, 2008. **9**(1): p. 42.
175. Pelham, R.J. and F. Chang, *Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast*. Nature, 2002. **419**(6902): p. 82-6.
176. Wu, J.Q., et al., *Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast*. J Cell Biol, 2006. **174**(3): p. 391-402.
177. Phng, L.K., F. Stanchi, and H. Gerhardt, *Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance*. Development, 2013. **140**(19): p. 4031-40.
178. Shen, X.L., et al., *[N-WASP regulates cortical neuron migration through its polyPro and VCA domains]*. Yi Chuan, 2018. **40**(5): p. 390-401.
179. Dwivedy, A., et al., *Ena/VASP function in retinal axons is required for terminal arborization but not pathway navigation*. Development, 2007. **134**(11): p. 2137-46.
180. Nelson, J.C. and D.A. Colon-Ramos, *Serotonergic neurosecretory synapse targeting is controlled by netrin-releasing guidepost neurons in Caenorhabditis elegans*. J Neurosci, 2013. **33**(4): p. 1366-76.
181. Nelson, J.C., A.K. Stavoe, and D.A. Colón-Ramos, *The actin cytoskeleton in presynaptic assembly*. Cell Adh Migr, 2013. **7**(4): p. 379-87.
182. Dharmalingam, E., et al., *F-BAR proteins of the syndapin family shape the plasma membrane and are crucial for neuromorphogenesis*. J Neurosci, 2009. **29**(42): p. 13315-27.
183. Pinyol, R., et al., *Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology*. PLoS One, 2007. **2**(5): p. e400.
184. Kakimoto, T., H. Katoh, and M. Negishi, *Regulation of Neuronal Morphology by Toca-1, an F-BAR/EFC Protein That Induces Plasma Membrane Invagination*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(39): p. 29042-29053.
185. Novak, N., et al., *N-WASP is required for membrane wrapping and myelination by Schwann cells*. J Cell Biol, 2011. **192**(2): p. 243-50.
186. Bacon, C., et al., *N-WASP regulates extension of filopodia and processes by oligodendrocyte progenitors, oligodendrocytes, and Schwann cells-implications for axon ensheathment at myelination*. Glia, 2007. **55**(8): p. 844-58.
187. Kurisu, S. and T. Takenawa, *WASP and WAVE family proteins: friends or foes in cancer invasion?* Cancer Sci, 2010. **101**(10): p. 2093-104.

188. Burianek, L.E. and S.H. Soderling, *Under lock and key: spatiotemporal regulation of WASP family proteins coordinates separate dynamic cellular processes*. *Semin Cell Dev Biol*, 2013. **24**(4): p. 258-66.
189. Krause, M. and A. Gautreau, *Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014. **15**: p. 577.
190. Snapper, S.B., et al., *N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility*. *Nature Cell Biology*, 2001. **3**: p. 897.
191. Steffen, A., et al., *Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(6): p. 2581-91.
192. Beli, P., et al., *WAVE and Arp2/3 jointly inhibit filopodium formation by entering into a complex with mDia2*. *Nature Cell Biology*, 2008. **10**: p. 849.
193. Kim, I.H., et al., *Disruption of wave-associated Rac GTPase-activating protein (Wrp) leads to abnormal adult neural progenitor migration associated with hydrocephalus*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(46): p. 39263-74.
194. Fukuoka, M., et al., *A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42*. *J Cell Biol*, 2001. **152**(3): p. 471-82.
195. Wacker, A., H. Gerhardt, and L.-K. Phng, *Tissue guidance without filopodia*. *Communicative & Integrative Biology*, 2014. **7**(3): p. e28820.
196. Malenka, R.C. and M.F. Bear, *LTP and LTD: an embarrassment of riches*. *Neuron*, 2004. **44**(1): p. 5-21.
197. Dent, E.W. and F.B. Gertler, *Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance*. *Neuron*, 2003. **40**(2): p. 209-27.
198. You, J.J. and S. Lin-Chao, *Gas7 functions with N-WASP to regulate the neurite outgrowth of hippocampal neurons*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(15): p. 11652-66.
199. Firat-Karalar, E.N., P.P. Hsiue, and M.D. Welch, *The actin nucleation factor JMY is a negative regulator of neuritogenesis*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(23): p. 4563-74.
200. Soderling, S.H., et al., *A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory*. *J Neurosci*, 2007. **27**(2): p. 355-65.
201. Shirao, T., et al., *The role of drebrin in neurons*. *Journal of Neurochemistry*, 2017. **141**(6): p. 819-834.
202. Irie, F. and Y. Yamaguchi, *EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP*. *Nat Neurosci*, 2002. **5**(11): p. 1117-8.
203. Jausoro, I., et al., *Regulation of spine density and morphology by IQGAP1 protein domains*. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e56574.
204. Carlson, B.R., et al., *WRP/srGAP3 facilitates the initiation of spine development by an inverse F-BAR domain, and its loss impairs long-term memory*. *J Neurosci*, 2011. **31**(7): p. 2447-60.
205. Ito, H., et al., *Dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 form a complex that regulates dendritic spine formation*. *Mol Psychiatry*, 2010. **15**(10): p. 976-86.
206. Franco-Villanueva, A., et al., *WIP modulates dendritic spine actin cytoskeleton by transcriptional control of lipid metabolic enzymes*. *Human Molecular Genetics*, 2014. **23**(16): p. 4383-4395.
207. Simon-Areces, J., et al., *Formin1 mediates the induction of dendritogenesis and synaptogenesis by neurogenin3 in mouse hippocampal neurons*. *PLoS One*, 2011. **6**(7): p. e21825.

208. Kempermann, G., H. Song, and F.H. Gage, *Neurogenesis in the Adult Hippocampus*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(9): p. a018812.
209. Overall, R.W. and G. Kempermann, *The Small World of Adult Hippocampal Neurogenesis*. Front Neurosci, 2018. **12**: p. 641.
210. Schneider-Mizell, C.M., et al., *From network structure to network reorganization: implications for adult neurogenesis*. Phys Biol, 2010. **7**(4): p. 046008.
211. Dailey, M.E. and S.J. Smith, *The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices*. J Neurosci, 1996. **16**(9): p. 2983-94.
212. Franco-Villanueva, A., F. Wandosell, and I.M. Antón, *Neuritic complexity of hippocampal neurons depends on WIP-mediated mTORC1 and Abl family kinases activities*. Brain Behav, 2015. **5**(11): p. e00359.
213. Blanchoin, L., et al., *Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins*. Nature, 2000. **404**: p. 1007.
214. Bear, J.E. and F.B. Gertler, *Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 1947-53.
215. Hazai, D., et al., *Ultrastructural abnormalities in CA1 hippocampus caused by deletion of the actin regulator WAVE-1*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75248.
216. Kessels, M.M., et al., *Controlling actin cytoskeletal organization and dynamics during neuronal morphogenesis*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(11): p. 926-33.
217. Toni, N., et al., *Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells*. Nat Neurosci, 2008. **11**(8): p. 901-7.
218. Alekhina, O., E. Burstein, and D.D. Billadeau, *Cellular functions of WASP family proteins at a glance*. Journal of Cell Science, 2017. **130**(14): p. 2235-2241.
219. Squarr, A.J., et al., *Fat2 acts through the WAVE regulatory complex to drive collective cell migration during tissue rotation*. The Journal of Cell Biology, 2016. **212**(5): p. 591-603.
220. Massaad, M.J., N. Ramesh, and R.S. Geha, *Wiskott-Aldrich syndrome: a comprehensive review*. Ann NY Acad Sci, 2013. **1285**: p. 26-43.
221. Wegner, A.M., et al., *N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses*. J Biol Chem, 2008. **283**(23): p. 15912-20.
222. Verboon, J.M., B. Sugumar, and S.M. Parkhurst, *Wiskott-Aldrich syndrome proteins in the nucleus: aWASH with possibilities*. Nucleus, 2015. **6**(5): p. 349-359.
223. Verboon, J.M., et al., *Wash interacts with lamin and affects global nuclear organization*. Curr Biol, 2015. **25**(6): p. 804-810.
224. Blom, M., et al., *RhoD is a Golgi component with a role in anterograde protein transport from the ER to the plasma membrane*. Exp Cell Res, 2015. **333**(2): p. 208-19.
225. Zuchero, J.B., et al., *p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 451-9.
226. Zhu, Z., et al., *Functional Coordination of WAVE and WASP in C. elegans Neuroblast Migration*. Developmental Cell, 2016. **39**(2): p. 224-238.
227. Eden, S., et al., *Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck*. Nature, 2002. **418**(6899): p. 790-3.
228. Jia, D., et al., *WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally related complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(23): p. 10442-7.

229. Martinez-Quiles, N., et al., *WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation*. *Nature Cell Biology*, 2001. **3**: p. 484.
230. Anton, I.M., et al., *Crosstalk between WIP and Rho family GTPases*. *Small GTPases*, 2018: p. 1-7.
231. Abdul-Manan, N., et al., *Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein*. *Nature*, 1999. **399**: p. 379.
232. Boczkowska, M., et al., *Structural analysis of the transitional state of Arp2/3 complex activation by two actin-bound WCAs*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3308.
233. Bieling, P., et al., *WH2 and proline-rich domains of WASP-family proteins collaborate to accelerate actin filament elongation*. *The EMBO Journal*: p. e201797039-n/a.
234. Molinie, N. and A. Gautreau, *WASP and WAVE Team Up at the Leading Edge*. *Developmental Cell*, 2016. **39**(2): p. 135-136.
235. Veltman, D.M., et al., *SCAR knockouts in *Dictyostelium*: WASP assumes SCAR's position and upstream regulators in pseudopods*. *The Journal of Cell Biology*, 2012. **198**(4): p. 501-508.
236. Lane, J., et al., *Structure and role of WASP and WAVE in Rho GTPase signalling in cancer*. *Cancer Genomics Proteomics*, 2014. **11**(3): p. 155-65.
237. Murk, K., et al., *The antagonistic modulation of Arp2/3 activity by N-WASP, WAVE2 and PICK1 defines dynamic changes in astrocyte morphology*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 17): p. 3873-83.
238. Rajasekharan, S., et al., *Netrin 1 and Dcc regulate oligodendrocyte process branching and membrane extension via Fyn and RhoA*. *Development*, 2009. **136**(3): p. 415-26.
239. Drukarch, B., et al., *Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **25**(2): p. 217-20.
240. Bjornsen, L.P., et al., *The GLT-1 (EAAT2; slc1a2) glutamate transporter is essential for glutamate homeostasis in the neocortex of the mouse*. *J Neurochem*, 2014. **128**(5): p. 641-9.
241. Lent, R., et al., *How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision*. *European Journal of Neuroscience*, 2012. **35**(1): p. 1-9.
242. Sloan, S.A. and B.A. Barres, *Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders*. *Curr Opin Neurobiol*, 2014. **27**: p. 75-81.
243. Meng, L., et al., *Regulation of neuronal axon specification by glia-neuron gap junctions in *C. elegans**. *Elife*, 2016. **5**.
244. Allen, N.J. and D.A. Lyons, *Glia as architects of central nervous system formation and function*. *Science*, 2018. **362**(6411): p. 181-185.
245. Zupanc, G.K.H. and S.C. Clint, *Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish*. *Glia*, 2003. **43**(1): p. 77-86.
246. Zupanc, G.K. and S.C. Clint, *Radial glia-mediated up-regulation of somatostatin in the regenerating adult fish brain*. *Neurosci Lett*, 2001. **309**(3): p. 149-52.
247. Fernandes, V.M., et al., *Glia relay differentiation cues to coordinate neuronal development in *Drosophila**. *Science*, 2017. **357**(6354): p. 886-891.
248. Van Horn, M.R. and E.S. Ruthazer, *Glial regulation of synapse maturation and stabilization in the developing nervous system*. *Curr Opin Neurobiol*, 2018. **54**: p. 113-119.

249. Tay, T.L., et al., *Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition*. J Physiol, 2017. **595**(6): p. 1929-1945.
250. Park, M.H., et al., *ERK-mediated production of neurotrophic factors by astrocytes promotes neuronal stem cell differentiation by erythropoietin*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(4): p. 1021-8.
251. Reemst, K., et al., *The Indispensable Roles of Microglia and Astrocytes during Brain Development*. Front Hum Neurosci, 2016. **10**: p. 566.
252. Allen, N.J. and C. Eroglu, *Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions*. Neuron, 2017. **96**(3): p. 697-708.
253. Van Horn, M.R. and E.S. Ruthazer, *Glial regulation of synapse maturation and stabilization in the developing nervous system*. Current Opinion in Neurobiology, 2019. **54**: p. 113-119.
254. Hasel, P., et al., *Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15132.
255. Allen, N.J., *Astrocyte Regulation of Synaptic Behavior*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2014. **30**(1): p. 439-463.
256. Bellesi, M., et al., *Effects of sleep and wake on astrocytes: clues from molecular and ultrastructural studies*. BMC Biology, 2015. **13**(1): p. 66.
257. Papouin, T., et al., *Septal Cholinergic Neuromodulation Tunes the Astrocyte-Dependent Gating of Hippocampal NMDA Receptors to Wakefulness*. Neuron, 2017. **94**(4): p. 840-854.e7.
258. Larsen, B.R., et al., *Contributions of the Na(+)/K(+)-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K(+) clearance and volume responses*. Glia, 2014. **62**(4): p. 608-22.
259. Rogers, J.T., et al., *CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity*. J Neurosci, 2011. **31**(45): p. 16241-50.
260. Araque, A., et al., *Gliotransmitters travel in time and space*. Neuron, 2014. **81**(4): p. 728-39.
261. Khakh, B.S. and K.D. McCarthy, *Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4): p. a020404.
262. Adamsky, A., et al., *Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement*. Cell, 2018. **174**(1): p. 59-71.e14.
263. Rice, R.A., et al., *Elimination of Microglia Improves Functional Outcomes Following Extensive Neuronal Loss in the Hippocampus*. J Neurosci, 2015. **35**(27): p. 9977-89.
264. Buffo, A., et al., *Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(9): p. 3581-3586.
265. Lindsey, B.W., et al., *The role of neuro-epithelial-like and radial-glia stem and progenitor cells in development, plasticity, and repair*. Progress in Neurobiology, 2018. **170**: p. 99-114.
266. Su, Z., et al., *In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3338.
267. Guo, Z., et al., *In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(2): p. 188-202.