

Der Einfluß der Ribosomale S6 Kinase 2 (RSK2) auf das Neuriten- und  
Synapsenwachstum *in vivo* und in Zellkultur

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Dr. Matthias Fischer  
aus Würzburg

Würzburg 2010

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskolloquiums:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. M. Heisenberg

Gutachter: Prof. Dr. M. Sendtner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Inhaltsverzeichnis**

<b><u>1. Einleitung</u></b>	9
<u>1. 1. Die Ribosomale S6 Kinase 2</u>	9
<u>1. 2. Das Coffin-Lowry-Syndrom</u>	14
<u>1. 3. Die Bedeutung von RSK2 für Lernen und Gedächtnis: RSK2-KO Mäuse und Expressionsanalysen</u>	17
<u>1. 4. Motorische Neurone und die neuromuskuläre Synapse bei Säugern</u>	20
<u>1. 5. RSK bei <i>Drosophila</i></u>	24
<u>1. 6. Fragestellung und Ziel der Arbeit</u>	28
<b><u>2. Materialien und Methoden</u></b>	29
<u>2. 1. Materialien</u>	29
<u>2. 1. 1. Versuchstiere</u>	29
<u>2. 1. 1. 1. RSK2-KO Mauslinie</u>	29
<u>2. 1. 1. 2. <i>Drosophila</i> Linien</u>	30
<u>2. 1. 2. Zelllinien</u>	30
<u>2. 1. 3. Bakterienstämme</u>	30
<u>2. 1. 4. Chemikalien und Enzyme</u>	30

<u>2. 1. 5. Puffer und Lösungen</u>	31
<u>2. 1. 6. Medien und Medienzusätze</u>	33
<u>2. 1. 7. Vektoren</u>	34
<u>2. 1. 8. Kits</u>	34
<u>2. 1. 9. Geräte</u>	34
<u>2. 1. 10. Erst-Antikörper</u>	36
<u>2. 1. 11. Zweit-Antikörper</u>	38
<u>2. 1. 13. Software</u>	38
<u>2. 1. 14. Statistik</u>	38
<u>2. 2. Methoden</u>	39
<u>2. 2. 1. DNA-Isolierung</u>	39
<u>2. 2. 2. DNA-Konzentrationsbestimmung</u>	39
<u>2. 2. 3. Gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren</u>	39
<u>2. 2. 4. Plasmidtransformation</u>	39
<u>2. 2. 5. Proteinextraktion</u>	40
<u>2. 2. 6. Proteinkonzentrationsbestimmung</u>	40
<u>2. 2. 7. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western blot</u>	40
<u>2. 2. 8. Anlegen von Primärkulturen embryonaler Motoneurone</u>	41

<u>2. 2. 9. PC12 Zellkultur und Differenzierung</u>	42
<u>2. 2. 10. Eukaryonten-Zellkultur</u>	43
<u>2. 2. 11. Hippocampuspräparation und Anfertigung von Vibratomschnitten</u>	43
<u>2. 2. 12. Herstellung der rekombinanten Vektor-Plasmide</u>	43
<u>2. 2. 13. Herstellung von Lentiviren</u>	44
<u>2. 2. 14. Sequenzierung</u>	45
<u>2. 2. 15. Präadsorption</u>	45
<u>2. 2. 16. Immunzytochemische Färbungen</u>	45
<u>2. 2. 17. Immunhistochemische Färbungen</u>	46
<u>2. 2. 17. 1. Immunhistochemie Hippocampus</u>	46
<u>2. 2. 17. 2. Präparation und Färbung und Mikroskopie an der motorischen Endplatte</u>	46
<u>2. 2. 17. 3. Präparation und Färbung des Nervus Phrenicus</u>	47
<u>2. 2. 17. 4. Färbung und Auszählung der Motoneurone im lumbalen Rückenmark</u>	47
<u>2. 2. 18. Calcium Imaging</u>	48
<u>2. 2. 19. Haltung und Genotypisierung der RSK2-KO Linie</u>	48
<u>2. 2. 20. Immunhistochemie der neuromuskulären Synapse bei <i>Drosophila</i> Larven</u>	49

<u>2. 2. 21. Testung der Motorik und Koordination bei Mäusen</u>	49
<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	50
<u>3. 1. Lokalisation von Rsk2 im Hippocampus der Maus</u>	50
<u>3. 1. 1. Spezifitätskontrolle</u>	52
<u>3. 1. 2. Doppelfärbungen mit Prä- und Postsynaptischen Markern</u>	53
<u>3. 2. Untersuchungen an Motoneuronen der Maus</u>	56
<u>3. 2. 1. Überleben von Motoneuronen von RSK2-KO Mäusen <i>in vitro</i></u>	57
<u>3. 2. 2. Überleben der Motoneurone <i>in vivo</i></u>	58
<u>3. 2. 3. Axonwachstum <i>in vitro</i> bei Motoneuronen von RSK2-KO Mäusen</u>	59
<u>3. 2. 4. Die neuromuskuläre Synapse <i>in vivo</i></u>	62
<u>3. 2. 5. Überleben und Neuritenwachstum von Virus-transfizierten Motoneuronen <i>in vitro</i></u>	64
<u>3. 2. 5. 1. Herstellung der Lentiviren</u>	64
<u>3. 2. 5. 2. Kultur infizierter Motoneurone</u>	65
<u>3. 2. 6. Lokalisation von RSK2 in kultivierten Motoneuronen</u>	67
<u>3. 2. 7. Höhere ERK-Phosphorylierung im embryonalen Rückenmark von RSK2-KO Mäusen</u>	69
<u>3. 2. 8. Höhere ERK- und AKT-Phosphorylierung in RSK2-KO</u>	70

## Motoneuronen *in vitro*

<u>3. 2. 9. Der Mek-Inhibitor U0126 reduziert das überschießende Axonwachstum von RSK2-KO Motoneuronen</u>	72
<u>3. 2. 10. Spontane Erregbarkeit von kultivierten Motoneuronen</u>	73
<u>3. 2. 11. Immunzytochemie im Wachstumskegel von Motoneuronen</u>	75
<u>3. 2. 12. Merosin hemmt das Axonwachstum auch bei RSK2-KO Motoneuronen</u>	75
<u>3. 3. Koordination und Muskelkraft bei RSK2-KO Mäusen</u>	78
<u>3. 4. Der Einfluß von RSK2 auf das Neuritenwachstum bei PC12-Zellen</u>	79
<u>3. 5. Die Bedeutung von RSK für die neuromuskuläre Synapse bei <i>Drosophila melanogaster</i></u>	83
<u>3. 5. 1. Größe der neuromuskulären Synapse</u>	83
<u>3. 5. 2. Rettung der Bouton-Zahl</u>	84
<u>3. 5. 3. Überexpression von RSK</u>	86
<u>3. 5. 4. Durchschnittliche Anzahl an Synapsen in den Boutons</u>	88
<u>3. 5. 5. Die Lokalisation von RSK an der neuromuskulären Synapse</u>	89
<u>3. 5. 6. RSK vermindert die Bouton-Zahl durch Inhibierung von ERK</u>	91
<b><u>4. Diskussion</u></b>	94
<u>4. 1. Diskussion der Ergebnisse der Immunhistochemie im Hippocampus</u>	95

<u>4. 2. Diskussion der Ergebnisse der Motoneuron- und PC12-Zell Experimente <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i></u>	98
<u>4. 3. Diskussion der Experimente an der neuromuskulären Synapse von <i>Drosophila</i></u>	110
<u>4. 4. Ausblick</u>	113
<b><u>5. Zusammenfassung</u></b>	115
<b><u>6. Summary</u></b>	117
<b><u>7. Referenzen</u></b>	119
<b><u>8. Anhang</u></b>	138
<b>Abkürzungen</b>	138
<b>Erklärung</b>	141
<b>Danksagung</b>	143
<b>Publikationen</b>	144

## 1. Einleitung

### 1. 1. Die Ribosomale S6 Kinase 2

Die Ribosomale S6 Kinase 2 (RSK2) ist eine Ser/Thr Kinase und gehört zur Familie der RSKs, die beim Menschen sowie bei der Maus jeweils vier Mitglieder umfaßt (RSK1-4; Anjum 2008, Frödin 1999, Hauge 2006). Auf der Ebene der Aminosäuren besteht unter ihnen eine Sequenzübereinstimmung von 75-80%. RSKs wurden bei weiteren Organismen beschrieben und kloniert: Beim Huhn, der Ratte, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* (Alcorta 1989, Grove 1993, Wassarman 1994), nicht jedoch in der Hefe oder bei Pflanzen. Entdeckt wurde RSK 1985 in *Xenopus laevis* Oozyten als intrazelluläre Kinase, die *in vitro* die 40 S ribosomale Untereinheit S6 phosphoryliert und wegen des Molekulargewichts von 90 kDa als p90 RSK bezeichnet wird (Erikson 1985). Die Phosphorylierung des S6 Proteins soll die Translation bestimmter mRNAs, die für das Wachstum von Zellen von Bedeutung sind, steigern. Später stellte sich heraus, daß die S6 Phosphorylierung *in vivo* hauptsächlich durch eine andere Kinase, nämlich die p70 S6K erfolgt, von der es zwei Formen (S6K1 und S6K2) gibt (von Manteuffel 1997, Banerjee 1990). Die p70 S6K unterscheidet sich von RSK dadurch, daß sie nur eine zu RSK homologe N-terminale, jedoch keine C-terminale Kinase-Domäne besitzt. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, daß auch p90 RSK *in vivo* das S6 Protein phosphoryliert (Roux 2007). Insgesamt sind bislang wenige isoform-spezifische Funktionen für RSK1-4 bekannt.

Das Besondere an den RSKs ist das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Kinase-Domänen: Einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, verbunden durch eine Linker-Region (Abb. 1). Die N-terminale Kinase Domäne ist homolog zu den Kinasen der AGC Familie (z.B. PKA, PKC) und für die Phosphorylierung der Substrate verantwortlich. Die C-terminale Domäne ist homolog zu den Calcium/Calmodulin abhängigen Kinasen (CamK) und normalerweise autoinhibitorisch für die N-terminale Domäne. Eine ERK Bindungs-Domäne (D-Domäne) am C-terminalen Ende erlaubt die Bindung von ERK1 und ERK2 und die Aktivierung der C-terminalen Domäne von RSK durch diese Kinasen. Auch ERK5 aktiviert RSK und bindet an die gleiche D-Domäne (Ranganathan 2006). Ausschließlich bei RSK3 befindet sich am N-Terminus eine Kern-Lokalisierungs-

Sequenz (Zhao 1995). Die sechs bekannten Phosphorylierungsstellen sind in allen RSK Isoformen konserviert (Abb. 1).

Die Aktivierung von RSK erfolgt über mehrere Schritte. Thr573 in der C-terminalen Domäne wird durch ERK phosphoryliert. Dazu muß ERK1/2 oder ERK5 an die D-Domäne binden. Ser380 in der Verbindungsregion wird durch die C-terminale Domäne phosphoryliert wodurch eine Bindungsstelle für die Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1) geschaffen wird. Diese Kinase kann erst nach Bindung voll aktiv werden und Ser221 in der N-terminalen Domäne phosphorylieren. Dies führt zur vollständigen Aktivierung der N-terminalen Domäne, welche dann die Substrate aktivieren kann. Die einzige bekannte Phosphatase, die die Aktivität speziell von RSK2 reduziert, ist die Protein Phosphatase-2Cδ (Doehn 2004).

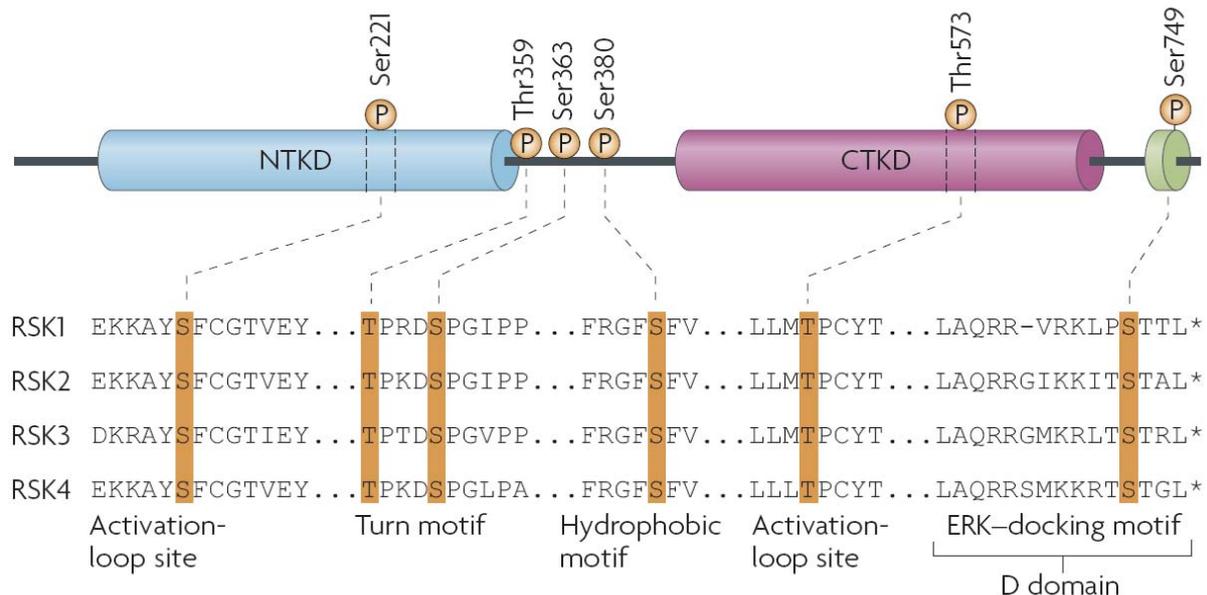


Abb. 1: Dargestellt ist die Domänenstruktur der RSKs. Die N-terminale und C-terminale Domäne sind durch eine Linker-Region verbunden. Die Aktivierung der RSKs erfolgt durch Phosphorylierung an sechs Phosphorylierungsstellen. Am C-Terminus befindet sich eine ERK-Bindungsdomäne (D-Domäne). Aus Anjum, 2008.

Strukturell und funktionell ähnlich den RSKs sind die MSKs (Mitogen and Stress activated Kinase; MSK1 und 2), welche ebenfalls 2 Kinase-Domänen besitzen. RSKs werden von ERK 1/2 und ERK 5 durch Phosphorylierung nach extrazellulärer

Stimulierung durch Wachstumshormone, Neurotransmitter, Chemokine und andere Stimuli aktiviert (Ranganathan 2006; Abb. 2). Die Ligandenbindung an den Zelloberflächenrezeptor führt z.B. im Fall der Neurotrophine zur einer Tyr-Autophosphorylierung und Bindung von Adapter-Molekülen wie Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), welche das Signal über SOS (son of sevenless) an RAS weitergeben. Über RAF und MEK wird dann die MAPK ERK aktiviert. Die Aktivierung von ERK führte in allen gemessenen Fällen auch zu einer Aktivierung von RSK. Dies kommt unter anderem daher, daß beide Proteine in der Zelle aneinander gebunden vorliegen (Scimeca 1992). In *Xenopus* Oocyten lagen 50% der ERK2 Proteine mit RSK in einem Komplex vor (Hsiao 1994). Damit führt RSK die RAS-RAF-MEK-ERK Signaltransduktionskaskade mit zwei weiteren Schritten in Form der C-terminalen und N-terminalen Kinase-Domäne fort (Abb. 2). Weiterhin werden RSKs durch die p38 MAPK aktiviert (Zaru 2007).

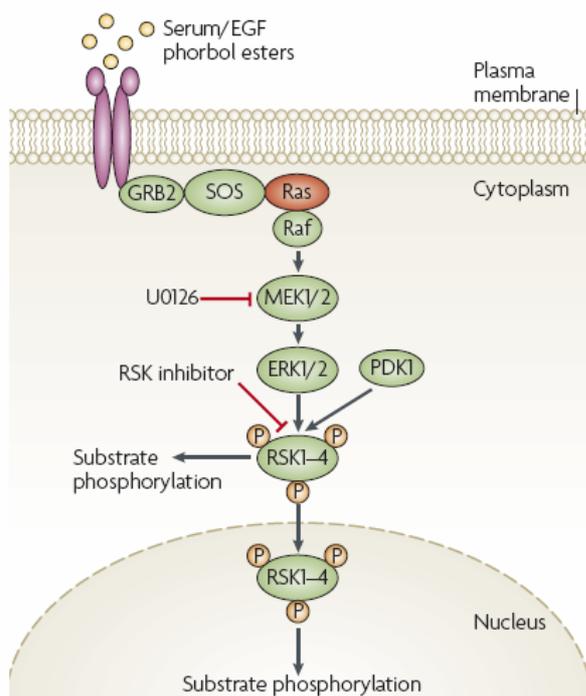


Abb. 2: Schematische Darstellung der RSK-Aktivierung. RSK wird durch ERK und auch PDK1 aktiviert. U0126 ist ein MEK-Inhibitor. Aus Anjum, 2008.

RSKs befinden sich in verschiedenen zellulären Kompartimenten wie dem Zytosol, dem Zellkern oder an der Plasmamembran. Die Gabe von Wachstumsfaktoren zu HeLa Zellen führte zur Aktivierung von RSK sowohl im Zytosol als auch im Zellkern. Ein Teil des zytosolischen RSK wanderte nach Aktivierung in den Zellkern (Chen 1992, Zaho 1995). Eine Großteil von RSK wird an der Plasmamembran aktiviert. Die

Anwesenheit an der Plasmamembran führt auch zur Aktivierung ohne die Einwirkung von ERK (Anjum 2008), wobei der Grund dafür nicht klar ist.

*RSK1-3* mRNA wird in allen bisher angeschauten Geweben exprimiert, wobei es jedoch Gewebe-spezifische Variationen im Expressions-Niveau gibt. *RSK1* mRNA wird hauptsächlich in Niere, Lunge und Pankreas, *RSK2* und *RSK3* mRNA hauptsächlich im Skelettmuskel, Herz und Pankreas exprimiert (Anjum 2008). Zur Gehirn-spezifischen Expression siehe unter 1. 3.

RSKs spielen eine Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus, der Proliferation und Apoptose, der Differenzierung von Zellen, der Transkription, Translation, der synaptischen Plastizität und des Dopaminstoffwechsels im Gehirn (Anjum 2008, Pereira 2008). Nukleäre Substrate von RSK sind u. a. die Transkriptionsfaktoren CREB, ATF4 (CREB-2), SRF, NF- $\kappa$ B, NFATc4, und NFAT3, sowie IE (immediate early) Genprodukte wie c-Fos, c-Jun und Nur77, außerdem Histone. GSK3 $\beta$  und das proapoptotische Protein BAD werden im Zytosol von RSK phosphoryliert. RSK2 spezifische Substrate sind CREB, p53 (Cho 2005) und Histon H3. Die Phosphorylierung von Histon H3 soll dessen Acetylierung und damit die Dekondensierung und Transkribierung des Chromatins verstärken (Hanauer 2002). Es konnte aber gezeigt werden, daß nicht RSK2 sondern die MSKs die hauptsächlichsten Kinasen für Histon H3 in Fibroblasten sind. Die H3-Phosphorylierung war in Fibroblasten von CLS Patienten normal (Soloaga 2003). Bei den anderen genannten Substraten wurde keine Unterscheidung zwischen den RSK Isoformen gemacht oder es waren mehrere RSK Isoformen gleichermaßen Substrat-spezifisch.

Über die Regulation der Translation durch RSK war schon länger bekannt, daß aktiviertes RSK1 und 2 in hippocampalen Zellen nach Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren zu Polyribosomen wandert und die Phosphorylierung von Ribosomen-assoziierten Proteinen stimuliert (Angenstein 1998). In letzter Zeit kamen mehr und mehr Indizien dazu, die für eine Regulation der Translation durch RSK sprechen, nachdem zuvor hauptsächlich der Einfluß der p70 S6 Kinase bekannt war: RSK phosphoryliert den Translations-Initiationsfaktor eIF4B *in vivo* und *in vitro* wodurch die Translationsrate erhöht wird (Shabazian 2006). Außerdem führt RSK

über die Phosphorylierung von TSC2 zu verstärkter mTOR-Aktivität und damit zu erhöhter Translation (Roux 2004). Weiterhin wurde inzwischen auch ein positiver Einfluß auf die Translation durch RSK über die Phosphorylierung des S6 Proteins gezeigt (Roux 2007). Ein weiterer Mechanismus, der wiederum zu verstärkter Translation führt läuft über die Phosphorylierung und Inhibition von GSK3 $\beta$  (Cohen 2001).

RSK wirkt positiv auf das Überleben von Zellen durch die Phosphorylierung von BAD, wodurch seine Bindung an 14-3-3 Protein verstärkt wird, was dazu führt, daß BAD nicht mehr die überlebensfördernde Funktion von BCL-x<sub>L</sub> hemmen kann (Bonni 1999). Der selbe überlebensfördernde Effekt wird durch Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins DAPK (Death-associated protein kinase) durch RSK1 und RSK2 erreicht (Anjum 2005). Ein anderer Weg auf das Überleben einzuwirken läuft über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren: Es konnte gezeigt werden, daß die CREB-Phosphorylierung durch RSK2 das Überleben von primären corticalen Neuronen erhöht. Dies erfolgt über die verstärkte Transkription von BCL2 Familienmitgliedern als auch von BDNF (Bonni 1999, Ginty 1994, Xing 1996). Eine Funktionen von RSK beim Axonwachstum betrifft die Phosphorylierung des Zell-Adhäsionsmoleküls L1. L1 ist von Bedeutung für die Zielführung beim Axonwachstum. In PC12-Zellen konnte durch Hemmung der L1 Phosphorylierung an der Stelle, an der RSK das Molekül phosphoryliert, das Neuritenwachstum gehemmt werden (Wong 1996).

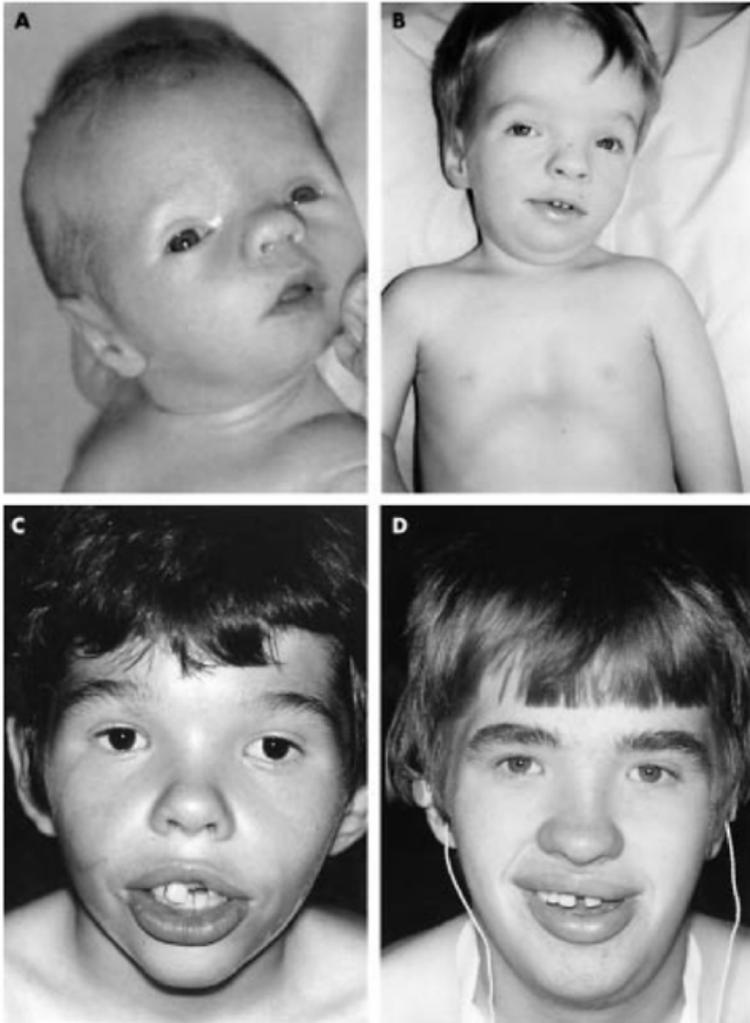
Mehrere Veröffentlichungen machten einen Einfluß von RSK auf Tumorwachstum und -entstehung deutlich: In Brust- und Prostata Tumoren sind RSK1 und 2 vermehrt exprimiert (Clark 2005, Smith 2005). RSK2 abhängige c-fos Phosphorylierung spielt eine Rolle bei der Bildung von Osteosarcomen in der Maus (David 2005). RSK2 beeinflusst das Überleben von humanen Myeloma-Zellen (Kang 2007). RSK3 ist beim Ovarial-Carcinom ein Tumorsuppressor (Bignone 2007).

Mittlerweile stehen auch mehrere RSK-Inhibitoren zur Verfügung: SL0101 z. B. hemmt die Proliferation von humanen Brustkrebs-Zellen (Clark 2005). Fmk, spezifisch für die C-terminale Domäne und BI-D1870, spezifisch für die N-terminale Domäne, sind weitere RSK Inhibitoren (Cohen 2005, Sapkota 2007).

Eine neuere Veröffentlichung gibt Hinweise für einen möglichen Effekt von RSK2 auf die synaptische Übertragung, wodurch die kognitiven Einbußen bei CLS-Patienten erklärt werden könnten, so die Autoren (Zeniou-Meyer 2008). Die Phospholipase D spielt eine Rolle bei der Membranfusion von Vesikeln in Chromaffin-Zellen und Neuronen und wird durch RSK2 phosphoryliert. Der Exozytose-Prozess wird z.B. durch siRNA knock-down von RSK2 negativ beeinflusst. Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von RSK2 an der Synapse gibt eine Untersuchung an corticalen Neuronen, die eine Bedeutung des PDZ [postsynaptic density fraction (PSD)95/discs large/ZO-1]-Liganden in der C-terminalen Domäne von RSK2 für die AMPA-Rezeptor abhängige mEPSC (miniature evoked postsynaptic current) Frequenz zeigt (Thomas 2005). Zwei neuere Publikationen zeigen eine Interaktion von RSK2 mit dem Serotonin-Rezeptor 5-HT2A. RSK2 phosphoryliert den 5-HT2A-Rezeptor und hemmt die 5-HT2A-Rezeptor abhängige ERK-Phosphorylierung (Sheffler 2006, Strachan 2008). Eine weitere Isoform-spezifische Funktion: Bei PC12-Zellen führt RSK1 zur Differenzierung ohne Zugabe von NGF wogegen RSK2 dafür nicht hinreichend ist (Silverman 2004).

## 1. 2. Das Coffin-Lowry-Syndrom

Das Coffin-Lowry Syndrom (CLS) ist eine X-Chromosomal gebunden vererbte Form syndromaler geistiger Behinderung, welche durch Mutationen im humanen *RSK2*-Gen verursacht ist (Hanauer 2002, Hunter 2002). Es wurde unabhängig voneinander zuerst beschrieben von Coffin (1966) und Lowry (1971). „Syndromal“ bedeutet in diesem Zusammenhang, daß außer der geistigen Behinderung noch andere, körperliche Krankheitssymptome bestehen. Im Fall des CLS sind dies vor allem Defekte im Knochenwachstum. Wegen der Lage des *RSK2*-Gens auf dem X-Chromosom sind die hemizygoten männlichen Patienten wesentlich schwerer betroffen als die heterozygoten weiblichen Patienten. In über 80% der Fälle tritt die Erkrankung sporadisch auf.



*Abb. 3: Vier männliche CLS-Patienten mit der typischen Facies. Aus Hanauer, 2002.*

Die geistige Behinderung ist bei männlichen Patienten grundsätzlich als schwer einzustufen, während bei weiblichen Patienten das Spektrum von völlig normalem IQ über mittlere bis zu schwerer geistiger Behinderung reicht. In einer Studie von Simensen war der durchschnittliche IQ bei männlichen Betroffenen 43,2, bei weiblichen Patienten 65,0 und bei normalen Kontrollen 90,8. In einer Testung des Kurzzeitgedächtnisses zeigte sich eine Schädigung schon bei heterozygoten Gen-Trägerinnen und eine noch stärkere Schädigung bei Betroffenen mit vollem Krankheitsbild (Simensen 2002). Es zeigte sich bei weiblichen Gen-Trägerinnen ein im Vergleich zur Normalbevölkerung häufigeres Auftreten von psychiatrischen Krankheitsbildern wie schizophrenen Psychosen oder Depression (Collacott 1987, Sivagamasundari 1994). Neurologische bzw. motorische Auffälligkeiten sind Krampfanfälle, angeborene generalisierte Hypotonie, Sturzattacken, Unterentwicklung der Muskeln und Schwerhörigkeit (Coffin 2003, Hanauer 2002, Ronce 1999, Touraine 2002, Trivier 1996). Außerdem gibt es Berichte über

Paraplegie, neurogene Veränderungen in der Muskelbiopsie (Temtamy 1957) und Reduktion von Amplitude und Leitgeschwindigkeit in der elektrophysiologischen Untersuchung des Nervus peronäus und Nervus tibialis posterior (Vine 1986). Am auffälligsten sind jedoch die Abnormalitäten des Skeletts: Männliche erwachsene Patienten sind im Durchschnitt 1,43 m groß. Grobe Gesichtszüge, Hypertelorismus, breite Nase und dicke Lippen kennzeichnen die Facies (siehe Abb 3). Häufig vorkommend sind außerdem Kyphoskoliose, kurze, distal spitz zulaufende Finger und eine Vierfingerfurche sowie Fehlfunktionen der Mitralklappe des Herzens. Weibliche CLS Patienten leben bis ins hohe Alter wogegen männliche früher versterben. Es gibt Berichte über männliche Patienten in den 30ern. Detaillierte Informationen gibt es hierzu nicht.

Mutationen im *RSK2*-Gen sind ursächlich für die Erkrankung verantwortlich. Dies wurde zuerst 1996 gezeigt (Trivier 1996). Das humane *RSK2*-Gen liegt auf dem X-Chromosom in der Region Xp22.2, hat 22 Exone und kodiert für ein Protein mit 740 Aminosäuren. Es wurden verschiedenste Mutationen in allen Exonen, bis auf Exon 1 und 2, von Missense- über Nonsense-Mutationen bis zu kleineren Deletionen und Insertionen gefunden. Zahlreiche Missense-Mutationen führen zu Aminosäureaustauschen in der Nähe von Phosphorylierungsstellen. Andere Mutationen verursachen einen verfrühten Translationsstop, was in der Mehrzahl der Fälle zu einem nicht funktionsfähigen Protein führt. Interessanterweise wurde kein Zusammenhang zwischen spezifischen Mutationen und der Schwere oder der Art und Weise der Ausprägung der Erkrankung entdeckt. Allerdings zeigte sich eine Tendenz zu leichterem Krankheitsausprägung im Falle von Missensmutationen im Vergleich zu Mutationen die zu einem trunkierten Protein führen, was darauf schließen läßt, daß Restfunktionen veränderter RSK-Proteine von Bedeutung sein mögen (Hanauer 2002).

Wie ein Funktionsverlust des *RSK2*-Proteins zu intellektuellen Einschränkungen führt ist nicht klar. Auf der makroskopischen Ebene zeigen sich keine Auffälligkeiten des Gehirns bis auf gelegentlich vorkommende Ventrikelvergrößerungen. Man vermutet eine Schädigung synaptischer Plastizität, da die ERK/MAPK Signalkaskade eine Rolle bei Lernen und Gedächtnis spielt (Atkins 1998) und auch CREB, welches von *RSK2* aktiviert wird, eine Rolle insbesondere bei der Ausbildung des

Langzeitgedächtnisses spielt (Silva 1998). Fibroblasten von CLS Patienten zeigen eine verminderte CREB Phosphorylierung nach EGF Stimulation. Harum et al. (2001) fanden sogar eine Beziehung zwischen der Phosphorylierung des synthetischen CREB-like Peptids durch RSK2 aus Fibroblasten und Lymphoblasten von CLS Patienten nach Stimulation durch PMA und dem Intelligenzquotienten der Patienten.

Während die beiden anderen Mitglieder der RSK Familie RSK1 und 3 nicht mit einer Krankheit in Verbindung gebracht werden gibt es Hinweise, daß Mutationen im RSK4-Gen zu geistiger Behinderung führen (Yntema 1999).

### 1. 3. Die Bedeutung von RSK2 für Lernen und Gedächtnis: RSK2-KO Mäuse und Expressionsanalysen

Zwei unabhängige KO-Mausstämme für RSK2 wurden einer Verhaltensanalyse unterzogen. In beiden Linien zeigten sich Auffälligkeiten im Lernen. Dufresne (2001) unterzog die Mäuse einer vereinfachten Version des Morris water-maze-Tests. Zehn Wochen alte RSK2-KO Mäuse wurden in ein Becken mit Wasser gesetzt und mußten eine unsichtbare Plattform finden. Es wurde einfach die Zeit bis zum Auffinden der Plattform gemessen, wobei das Experiment drei mal wiederholt wurde, so daß die Autoren die Latenz bis zum Auffinden der Plattform als Maß des Lernens betrachteten. RSK2-KO Mäuse benötigten ca. sieben mal so lange wie WT Mäuse. Die Koordination wurde mit dem rotarod, einem sich drehenden Rad, getestet. 20 Wochen alte RSK2-KO Mäuse hatten Koordinationsschwierigkeiten, was sich daran zeigte, daß sie seltener bis zum Ende des Test auf dem Rad verblieben weil sie herunterfielen. Die gestörte Koordination stellt jedoch die Ergebnisse im Lerntest in Frage, da auch eine Koordinationsstörung die Latenz bis zum Auffinden der Plattform verlängert, unabhängig von der Erinnerung, wo die Plattform war. Die RSK2-KO Mäuse waren 14 % kürzer und wogen 10 % weniger als die WT Mäuse. Weitere Experimente bezüglich des Nervensystems wurden mit diesen Mäusen nicht gemacht, da die Linie ausstarb (persönliche Mitteilung Christian Bjorbaek).

Eine wesentlich detailliertere Verhaltensanalyse wurde mit einer anderen RSK2-KO Maus-Linie im Labor von A. Hanauer (Straßburg; Poirier 2007) in Zusammenarbeit mit dem Labor von H.P. Lipp in Zürich gemacht. Diese Linie wurde in dieser

Promotionsarbeit verwendet und war erstmals von Yang (2004) veröffentlicht worden. Die Mutante sei eine Null-Mutante mit normaler Expression von RSK1 und RSK3. Im Western-blot wurde gezeigt, daß das RSK2-Protein nicht mehr vorhanden ist. Der Knock-out wurde im C57BL/6 Hintergrund mit Hilfe eines Vektors mit einer Neomycin-Kassette mit drei anschließenden Stop-Kodons in unterschiedlichen Leserastern in Exon 2 hergestellt. Die Mäuse hatten eine normale Lebenserwartung und waren leichter, dies jedoch nicht signifikant. Sie waren auch nicht kürzer als die WT Mäuse. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dufresne waren bei diesen Mäusen keine Auffälligkeiten in der Muskelkraft oder Koordination zu finden. Im „8-arms radial maze“, einem Test des Arbeitsgedächtnisses, zeigten die KO Mäuse einen leichten Defekt. Im „Morris water-maze“ zur Messung des räumlichen Gedächtnisses benötigten sie eine längere Zeit zur Erlernung der korrekten Plattform-Lokalisation und hatten einen Langzeitgedächtnis-Defekt nach neun Tagen. Keine Auffälligkeiten gab es dafür in mehreren anderen Lern-Paradigmen wie dem Objekt-Erkennungs-Paradigma (Object recognition) und dem Geschmacks-Vermeidungs-Paradigma (taste-aversion).

Interessanterweise gab es noch einige Hinweise auf eine erhöhte spontane Aktivität bzw. geringere Ängstlichkeit. Zwar war das Explorations-Verhalten im freien Arena (open-field) Test normal, die KO Mäuse zeigten jedoch häufigere plötzliche Beschleunigungen (darting-Verhalten) beim Laufen. Auch waren sie im O-Labyrinth (O-maze) und einem Test, bei dem das Verlassen eines sicheren Unterschlupfes gemessen wird, mutiger.

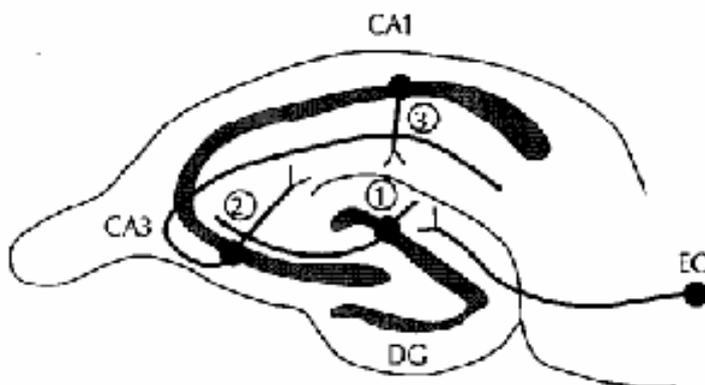


Abb. 4: Der Tri-Synaptische Aufbau des Hippocampus. Querschnitt durch die Hippocampus-Formation. EC=Entorhinaler Kortex; DG=Gyrus Dentatus. Der Tractus

*perforans* läuft vom Entorhinalen Kortex zu 1. Die Moosfasern laufen von 1 zu 2, die Schaffer-Kollateralen von 2 zu 3. Aus Amaral, 1993.

RSK2 scheint also auch bei Mäusen eine Bedeutung für die Kognition zu haben. Ähnlich wie bei CLS-Patienten liegen Gedächtnisstörungen vor. In der Tat ist die *RSK2* RNA im Hippocampus der Maus exprimiert. Der Hippocampus ist bei Säugern die wichtigste Gedächtnisregion im Gehirn (Kandel 2000) und besteht aus dem Gyrus dentatus und den Regionen CA1 (cornu ammonis, Ammonshorn), CA2 und CA3. Diese Regionen mit unterschiedlichen Aufgaben in der Gedächtnisverarbeitung werden durch Faserbündel verbunden. Der Tractus perforans ist die Eintrittspforte in den Gyrus dentatus und damit in den Hippocampus. Von dort läuft das Moosfaserbündel, das aus Axonen der Gyrus Dentatus Körnerzellen besteht, zur CA3 Region, von wo aus die Schaffer-Kollateralen (Axone der Pyramidenzellen) zur CA1 Region laufen.

Die Synapsen in den drei genannten Regionen haben die Fähigkeit zu LTP (Langzeitpotenzierung). Dies ist ein neurophysiologischer Mechanismus, den man als Grundlage der Bildung von Gedächtnisspuren im Gehirn betrachtet. LTP tritt z.B. bei künstlicher Reizung einer Nervenbahn mit hochfrequenten elektrischen Impulsen als eine Zunahme der synaptischen Übertragungsstärke auf. RSK2 könnte über die Beeinflussung der Langzeitpotenzierung z.B. im Hippocampus eine Rolle bei der Ausbildung des Gedächtnisses spielen.

*In situ* Hybridisierungen im Gehirn von acht Wochen alten CD-1 Mäusen zeigten insgesamt eine niedrige *RSK2* Expression in den meisten Arealen, jedoch eine deutliche Expression im Hippocampus, v.a. in der CA3 Region (Zeniou 2002). Im Kleinhirn war die Expression in den Purkinje Zellen und in einigen Kerngebieten deutlich vorhanden. Außerdem war die RNA im Neokortex und dem piriformen Kortex zu finden. Die *RSK1* RNA Expression war im Gehirn durchgehend sehr niedrig. Die *RSK3* RNA war insgesamt am stärksten im gesamten Gehirn vertreten, so im gesamten cerebralen Kortex, der lateralen Amygdala und im Nucleus accumbens. Im Hippocampus war die *RSK3* RNA in den Körnerzellen des Gyrus dentatus zu finden. Mit einem N-terminalen polyklonalen Ak gegen RSK2 wurde auch das RSK2-Protein in den Purkinje Zellen des Kleinhirns und in der CA1-CA3 Region des Hippocampus

nachgewiesen. Vom Hippocampus liegen dafür jedoch keine Abbildungen vor, das Ergebnis wird nur im Text mitgeteilt. Spezifitätskontrollen gibt es nicht. Die Autoren schließen aus dem Expressionsmuster von RSK2 auf eine Bedeutung für die synaptische Übertragung und die Ausbildung von Lernen und Gedächtnis. In der selben Arbeit von Zeniou wurden auch Northern blots von adultem humanem Hirngewebe gemacht. Dort war die *RSK2* RNA am stärksten im Kleinhirn, dem Occipital-Pol und dem Frontal-Lobus exprimiert.

RSK2-KO Mäuse sollen einen circadianen Rhythmus Phänotyp haben: Der Tages-Rhythmus ohne äußere Zeitgeber dauert länger (Poster neuroscience-meeting, Butcher 2006). Neuerdings wurde im Gehirn von RSK2-KO Mäusen ein erhöhter Dopamin Gehalt mittels HPLC gefunden, bei 5-HT (Serotonin) bestand eine Tendenz zu Erhöhung im KO. Außerdem waren der Dopamin Rezeptor 2 und der Dopamin Transporter überexprimiert. Zudem wurde eine erhöhte Expression von ERK1/2 und auch p-ERK gefunden (Marques Pereira 2008).

KO Mäuse für die p70 S6 Kinasen S6K1 und S6K2 haben ebenfalls Defizite im Lernen in der Angstkonditionierung und im „Morris Water Maze“ (Antion 2008).

#### 1. 4. Motorische Neurone und die neuromuskuläre Synapse bei Säugern

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung peripherer Neurone, also motorischer Neurone, die die Muskeln versorgen, und der neuromuskulären Synapse. An der neuromuskulären Synapse wurden anatomische und funktionelle Untersuchungen durchgeführt als es noch nicht möglich war dies an den kleineren und schwerer zugänglichen zentralen Synapsen zu tun (Sendtner 1998). Das besondere an Motoneuronen im Vergleich zu zentralen Neuronen ist außerdem die teilweise extreme Länge der Axone, die z.B. von der Wirbelsäule ununterbrochen bis zu den Zehen laufen. Damit sind z.B. besondere Anforderungen an den axonalen Transport gestellt. Die Zellkörper der Motoneuronen liegen im Vorderhorn des Rückenmarks in verschiedenen Ebenen, je nachdem, welche Muskeln von ihnen versorgt werden (Kandel 2000). Verschiedene großteils genetisch bedingte Krankheiten beim Menschen können die Motoneurone schädigen, so die spinale Muskelatrophie (SMA) oder amyotrophe Lateralsklerose (ALS). Diese Krankheiten

führen zu Lähmungen der Muskulatur z.B. der Arme und Beine aber auch der Atemmuskulatur, was häufig zum Tode führt. Als molekulare Ursache für die Degeneration von Motoneuronen wird z.B. eine Dysfunktion der Wirkung der neurotrophen Faktoren, ihrer Rezeptoren und intrazellulären Signalwege betrachtet. Neurotrophe Faktoren sind Proteine, die über die Bindung an spezifische Rezeptoren für das Überleben von Neuronen sorgen. Das funktioniert wie z.B. in Abb 3 dargestellt über die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, zu denen unter anderem auch die RSKs gehören.

Neurotrophine werden z.B. von Zielgeweben wie Muskeln sezerniert. Während der Embryonalentwicklung der Maus werden wesentlich mehr Neurone angelegt als später benötigt werden. Das selektive Vorhandensein von Neurotrophinen führt dann zum Überleben einer Untergruppe von Motoneuronen und zum Absterben nicht benötigter Motoneurone. Mehrere neurotrophe Faktoren wurden z.B. in Zellkulturen u.a. von isolierten Motoneuronen untersucht und entdeckt (Sendtner 1998). Der erste entdeckte neurotrophe Faktor war der Nerve Growth Factor (NGF) (Levi-Montalcini 1954). Weitere neurotrophe Faktoren sind Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin 3 (NT-3) und Neurotrophin 4/5, welche auch das Überleben von Motoneuronen fördern (Sendtner 2000). Weitere neurotrophe Faktoren, die nicht zu der Neurotrophin-Klasse gehören sind z.B. Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) und Glial Cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Kandel 2000). NGF bindet an den Rezeptor Tropomyosin related kinase Receptor A (TrkA), BDNF (Barde 1982) und NT-4/5 an TrkB. Ein weiterer Rezeptor für diese Neurotrophine ist p75<sup>NTR</sup>, welcher mit dem Trk Rezeptor einen Komplex bildet und seine Signaltransduktion moduliert. Die Trk Rezeptoren geben das Signal durch Dimerisierung und Autophosphorylierung an die nachgeschaltete Signalkaskade weiter, was letztendlich zu einer veränderten Genexpression führt aber auch direktere Effekte z.B. auf die neuronale Erregbarkeit und die synaptische Übertragung hat.

Teil der intrazellulären Signalkaskade der Neurotrophin-Rezeptoren ist RSK. In kultivierten corticalen Neuronen wird RSK nach BDNF-Stimulation verstärkt phosphoryliert. In PC12 Zellen führt die Behandlung mit NGF zur Phosphorylierung von RSK (Rakhit 2004). Neurotrophine werden am Axon-Terminus internalisiert und retrograd zusammen mit dem Trk Rezeptor durch das Axon zum Zellkörper

transportiert. Sie werden aber auch anterograd transportiert und wie Neurotransmitter am Axon-Terminus sezerniert (Poo 2001). Insbesondere BDNF fördert das Überleben (Becker 1998), aber auch das Axonwachstum (Braun 1996) von Motoneuronen. Neurotrophine spielen auch eine wichtige Rolle für synaptische Plastizität (Bramham 2005, Poo 2001) und Lernen und Gedächtnis (Lu 2009). BDNF ist von Bedeutung für die adulte Neurogenese im Hippocampus und damit wiederum auch für Lernen und Gedächtnis (Lee 2009) sowie für hippocampale LTP (Korte 1995). Ein menschlicher BDNF Polymorphismus hat sogar einen Einfluß auf menschliches Gedächtnis und die Hippocampusfunktion (Egan 2003).

Doch nicht nur neurotrophe Faktoren beeinflussen die Differenzierung und das Überleben von Neuronen: Depolarisationen, die zu intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Erhöhungen durch  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  -Kanäle oder aus  $\text{Ca}^{2+}$  Speichern führen, wirken sich auf die Differenzierung aus (Spitzer 2002). Erhöhte Kalium-Konzentrationen oder Glutamat-Rezeptor Agonisten im Kulturmedium beeinflussen das Überleben von Neuronen positiv (Sendtner 2000).

Die Motoneurone von Säugern schütten an der neuromuskulären Synapse als Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) aus, was postsynaptisch an der Muskelmembran an nikotinische ACh Rezeptoren bindet. Der Muskel wird an spezialisierten Regionen, den sogenannten Endplatten innerviert. Die Endverzweigungen der Motoneurone bilden Auftreibungen, welche Boutons genannt werden. Die Boutons liegen gegenüber einer postsynaptischen Einfaltung der Membran, die die ACh Rezeptoren enthält. Der synaptische Spalt ist im Vergleich zum zentralen Nervensystem sehr breit: 100 nm. Präsynaptisch liegen einer postsynaptischen Einfaltung gegenüber die aktiven Zonen. Dies sind die Bereiche der Präsynapse an denen die Transmittervesikel ausgeschüttet werden können. Dafür muß über die dort ebenfalls befindlichen  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle  $\text{Ca}^{2+}$  einströmen. Der Ort der Vesikelfusion mit der Membran wird u.a. durch die „cytomatrix associated with the active zone“ (CAZ) bestimmt. Die Vesikelfusion wird mit Hilfe des SNARE-Komplexes bewerkstelligt zu dem auch VAMP2 (Vesikel assoziiertes Membran Protein2) gehört. Dieses Protein wird auch Synaptobrevin genannt und wird häufig in der Immunhistochemie als präsynaptischer Marker verwendet. CAZ Proteine, die eine Gerüst-Funktion haben oder mit dem Vesikel-Umsatz zu tun haben sind z.B.

Bassoon, Piccolo, Munc13-1, CAST („CAZ associated structural protein“)1 und CAST2/ERC1 (Deguchi-Tawarada 2004). Die von Motoneuronen sezernierten Proteine wie z.B. Agrin oder Neuregulin haben einen Einfluß auf die Struktur der Postsynapse. Umgekehrt beeinflussen von der Postsynapse abgegebene Proteine wie BDNF die Differenzierung und das Überleben der Motoneurone. Zentrale Synapsen haben eine große Ähnlichkeit mit Nerv-Muskel-Synapsen z.B. bezüglich der Vesikelproteine, der aktive Zonen-Proteine und der Transmitterausschüttung. Dennoch gibt es Unterschiede, wie z.B. die Abwesenheit einer Basallamina mit Lamininen im ZNS, weshalb andere Adhäsionsmoleküle den Zellkontakt gewährleisten müssen (Kandel 2000).

Motoneurone können in Kultur gehalten werden, wo sie Axone und Dendriten auswachsen. Die Schwierigkeit einer primären Neuronkultur besteht darin, daß Neurone sich ab einem gewissen Entwicklungsstadium nicht mehr teilen und außerdem die Unterstützung von z.B. Hüllzellen oder trophischen Faktoren benötigen. Die erste Motoneuronkultur wurde 1981 veröffentlicht (Schnaar 1981). Da Motoneurone eine nur in relativ kleinen Mengen vorkommende Zellart im Rückenmark sind müssen sie mit bestimmten Techniken (siehe Materialien und Methoden) angereichert werden, um eine möglichst reine Kultur zu erhalten. In dieser Kultur können dann Axone und Dendriten gesondert untersucht werden, dies im Gegensatz zu z.B. PC12-Zellen mit nur einer Art von Neuriten. Wachsende Axone haben an der Spitze eine Amöben-ähnliche Verbreiterung, die Wachstumskegel genannt wird, wie auch in Abb. 5 zu sehen ist. Wachstumskegel empfangen Signale von der Umgebung und bestimmen die Richtung in der ein Axon wächst u.a. über eine Regulation des Zytoskeletts (Kandel 2000). Beim Wachstum über verschiedene Oberflächen binden Integrine in den Wachstumskegeln an Laminine z.B. auf Muskeln. Laminine unterscheiden sich durch die jeweilige Zusammensetzung aus drei verschiedenen Untereinheiten.

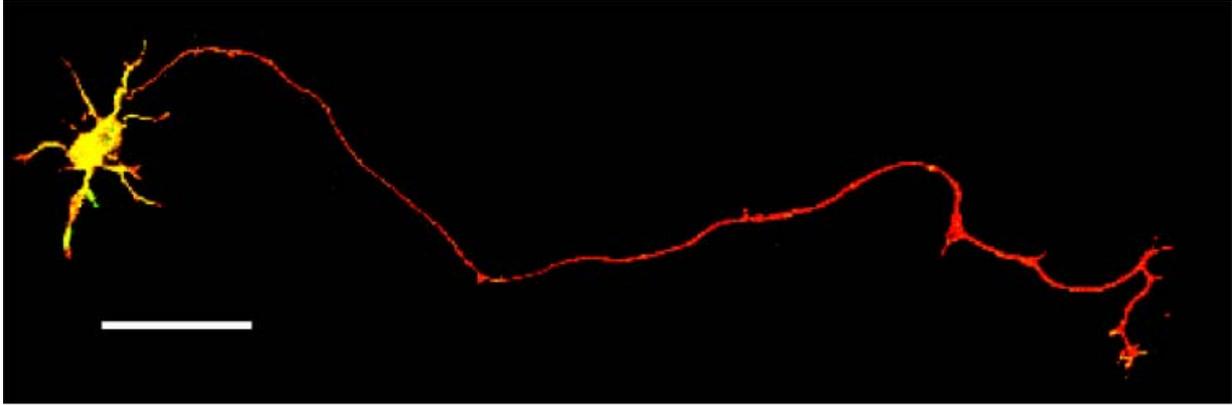


Abb. 5: Motoneuron nach sieben Tagen in Zellkultur. Rot=Tau, grün=Map2, hier gelb erscheinend wegen der Überlagerung. Balken=50  $\mu\text{m}$ . Das Bild wurde selbst erstellt und optisch bearbeitet um Hintergrund-Fluoreszenz auszublenden.

### 1. 5. RSK bei *Drosophila*

Das *Drosophila* RSK Protein ist zu 60 % identisch mit dem Maus RSK2-Protein (Wassarman 1994) und besitzt 910 Aminosäuren. Das entsprechende Gen liegt ebenfalls auf dem X-Chromosom. In einem Mutanten-screen für Lernmutanten in der sogenannten Hitzekammer, einem operanten Lernparadigma, bei dem die Fliegen lernen sollen, diejenige Seite in einer Kammer zu bevorzugen, die nicht durch Temperaturerhöhung bestraft wird, wurde die Mutante *ignorant* isoliert (Putz 2004). Hierbei handelte es sich um eine Linie mit einer P-Elementinsertion im *Drosophila rsk*-Gen. Weitere Mutanten wurden generiert u.a. mit einer N-terminalen Deletion des *rsk*-Gens und einer kompletten Deletion. Fliegen, denen das RSK Protein fehlt haben keine auffälligen Veränderungen in ihrem Verhalten oder Aussehen. Eine Koreanische Arbeitsgruppe stellte jedoch eine Verkürzung der Lebenszeit, eine reduzierte Fertilität und einen Wachstumsdefekt fest (Kim 2006).

Die verschiedenen Mutanten zeigten in den Untersuchungen im Labor von Martin Heisenberg unterschiedliche Beeinträchtigungen im Lernen. Die komplette Deletionsmutante  $\text{Df}(1)\text{ign}^{\Delta 58-1}$  war in der Hitzekammer normal, konnte sich jedoch in einem klassischen olfaktorischen Lernparadigma wesentlich schlechter erinnern als die WT Fliegen. Die partielle N-terminale Deletions-Mutante  $\text{Df}(1)\text{ign}^{\Delta 24-3}$  war in beiden Lernparadigmen gestört. Der Effekt war in der Hitzekammer dominant insofern als heterozygote Weibchen genauso schlecht lernten wie homozygote Weibchen und hemizygoten Männchen. Da die komplette Deletionsmutante

Df(1)*ign*<sup>Δ58-1</sup> in der Hitzekammer keinen Lerndefekt hat, müssen Df(1)*ign*<sup>Δ24-3</sup> und die P-Element-Linie gain-of-function Mutanten sein. Die Überexpression von RSK mit dem Gal4/UAS-System behindert das Lernen in der Hitzekammer. Df(1)*ign*<sup>Δ58-1</sup> kann wiederum diesen Defekt retten, was heißt, daß das Fehlen des endogenen RSK den Effekt des überexprimierten RSK ausgleicht. Andererseits führt die Einführung eines genomischen RSK-Transgens in die komplette Deletionsmutante zur Rettung des Lernphänotyps im olfaktorischen Lernparadigma. Interessanterweise führte in diesem Paradigma die Überexpression von RSK zu einer Verbesserung des Lernwertes, was jedoch bei späterer Wiederholung des Experiments, möglicherweise wegen der Anhäufung von modifizierenden Genen, nicht mehr verifiziert werden konnte. Die P-Element-Linie war im klassischen olfaktorischen Lernparadigma rezessiv lerngestört. Die Pilzkörper-spezifische Expression von RSK im KO-Hintergrund führt zu normalen Lernwerten im olfaktorischen Lernparadigma (Bertolucci, Dissertation 2008).

In einer neueren Arbeit wurden die *ign*<sup>Δ58-1</sup> Fliegen in einem räumlichen Orientierungsparadigma getestet in dem sich die Fliegen die Richtung, in der sich ein Ziel befindet, merken. Sie verfolgen das Ziel auch dann noch, wenn es nicht mehr sichtbar ist. Hierfür ist ein räumliches Arbeitsgedächtnis von Nöten. Die *ign*<sup>Δ58-1</sup> Fliegen konnten sich die Richtung nicht merken. Ein auf sehr wenige Neurone beschränkter „rescue“ mit UAS-RSK in den sogenannten Ring-Neuronen des Ellipsoid-Körpers im Zentralkomplex konnte die Erinnerung wieder herstellen (Neuser 2008). *ign*<sup>Δ58-1</sup> Fliegen haben außerdem eine veränderte circadiane Rhythmik. Der Fliegentag dauert kürzer als 24 h. Dies scheint durch eine Interaktion mit der Casein Kinase 2 und eine Beeinflussung des PERIOD Proteins zustande zu kommen (Akten 2009).

In einer Koreanischen Arbeitsgruppe wurden, wie oben erwähnt, ebenfalls RSK-KO Fliegen hergestellt, die durch eine gesteigerte ERK-abhängige Differenzierung im Sinne von zusätzlichen Flügel-Venen und Photorezeptoren auffielen (Kim 2006). Eine nachträgliche Begutachtung der entsprechenden KO-Fliegen im Labor des Instituts für Genetik und Neurobiologie in Würzburg konnte diese Befunde bestätigen (M. Heisenberg, persönliche Mitteilung). Zu diesen Veränderungen kommt es nach Kim durch eine hemmende Funktion von RSK auf die MAPK ERK. RSK hemmt als „zytoplasmatischer Anker“ den Eintritt von ERK in den Zellkern durch Bindung an

ERK. Dies ist unabhängig von der Kinase-Aktivität von RSK, wie durch Kinase-inaktive Konstrukte gezeigt wurde. Bei fehlender RSK-Bindung wandert ERK in den Zellkern und aktiviert die ERK-abhängige Gen-Transkription.

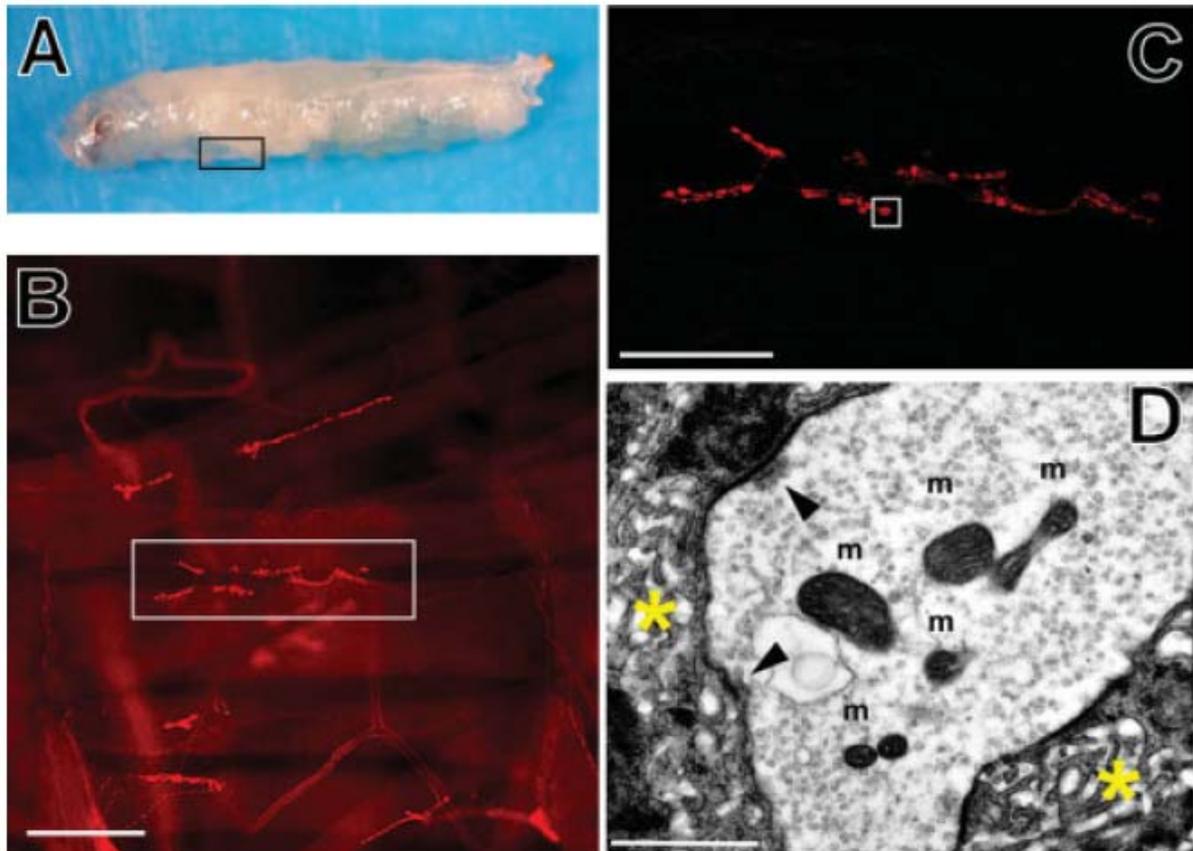


Abb. 6: Die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* (aus Marques 2005). (A) Ca. 4 mm lange *Drosophila* Larve im dritten Larvenstadium. Das Vorderende befindet sich links. Das Rechteck zeigt die Region an, in der das Segment A3 liegt. (B) Drittes abdominales Muskelsegment (A3) mit rötlich gefärbten synaptischen Endigungen (anti-CSP) und schwach leuchtenden Muskeln. (C) Stärker vergrößerte Synapse an den Muskeln 6/7 in Segment A3 (anti-CSP). (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ib-Boutons. Die Pfeile zeigen auf aktive Zonen mit T-Balken. Balken-Längen: in (B): 100  $\mu$ m, in (C) 50  $\mu$ m, in (D) 500 nm.

Die larvale neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* ist seit Jahren ein Modell-System für die Entwicklung und Funktion von Synapsen (Collins 2007, Koh 2000). Sie wird in der Regel im dritten Larvenstadium untersucht. Sie ist von besonderem Interesse, weil die *Drosophila* Genetik eine präzise räumliche und zeitliche Kontrolle

der Gene, die an der Synapse von Belang sind, erlaubt. Die neuromuskuläre Synapse besteht aus einer Vielzahl an synaptischen Verdickungen (Boutons) mit jeweils zahlreichen (durchschnittlich 10) aktiven Zonen, an denen die Transmitter-Vesikel ausgeschüttet werden. Im Gegensatz zur Nerv-Muskel Synapse der Wirbeltiere ist der Transmitter nicht Acetylcholin, sondern Glutamat. Damit ähnelt die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* mehr den erregenden zentralen Synapsen bei Säugern, die ebenfalls häufig glutamaterg sind. Postsynaptisch befinden sich den aktiven Zonen gegenüber die Glutamat-Rezeptoren an der Muskelmembran. Neben den rein glutamatergen Typ I-Boutons gibt es noch Typ II- und III-Boutons, die zusätzlich Oktopamin oder Peptid-Neurotransmitter enthalten. Die Muskeln 6 und 7, die in dieser wie auch den meisten anderen Arbeiten untersucht werden, haben nur Typ I-Boutons, welche in kleine Is (small) und größere Ib (big) Boutons eingeteilt werden.

32 Motoneurone versorgen 30 postsynaptische Muskeln nach einem regelmäßigen Muster. Durch die Größe der neuromuskulären Synapse sind auch elektrophysiologische Untersuchungen möglich. Die synaptische Funktion und Struktur unterliegen der Veränderung durch Umwelt-Einflüsse, sind also plastisch. Zur aktiven Zone bei *Drosophila* gehören sehr ähnliche Proteine wie bei Wirbeltieren, u.a. auch das Homolog zu CAST bzw. ERC, was bei *Drosophila* „Bruchpilot“ („BRP“) heißt, da die *brp* Mutante im Flug häufig abstürzt (Wagh 2006). Eine Besonderheit bei *Drosophila* sind die im Elektronenmikroskop sichtbaren T-Balken an der aktiven Zone, die vermutlich mit der Vesikelfusion zu tun haben und die bei der *brp* Mutante nicht mehr vorhanden sind. In der Elektrophysiologie ist die synaptische Transmission in der *brp* Mutante reduziert. BRP scheint auch eine Rolle bei der Anordnung von  $Ca^{2+}$  Kanal Clustern in der Nähe der aktiven Zone zu spielen (Kittel 2006).

Der Einfluß zahlreicher Gene auf die Synapsen-Bildung wurde untersucht. Bezüglich der Bedeutung der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalkaskade wurde gezeigt, daß RAS die Bouton-Zahl positiv reguliert (Koh 2002). Eine hypomorphe Mutante von *ras1* hatte weniger Boutons, wogegen die präsynaptische transgene Expression einer wildtypischen oder konstitutiv aktiven Version von *ras* die Bouton-Zahl erhöhte. Die selektive Aktivierung des RAS/ERK-Signalweges mit einer RAS-Variante, die nur

ERK und keine anderen nachgeschalteten Proteine aktiviert, hatte den selben Effekt, was darauf hinweist, daß die Bouton-Zahl über ERK positiv beeinflusst wird. Gleichfalls in diese Richtung weist der Befund, daß ein gain-of-function Allel von *erk* auch die Bouton-Zahl erhöht. Bei *Drosophila* heißt ERK Rolled (RL) und das konstitutiv aktive Allel *rolled sevenmaker* (*rl<sup>Sem</sup>*) (Brunner 1994). Sowohl RAS als auch RL sind an der neuromuskulären Synapse exprimiert. Es wurden auch Lern-Mutanten hinsichtlich der Morphologie der neuromuskulären Synapse betrachtet. Die *dunce* (*dnc<sup>1</sup>*) Mutante mit einer höheren cAMP (cyclic adenosine monophosphate) Konzentration hatte eine erhöhte Bouton-Zahl, was durch die *rutabaga* (*rut<sup>1</sup>*) Mutation, die die cAMP Konzentration erniedrigt, unterdrückt wurde (Zhong 1992). Die *rut* Mutation erniedrigt die Bouton-Zahl außerdem auch im Vergleich zum Wildtyp (Cheung 1999).

#### 1. 6. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit gab es bezüglich der Funktion von RSK2 auf neuronaler Ebene nur Vermutungen. Es war von Mensch (CLS), Maus und Fliege auf der Verhaltensebene bekannt, daß RSK2 für Lernen und Gedächtnis wichtig ist. Es lag auf Grund von *in situ* Hybridisierungsergebnissen die Vermutung nahe, daß RSK2 z.B. eine Rolle in der synaptischen Plastizität im Hippocampus der Wirbeltiere spielt. Auch konnte über die Funktion schon bekannter Zielproteine geschlossen werden, daß es z.B. Auswirkungen auf das Überleben von Zellen oder die Transkription bestimmter Gene haben könnte.

Es sollte in dieser Arbeit zum einen die Lokalisation des RSK2-Proteins in Neuronen und speziell im Hippocampus untersucht werden. Zum anderen waren LTP-Experimente in Hippocampus-Schnitten geplant, die mit Lentiviren mit *RSK2*-Konstrukten infiziert werden sollten. Dazu kam es nicht, da sich der Schwerpunkt durch die zur Verfügung gestellten *RSK2*-KO Mäuse von A. Hanauer mehr auf die Erforschung der Motoneurone verlagerte. An diesen peripheren Neuronen sollte beispielhaft die Funktion von *RSK2* für Neuriten- und Synapsenwachstum untersucht werden, auch mit dem Hintergedanken, daß dadurch Erkenntnisse für die Funktion von *RSK2* im zentralen Nervensystem gewonnen werden können. Mit den *RSK2*-Lentiviren sollten außerdem wildtypische Motoneurone und PC12-Zellen infiziert

werden, woraus man sich ebenfalls wertvolle Erkenntnisse über die Beeinflussung von Überleben und Differenzierung von Neuronen erhoffte. Hieraus entwickelte sich dann auch die weitere Fragestellung, welche Bedeutung RSK für die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* hat. Bei *Drosophila* wurden schon mehrfach Auffälligkeiten an der neuromuskulären Synapse bei Lernmutanten gefunden. Nachdem ein Motoneuronphänotyp bei Mäusen gefunden worden war stellte sich die Frage, ob RSK nicht auch bei *Drosophila* die Entwicklung von Motoneuronen bzw. der motorischen Synapse beeinflusst.

## **2. Materialien und Methoden**

### 2. 1. Materialien

#### 2. 1. 1. Versuchstiere

##### 2. 1. 1. 1. RSK2-KO Mauslinie

Die Mäuse wurden gemäß den geltenden Richtlinien in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die RSK2-KO Mauslinie wurde im Labor von A. Hanauer in Straßburg generiert (Yang 2004). Dazu wurde durch homologe Rekombination eine Neomycin-Kassette mit drei nachgeschalteten Stop-Codons für die drei möglichen Leseraster in Exon 2 eingefügt. Flankierende loxP Stellen wurden später genutzt, um die Neomycin-Kassette durch Kreuzung mit einer CMV-Cre transgenen Maus wieder zu entfernen. Durch die Stopp-Codons sollte die Transkription des Gens schon frühzeitig abgebrochen werden. Die Abwesenheit des RSK2-Proteins wurde im Western blot mit Hilfe eines N-terminalen Antikörpers gezeigt. Für die Mutation heterozygote Weibchen wurden über mindestens 15 Generationen mit C57BL/6 Männchen rückgekreuzt (Poirier 2007). Wegen unterschiedlicher Hygienestandards wurde die Mauslinie durch den Transfer gefrorener Embryos in unsere Tierhaltung überführt. Diese Arbeit war von Frau Dr. Bettina Holtmann durchgeführt worden. Die Mäuse wurden, passend zum genetischen Hintergrund, alle drei Generationen mit C57BL/6 Männchen rückgekreuzt, um den Einfluß des genetischen Hintergrunds zu minimieren.

### 2. 1. 1. 2. Drosophila Linien

Die Linien *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* und *Df(1)ign<sup>Δ24/3</sup>* wurden bei einem „screen“ nach Lernmutanten (Putz et al., 2004) im Labor von M. Heisenberg isoliert. *UAS-S6KII* stammt von E. Hafen (Zürich, Schweiz, Rintelen 2001). *GAL4-D42* stammt aus dem Bloomington *Drosophila* Stock Center. Die „loss-of-function“ Mutation im *Drosophila erk*-Gen, *rl<sup>10a</sup>*, und die „gain-of-function“ Mutation *rl<sup>Sem</sup>* sind in Brunner (1994) beschrieben. Die Fliegen wurden auf gewöhnlichem Maismehl Futter (Guo 1996) in einem 14h/10h Tag-Nacht Rhythmus bei 25 °C und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten.

### 2. 1. 2. Zelllinien

293T Zelllinie: Die Lentiviren wurden in 293T Zellen produziert, ein Subklon von HEK293 Zellen.

PC12-Zelllinie: Die immortale Tumorzelllinie PC12 stammt aus einem Tumor des Nebennierenmarks der Ratte (Greene 1976). Die Zellen reagieren auf NGF mit der Ausbildung von Neuriten.

### 2. 1. 3. Bakterienstämme

Für die Expression von Plasmiden wurde der Bakterienstamm HB101 verwendet.

### 2. 1. 4. Chemikalien und Enzyme

Die Chemikalien wurden in p.A. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Amersham, Applichem, BD, Calbiochem, Chemicon, Fluka, Gibco, Invitrogen, Merck, R&D, Roche, Roth, Sigma-Aldrich und Quiagen. Weiterhin wurden Enzyme von folgenden Firmen verwendet: Biotherm, Fermentas, Invitrogen, Roche und Sigma.

## 2. 1. 5. Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen wurde dem Laborhandbuch Sambrook (2001) entnommen oder entspricht den Angaben in den jeweiligen Reaktionskit-Protokollen bzw. den angegebenen Referenzen. Lösungen, die dort nicht angegeben sind oder zur Optimierung verändert wurden sind unten angegeben:

Blotpuffer	48,5 mM Tris 39 mM Glyzin 0,4% SDS 20% Methanol
Boratpuffer	0,15 M Borsäure, pH 8,3
Ca <sup>2+</sup> -freie Saline	130 mM NaCl, 36 mM Sucrose, 5 mM KCl, 5 mM Hepes, 4 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 mM EGTA
DABCO	PBS 75% Glycerol 2,5% 1,4-Diacabicyclo-[2.2.2]octan
Lämmli Probenpuffer (2 x)	125 mM Tris, pH 6,8 6% Glyzerin 2% SDS 0,025% Bromphenolblau 5% 2-Mercaptoethanol
Lysispuffer für DNA-Extraktion	10 mM Tris, pH 7,5 100 mM EDTA 150 mM NaCl 0,5% SDS

Lysispuffer für Protein-Extraktion	10 mM Tris, pH 7,5 100 mM EDTA, pH 8,0 150 mM NaCl 0,5% SDS Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
Paraformaldehydlösung (4%)	1,6 g PFA 20 ml H <sub>2</sub> O 3 Tropfen NaOH 16,4 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M) 3,6 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 M) pH 7,1-7,4
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST	PBS plus 0,1% Triton X-100
PEM-Puffer	0,1 M Pipes, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO <sub>4</sub>
RIPA-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% SDS Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
TAE-Laufpuffer (50x)	484 g Trisbase 114,2 ml Essigsäure 200 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
TBST (10x)	100 mM Tris, pH 7,6 1,5 M NaCl 0,5% Tween 20

## 2. 1. 6. Medien und Medienzusätze

Medium für PC12-Zellen	DMEM mit Glutamax 10% Pferdeserum 5% FCS 1% Ampicillin/Streptomycin
------------------------	--

Medium für HEK293T-Zellen	MEM mit Glutamax 10% FCS 1% Ampicillin/Streptomycin
---------------------------	---

Medium für primäre Motoneurone	Neurobasal Glutamax B27 Supplement 2% Pferdeserum
--------------------------------	--

Ampicillin	Sigma
B27 Supplement	Invitrogen
BDNF	Promega
CNTF	Promega
DMEM	Invitrogen
DMSO	Sigma
F-127	Sigma
Fötale Kälberserum	Linaris
FURA-2 AM	Invitrogen
Kanamycin	Sigma
Glutamax	Invitrogen
HBSS	Invitrogen
Laminin	Rupert Timpl (MPI, München)
LB-Medium	Invitrogen
MEM	Invitrogen
Neurobasal	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen

Phalloidin Alexa Fluor 546	Molecular Probes
Pferdeserum	Linaris
Poly-D,L-Ornithin	Sigma
TEMED	Invitrogen
U0126	Sigma-Aldrich
Vectashield	Vector Labs

### 2. 1. 7. Vektoren

pGJ3	Institut für Virologie, Würzburg
pGJ3(SFFVp)	Institut für Virologie, Würzburg
pczVSV-G	VSV-Glycoprotein-Expressionsplasmid; Institut für Virologie, Würzburg (Pietschmann 1999)
pEGFP-C1	Eukaryotischer Expressionsvektor, Clontech
pBluescript II KS+	Stratagene
pK3H.RSK2-WT	Jeffrey A. Smith (Smith 1999)
pK3H-RSK2- $\Delta\alpha$	Jeffrey A. Smith (Smith 1999)
pK3H-RSK2-Y707A	Jeffrey A. Smith (Smith 1999)
pK3H-RSK2-K451A	Jeffrey A. Smith (Smith 1999)

### 2. 1. 8. Kits

Big Dye Terminator Mix	Applied Biosystems
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen
NucleoSpin Plasmid	Machery-Nagel
Pierce BCA Protein Assay	Pierce Biotechnology
QIAGEN Plasmid Kit	Qiagen
QIAquick Gelextraction Kit	Qiagen
QIAGEN PCR Purification Kit	Qiagen

### 2. 1. 9. Geräte

Agarose-Gellaufkammer	PerfectBlue	Peclab
-----------------------	-------------	--------

Blotkammer		Bio Rad
Feinwaage	SAE 200	Bosch
Inkubatoren		Nuaire
Inverses Mikroskop		Leica
Konfokales Mikroskop	TCS SP2	Leica
	TCS 4D	Leica
Kraftmessgerät		Columbus Instruments
Laufrad		Tecniplast
LAS Reader	LAS-3000	Fuji Film
NanoDrop	ND-1000	Peqlab
PCR-Geräte	Mastercycler	Eppendorf
Perfusionspumpe		Ismatec
pH-Meter	pH537	WTW
Photometer		Eppendorf
Sequenziergerät		Applied Biosystems
Vibratom	Leica VT 1000S	Leica
Vortexer	L46	GLW
Zentrifugen		Eppendorf

## 2. 1. 10. Erst-Antikörper

<u>Name</u>	<u>Antikörperart</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Akt	polyklonal, Kaninchen	WB: 1:1000	Cell Signaling
b-Aktin	monoklonal, Maus	WB: 1:2500 ICC: 1:1000	Abcam
Bassoon	monoklonal, Maus	IHC: 1:200	Stressgen
bruchpilot (nc82)	monoklonal, Maus	IHC: 1:100	E.Buchner (Wagh 2006)
Ca <sup>2+</sup> -Kanal ( $\alpha_{1A}$ )	polyklonal, Kaninchen	IHC: 1:200 ICC: 1:200	Sigma
Ca <sup>2+</sup> -Kanal ( $\alpha_{1B}$ )	polyklonal, Kaninchen	IHC: 1:200 ICC: 1:200	Sigma
Calbindin	polyklonal, Kaninchen	IHC : 1:500	Swant
CAST2	polyklonal, Kaninchen	IHC: 1:200	E.D. Gundelfinger
CSP	monoklonal, Maus	IHC: 1:100	Erich Buchner (Zinsmaier et al., 1994)
Cytochrome C Oxidase	monoklonal, Maus	ICC: 1:100	Molecular Probes
ERK 1/2	polyklonal, Maus	WB: 1:1000	Santa Cruz
GFP	polyklonal, Kaninchen	IHC: 1:500	Mol. Probes
GSK3 $\beta$	monoklonal, Maus	WB : 1 :2000 ICC: 1:25	BD Biosciences
HA	monoklonal, Maus	WB: 1:1000 ICC: 1:200	Covance
MAP-2	monoklonal, Maus	ICC: 1:300 IHC: 1:200	Chemicon
NeuN	monoklonal, Maus	IHC: 1:500	Chemicon
Neurofilament M	polyklonal, Kaninchen	ICC: 1:400	Abcam
p75 <sup>NTR</sup>	monoklonal, Maus	ZK: 1:1000	Chemicon
pAKT (Ser 473)	polyklonal, Kaninchen	WB: 1:500 ICC: 1:200	Cell Signaling

pERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	monoklonal, Maus	WB: 1:500 ICC: 1:300	Cell Signaling
pGSK3 $\beta$ (Ser 9)	rabbit	WB: 1:300 ICC: 1:100	Santa Cruz
p-RSK2 (Thr577)	polyklonal, Kaninchen	IHC: 1:200 WB: 1:200	Santa Cruz
Piccolo	monoklonal, Maus	IHC: 1:200	Reinhard Jahn
PSD-95	monoklonal, Maus	IHC: 1:200	BD Biosciences
Synaptobrevin	monoklonal, Maus	IHC: 1:400	Reinhard Jahn
Tau	polyklonal, Kaninchen	ICC: 1:500	Sigma
Tubulin	monoklonal, Maus	WB: 1:50	Selbst
RSK	polyklonal, Meerschweinchen	IHC: 1:200	Thomas Raabe
RSK2 (KAS -ST007E)	polyklonal, Kaninchen	ICC: 1:150	Biotrend
RSK2 (sc1430)	polyklonal, Kaninchen	WB: 1:100 IHC: 1:300	Santa Cruz
RSK2 (sc30700)	polyklonal, Ziege	ICC: 1:50	Santa Cruz
RSK2 (sc9986)	monoklonal, Maus	WB: 1:100 ICC: 1:150 IHC: 1:100	Santa Cruz
RSK2 (JM-3546- 100)	polyklonal, Kaninchen	ICC: 1:150	MoBiTec
RSK2 (AF1518)	polyklonal, Kaninchen	ICC: 1:70	R&D Systems
RSK2 (ab22697)	polyklonal, Kaninchen	ICC: 1:150	Abcam
RSK2 (386800)	polyklonal, Kaninchen	ICC: 1:150	Invitrogen
SAP47 (nc46)	monoklonal, Maus	IHC: 1:100	E. Buchner (Reichmuth et al., 1995)
Synaptobrevin	monoklonal, Maus	IHC: 1:400	Reinhard Jahn (Jahn et al., 1985)

### 2. 1. 11. Zweit-Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa 488 $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	IHC: 1:300	Invitrogen
Alexa 488 $\alpha$ -Maus	Ziege	IHC: 1:300	Invitrogen
Alexa 488 $\alpha$ -Bungarotoxin		IHC: 5 $\mu$ g/ml	Molecular Probes
Alexa 594 $\alpha$ -Bungarotoxin		IHC: 5 $\mu$ g/ml	Molecular Probes
Alexa 546 $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	IHC: 1:300	Invitrogen
Alexa 546 $\alpha$ -Maus	Ziege	IHC: 1:300	Invitrogen
Cy2 $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	ICC: 1:300	Jackson
Cy2 $\alpha$ -Maus	Ziege	ICC: 1:300	Jackson
Cy3 $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	ICC: 1:300	Jackson
Cy3 $\alpha$ -Maus	Ziege	ICC: 1:300	Jackson
HRP $\alpha$ -Kaninchen	Ziege	WB: 1:7500	Jackson
HRP $\alpha$ -Maus	Ziege	WB: 1:5000	Jackson

### 2. 1. 12. Software

Folgende Computerprogramme wurden in dieser Arbeit verwendet: Adobe Photoshop, Aida, GraphPadPrism, ImageJ, Leica Confocal Software, Scion Image, Bitplane Imaris.

### 2. 1. 13. Statistik

Zum Vergleich von zwei Gruppen parametrischer Daten wurde der Student's t-Test verwendet. Die Nullhypothese wurde auf der 5%-Basis verworfen, d.h. es wurde angenommen, daß zwischen zwei Gruppen ein wirklicher Unterschied besteht, wenn die Wahrscheinlichkeit dafür, daß der Unterschied zufällig zustandekam kleiner als 0,05 war. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine Einweg-ANOVA (analysis of variance) benutzt. Einzelne Gruppen wurden mit dem Bonferroni oder dem Newmal-Keuls post-hoc Test verglichen. Für alle statistischen Berechnungen wurde das GraphPadPrism Programm verwendet.

## 2. 2. Methoden

### 2. 2. 1. DNA-Isolierung

DNA wurde aus embryonalem Gewebe oder Schwanzspitzen der adulten Maus isoliert. Das Gewebe wurde mit Lysispuffer und Proteinase K bei 60 °C ÜN inkubiert. Mit 5% SDS, 3M NaCl und Chloroform wurde die DNA vom Rest des Gewebes abgetrennt und in 100% Ethanol ausgefällt. Anschließend wurde in 70% Ethanol gewaschen und das abzentrifugierte Pellet in 10 mM Tris resuspendiert.

### 2. 2. 2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

### 2. 2. 3. Gelelektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren

Die PCR-Produkte wurden in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in TAE-Laufpuffer aufgekocht. Anschließend wurde 1 Tropfen Ethidiumbromid dazugegeben und die Flüssigkeit in eine Gelschiene gegossen. Die DNA-Proben wurden dann in die ausgehärteten Geltaschen geben und eine Spannung von ca. 100 V angelegt. Mit einem UV-Transilluminator wurden die Banden sichtbar gemacht.

### 2. 2. 4. Plasmidtransformation

Die Transformation in kompetente E. coli Bakterien (HB101) erfolgte mit der Hitze-Schock Methode: Es wurde 1 µl der Plasmidlösung zu den Bakterien gegeben, dann 30 min auf Eis, 90 min bei 42 °C im Wasserbad und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium wurde 1 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, so daß nur diejenigen Bakterien Kolonien bildeten, die das jeweilige Resistenzgen enthielten. Einzelne Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in einem 50 ml Röhrchen mit 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum (100 µg/ml) ÜN bei 37 °C weiter vermehrt.

### 2. 2. 5. Proteinextraktion

Das Gewebe wurde nach der Präparation in ein Reaktionsgefäß mit 100-200 µl RIPA-Puffer und Proteinase K auf Eis überführt. Nach Zerkleinerung des Gewebes mit einem Plastik-Homogenisator wurde das Lysat gevortext und bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA Protein Assay durchgeführt. Danach wurde Laemmli-Puffer hinzugegeben und bei 95 °C 5 min gekocht. Aliquots wurden anschließend eingefroren.

### 2. 2. 6. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung von Protein-Konzentrationen wurde der Pierce BCA Protein-Assay verwendet. Es wurden zu 4 µl des Extrakts 80 µl Lösung A/B-Gemisch gegeben (Lösung A/Lösung B: 50/1). Nach Inkubation bei 37 °C über 30 min wurde die Konzentration mit einem Spectrophotometer (NanoDrop) bestimmt.

### 2. 2. 7. Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western blot

Die Proteine wurden auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Diese bestanden aus einem 3-4 cm langen 5%igen Sammelgel und einem darunterliegenden 10%igen Trenngel.

Trenngel:                    5 ml Acryl/Bis (30%)  
                                  3 ml 1,88 M Tris, pH 8,8  
                                  3 ml 10% SDS  
                                  4 ml H<sub>2</sub>O  
                                  75 µl 10% APS  
                                  12,5 µl TEMED

Sammelgel:                2 ml Acryl/Bis (30%)  
                                  2,4 ml 0,625 M Tris, pH 6,8  
                                  2,4 ml 10% SDS  
                                  5,2 ml H<sub>2</sub>O

70 µl 10% APS

12 µl TEMED

Vor dem Auftragen auf das 10%ige Gel wurden die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine nach dem Semi-Dry-Blot Verfahren (Kyhse-Andersen 1984) auf eine Nitrozellulose Transfermembran (45 µm, Schleicher & Schuell) überführt. Danach wurde die Membran mit Ponceau-Lösung gefärbt, mit Wasser gewaschen und das Bandenmuster fotografiert. Dann wurde in 5% Milch (in TBST) geblockt. Daraufhin wurde die Membran entweder für 1-2 h bei RT oder ÜN bei 4 °C dem Antikörper ausgesetzt, der in nicht lipidfreiem Milchpulver oder TBST verdünnt war. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in TBST wurde der HRP-gekoppelte Zweit-Antikörper (in Milchpulver oder TBST verdünnt) daraufgegeben. Nach nochmaligem Waschen wurden die Banden auf der Membran mit dem „chemiluminescence kit ECL-advance“ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) mit Hilfe eines Entwicklers (LAS-3000, Fujifilm, Tokyo) sichtbar gemacht. Die Bandenintensität wurde mit der Aida Software bestimmt, wobei jeweils der Hintergrund von der Bandenintensität subtrahiert wurde.

#### 2. 2. 8. Anlegen von Primärkulturen embryonaler Motoneurone

Es wurde im Wesentlichen wie bei Wiese (1999) beschrieben verfahren. Um primäre Motoneuronkulturen anzulegen, wurde das lumbale Rückenmark von Mausembryonen vom Embryonaltag E12 (im Unterschied dazu bei Wiese E13) präpariert. Der Tag nach der Paarung, erkennbar am „Vaginalpfropf“, wurde als Tag 1 festgelegt. Das Muttertier wurde nach kurzer Narkose mit Diethyläther durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde der Uterus entnommen und die Fruchtblasen freipräpariert. Die Embryonen wurden aus den Fruchtblasen entnommen. Mit einer spitzen Pinzette wurde das lumbale Rückenmark präpariert und in HBSS überführt. Danach wurde die Glia limitans entfernt und das embryonale Rückenmark in 180 µl HBSS überführt. Nach Zugabe von 20 µl Trypsin (1%) wurde das Gewebe 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 20 µl Trypsininhibitor (0,1%) dazugegeben und das Gewebe trituriert. Die Zellsuspension wurde in 800 µl Neurobasalmedium auf eine 24-Lochplatte überführt, die zuvor mit 10 ng/ml p75<sup>NTR</sup>

Antikörper in 10 mM Tris, pH 8,0 für ca. 2 h bei RT beschichtet worden war. Daraufhin wurde drei mal mit NB-Medium gewaschen um die nicht an den p75 Antikörper gebundenen Zellen zu entfernen. Die übriggebliebenen Zellen, welche die Motoneurone sein sollten, wurden mit 500 µl Depolarisationslösung (30 mM KCl, 0,8% NaCl) abgelöst und in 1,5 ml Motoneuronmedium (NB-Medium, B27 Supplement, 500 µM Glutamax, 2% Pferdeserum) suspendiert. Die Neurone wurden anschließend bei 400 g für 5 min abzentrifugiert, das Pellet in Motoneuronmedium suspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Ca. 1500 Zellen pro Deckgläschen wurden ausplattiert. Dazu war in jede Vertiefung einer Nunc 4-Lochplatte ein Deckgläschen gelegt worden und mit PORN ÜN bei 4 °C sowie anschließend nach drei-maligem Waschen mit PBS für ca. 1 h mit Laminin (2,5 µg/ml in HBSS) beschichtet worden. Nach dem Absetzen der Zellen (nach ca. 30 min) wurde 1,5 ml Motoneuronmedium in die Lochplatte gegeben. Zusätzlich wurden BDNF und CNTF in einer Konzentration von 1 ng/ml zugegeben. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Zur Bestimmung der Überlebensraten wurden ca. 4 h nach Plattierung zum ersten Mal die im Phasenkontrastmikroskop dunkel erscheinenden Zellen gezählt. Weitere Zählungen wurden nach vier bzw. sieben Tagen durchgeführt. Dann wurden nur die „gesund“ aussehenden Zellen gezählt und Zellen mit Vakuolen oder körnigem Aussehen ausgeschlossen.

#### 2. 2. 9. PC12 Zellkultur und Differenzierung

7000 PC12-Zellen wurden auf mit PORN beschichtete Deckgläschen in 4-Loch-Platten ausplattiert. Nach dem Absetzen der Zellen (nach 1/2 h) wurde 500 µl Virenmedium dazugegeben und die Gesamtmenge an Medium mit PC12-Zell-Medium, welches mit DMEM 1/10 verdünnt wurde, auf 1,5 ml aufgefüllt. NGF wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml dazugegeben. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in 4% PFA für 1/2 h fixiert, drei mal mit PBS gewaschen und in PBS im Kühlschrank aufbewahrt. Infizierte Zellen wurden durch Ak-Färbung gegen den HA-tag oder direkt durch die GFP-Fluoreszenz erkannt.

### 2. 2. 10. Eukaryonten-Zellkultur

Die HEK293T-Zellen, PC12-Zellen und Motoneurone wurden in dem jeweiligen Medium bei 37 °C im Zellkultur-Brutschrank bei 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor Benutzung wurden die Medien auf 37 °C aufgewärmt. Die adhärent wachsenden Zelllinien wurden je nach Wachstum alle 5-7 Tage gesplittet (ca. 1:10).

### 2. 2. 11. Hippocampuspräparation und Anfertigung von Vibratomschnitten

Die Maus wurde durch Diethyläther getötet und mit 4% PFA perfundiert. Dazu wurde die Bauchdecke geöffnet, das Zwerchfell durchtrennt und das Herz freigelegt. Das PFA wurde ca. 10 min lang mit einer Pumpe durch eine Kanüle in den linken Ventrikel gepumpt. Über den rechten Vorhof, der eröffnet worden war, konnte das noch im Körper befindliche Blut abfließen. Anschließend wurden beide Hippocampi präpariert und ÜN bei 4 °C in PFA nachfixiert. Dann wurde das Gewebe mit dem Vibratom geschnitten, die Schnitte in PBS aufgenommen und bei 4 °C gelagert. Nach der Antikörperfärbung wurden die Schnitte auf einen Objektträger gebracht und mit DABCO unter einem Deckgläschen eingedeckt, welches mit Nagellack luftdicht abgeschlossen wurde.

### 2. 2. 12. Herstellung der rekombinanten Vektor-Plasmide

Die rekombinanten RSK2 Plasmide zur Herstellung der Lentiviren wurden auf der Grundlage des Vektor Plasmids pGJ3 (Jarmy 2001) hergestellt. Von Jeffrey A. Smith wurden die vier Plasmide mit Maus RSK2 cDNA in wildtypischer, Kinase-inaktiver und konstitutiv aktiver Form (zwei Varianten) bezogen (Poteet-Smith 1999). Das konstitutiv aktive Konstrukt pK3H-*Rsk2*-Δα trägt eine Deletion der 54 carboxy-terminalen Aminosäuren, die die autoinhibitorische Domäne entfernt. Das zweite konstitutiv aktive Konstrukt pK3H-*Rsk2*-Y707A hat durch eine Punktmutation einen Aminosäure-Austausch von Y nach A bei Aminosäure Nummer 707, also von Tyrosin zu Alanin. Diese Aminosäure wurde ausgewählt wegen der Ähnlichkeit in der Position zu einem entscheidenden Phenylalanin in der CaMK1 in einer ähnlichen autoinhibitorischen Domäne. Die Kinase-inaktive Variante pK3H-*Rsk2*-K451A zerstört durch eine Punktmutation (Alanin statt Lysin) an Stelle 451 eine wichtige

ATP Bindungsstelle. Zur Herstellung der Viren mit CMV Promotor und GFP tag wurde die *RSK2* cDNA aus den entsprechenden pK3H-*RSK2* Plasmiden mit BamHI ausgeschnitten und an der BglII Schnittstelle der Polylinkerregion des pEGFP-C1 (BD Biosciences) Vektors eingesetzt. Die *RSK2* cDNA zusammen mit dem N-terminalen EGFP wurde dann aus diesem Vektor an den Schnittstellen Mph1103 und SmaI ausgeschnitten und nach Herstellung von stumpfen DNA-Enden durch PCR in die Polylinkerregion von pGJ3 unterhalb eines CMV Promotors bei Eco47III eingesetzt. Zur Herstellung der Viren mit SFFV Promotor und HA tag wurde die *RSK2* cDNA mit schon vorhandenem C-terminalem HA tag zusammen aus den entsprechenden pK3H-*RSK2* Plasmiden mit Sall und ClaI ausgeschnitten und als Zwischenschritt in einen modifizierten pBluescript Vektor mit einer zusätzlichen NotI-Schnittstelle kloniert, da sich in der Polylinkerregion dieses Vektors passende Schnittstellen für die weitere Klonierung befinden. Anschließend wurde mit NotI die DNA wieder ausgeschnitten und in die Polylinkerregion des PGJ3 Vektors bei NotI eingefügt. Die korrekte Orientierung wurde mit Eco47III überprüft. Alle Vektoren wurden vollständig sequenziert um die Korrektheit der Klonierungsergebnisse zu bestätigen.

### 2. 2. 13. Herstellung von Lentiviren

Für den Gentransfer in PC12-Zellen und Motoneurone wurden Lentiviren verwendet. Diese wurden in HEK293T Zellen hergestellt (Bender 2007). Es wurden ca. 7,5 mio 293T Zellen in MEM-Medium auf eine 10 cm Schale ausplattiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt und ein Transfektions-Mix dazugegeben:

20 µg Plasmid-DNA

10 µg VSV-G-DNA

830 µl aqua dest.

100 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub>

1000 µl 2 x HBS

Nach 8 h wurde das Medium gewechselt. Am nächsten Morgen wurden 80 µl 500 mM Na-Butyrat zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 8 h wurde das MEM-Medium

abgesaugt und Neurobasal-Medium dazugeben. Am nächsten Morgen wurde der Überstand filtriert (Porengröße 0,45 µm) und eingefroren.

#### 2. 2. 14. Sequenzierung

Es wurde die Dideoxymethode nach Sanger (1977) verwendet.

Ansatz:                    3 µl DNA (aus Plasmidpräparation)  
                              2 µl Big Dye  
                              2 µl half Big Dye  
                              1,5 µl Primer (10 pmol/µl)  
                              11,5 µl H<sub>2</sub>O

PCR-Programm:    96 °C - 1 min  
                          25 mal: [96 °C - 15 s, 50 °C – 15 s, 60 °C – 4 min]  
                          60 °C – 10 min

Das PCR-Produkt wurde mit dem DyeEx™ 2.0 Spin Kit (Qiagen) gereinigt. Danach wurden die Proben mittels Speed vac getrocknet und auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte über 16 h auf einem 5% Polyacrylamid-Gel mit 8M Harnstoff.

#### 2. 2. 15. Präadsorption

Zur Kontrolle der Spezifität des p-RSK2-Antikörpers wurde er mit dem entsprechenden Peptid präadsorbiert. Dazu wurde er in der verwendeten Verdünnung (1:200) mit 50 µg Peptid ÜN bei 4 °C im Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde bei 4 °C in der Ultrazentrifuge bei 22000 rpm 4 h lang zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

#### 2. 2. 16. Immunzytochemische Färbungen

Für immunzytochemische Analysen wurden die Zellen auf den Deckgläschen zuerst mit 4% PFA fixiert (ca. 30 min) und dann 3 mal mit PBS gewaschen. Wenn die Zellen

kein GFP enthielten, wurde die Zellmembran mit 100%igem Azeton (-20 °C; 5 min) durchgängig gemacht. Danach wurden die Deckgläschen in neue 4-Lochplatten überführt und 3 mal mit PBS gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt mit 10%igem BSA (1 h). Falls in den Zellen GFP detektiert werden mußte, wurde der Azeton-Schritt ausgelassen und zur Blockierungslösung 0,3% Triton X-100 gegeben. Die anschließende Inkubation mit 1.Ak erfolgte bei RT für 1 h oder ÜN bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit Sekundärantikörper bei RT für 2 h inkubiert. Danach wurden die Zellkerne durch 15 minütige Inkubation mit 4',6-Diamidin-2'phenylindol dihydrochlorid (DAPI) sichtbar gemacht (1:7500 in TBST; 1µg/ml). Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen umgekehrt auf einen Tropfen Moviol auf einen Objektträger gelegt. Die Quantifizierung der Färbungen und auch die Pixel-Überlagerung erfolgte mit der LCS Lite software.

## 2. 2. 17. Immunhistochemische Färbungen

### 2. 2. 17. 1. Immunhistochemie Hippocampus

Für immunhistochemische Färbungen der Hippocampusschnitte wurden Multiwell-Kulturplatten verwendet. Die Schnitte wurden 3 mal 15 min mit PBS gewaschen. Dann wurde 45 min geblockt mit 10% BSA und 0,5% Triton-X-100 in PBS. Daraufhin wurde der 1.-Ak in 1% BSA mit 0,5% Triton-X-100 in PBS ÜN bei 4 °C auf die Schnitte gegeben. Nach drei-maligem Waschen mit 1% BSA und 0,5% Triton-X-100 in PBS wurde der 2.-Ak in 1% BSA mit 0,5% Triton-X-100 in PBS für 90 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Anschließend wurde 5 mal mit PBS gewaschen.

### 2. 2. 17. 2. Präparation, Färbung und Mikroskopie an der motorischen Endplatte

Der Musculus gastrocnemius wurde bei zwei Monate alten RSK2-KO und -WT Mäusen präpariert. Der Muskel wurde auseinandergesupft und für 3 h mit 2% PFA fixiert, mit PBS gewaschen und ÜN in 10% BSA und 0,3% Triton-X-100 in PBS geblockt. Die motorische Endplatte wurde mit Alexa Fluor 488 oder 594 gekoppeltem  $\alpha$ -Bungarotoxin (5 µg/ml) in 1% BSA in PBS, welches an Acetylcholinrezeptoren bindet, oder mit dem N-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Ak, dem CAST2-Ak oder dem p-ERK-Ak 30 min lang gefärbt. Die Endplatten wurden mit einem konfokalen Mikroskop (TCS 4D;

Leica) sichtbar gemacht und mit dem NIH Scion Image Programm ausgemessen. Die Ausmessung erfolgte blind bezüglich des Genotyps. Für die postsynaptische Färbung wurde ein 100x 1.4 Öl-Immersion Objektiv (PL APO) und für die präsynaptische Färbung gegen Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und CAST2 ein 63x 1.4 Öl-Immersion Objektiv (HCX PL APO) verwendet. Für die p-ERK gefärbten Endplatten wurde ein Olympus FluoView™ FV1000 konfokales/2-Photonen Mikroskop mit einem 20x Objektiv verwendet. Die Ca<sup>2+</sup>-Kanal und CAST2-Färbung wurde mit der Leica Konfokalen Software (LCS Lite), und die p-ERK Fluoreszenzstärke mit AIDA software (Raytest) bestimmt. Für die 3D Rekonstruktion wurden die Bilder mit dem FluoView™ FV1000 konfokalen/2-Photonen Mikroskop mit einem 20x Objektiv (Zoom Faktor 8, Wasser, NA=0.95) aufgenommen. Die 2D konfokalen Schnitte wurden im Olympus.oib Format gespeichert und mit der Bitplane Imaris 5.7.0 Software des Herstellers geöffnet. Die Arbeit am 2-Photonen Mikroskop mit der dazugehörigen Auswertung wurde von Christian Simon durchgeführt.

#### 2. 2. 17. 3. Präparation und Färbung des Nervus Phrenicus

Die zwei Monate alten Mäuse wurden mit Natrium-Cacodylat-Puffer mit 4% PFA und 2% Glutaraldehyd perfundiert. Der Nervus Phrenicus wurde präpariert und drei Tage lang bei 4 °C mit 2% Glutaraldehyd in 0,15 M PBS fixiert. Nach dem Waschen in PBS wurde das Gewebe mit Osmiumtetroxid (4%) in einem Puffer, der 4% Kaliumdichromat und 3,4% NaCl enthielt, inkubiert und eingebettet in 3,4-Epoxycyclohexylmethyl-3,4-Epoxycyclohexylcarboxylat (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland). 1 µm Schnitte wurden mit Azur-Methylenblau gefärbt. Die Schnitte wurden mit einem inversen Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 100; 100x 1.3 Öl-Immersion Objektiv, Plan NEOFLUAR) photographiert und die myelinisierten Axone gezählt.

#### 2. 2. 17. 4. Färbung und Auszählung der Motoneurone im lumbalen Rückenmark

Die zwei Monate alten Mäuse wurden mit 4% PFA perfundiert. Das lumbale Rückenmark (L1-L6) wurde herauspräpariert und 15 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Nach einer Nissl-Färbung wurden in jedem zehnten Schnitt die

Motoneurone gezählt, wobei eine Korrektur für geteilte Nukleoli durchgeführt wurde (Masu 1993).

#### 2. 2. 18. Calcium Imaging

Für das von S. Jablonka durchgeführte Calcium Imaging (Methode wie in Jablonka, 2007) wurden die Motoneurone auf Deckgläschen ausplattiert. Nach Waschen mit HBSS und Permeabilisierung mit 0.25% Pluronic F-127 (Sigma) über fünf min wurden die Zellen bei 37 °C 45 min lang mit 2 µM FURA-2 AM (Invitrogen) in Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> haltigem HBSS beladen. Nach einem Waschschrift wurden die Deckgläschen auf einen beheizten Mikroskopiertisch gespannt und mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> haltigem HBSS gespült. Die Messungen wurden mit einer Fluoreszenz Messapparatur von TILL Photonics (Polychrome II) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer Frequenz von 1 Hz über 7.5 min separat im Wachstumskegel, Axon, Dendrit und Zellkörper mit einer Expositions-Zeit von 10 ms aufgenommen. Die Zellen wurden abwechselnd monochromatischem Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm ausgesetzt, und die Emission wurde bei 512 nm gemessen.

#### 2. 2. 19. Haltung und Genotypisierung der RSK2-KO Linie

Die RSK2-KO Mäuse wurden im Tierstall des Kopfklinikums gehalten und alle drei Generationen mit C57Bl/6 Mäusen rückgekreuzt (Charles River Wiga, Deutschland). Zur Genotypisierung wurde das von der Arbeitsgruppe A. Hanauer vorgeschlagene Primerpaar: WL 112 (TTG TTG GTT TAC TTT CTT TCG GTC TG)/ WL 113 (AAG ATG ATT GCT TTG CTT AGT TTA) verwendet. Die erwarteten Bandengrößen waren 230 Bp für das WT-Allel und 320 Bp für das mutierte Allel. Für das mutierte Allel hemizygoten Männchen und homozygoten Weibchen hatten somit jeweils eine 320 Bp Bande. Heterozygote Weibchen hatten beide Banden, und WT Männchen und Weibchen hatten nur die WT Bande.

Der 30 µl Ansatz für die PCR beinhaltete:

1 µl DNA

1 µl dNTPs 10 mM (?)

1 µl von jedem Primer (10 pmol/µl)  
0,5 µl Taq Polymerase (Biotherm)  
3 µl PCR-Puffer 10-fach  
22,5 µl Aqua ad iniectabilia

Das PCR-Programm umfaßte 33 Zyklen mit je 94°C für 10 s, 60°C für 10 s und 72 °C für 10 s. Es folgten einmalig 72 °C für 10 min. Dem Programm voraus gingen einmalig 3 min mit 94 °C.

#### 2. 2. 20. Immunhistochemie der neuromuskulären Synapse bei *Drosophila* Larven

Die Präparation und Färbeprozedur erfolgte wie in Godenschwege (2004) beschrieben. Die Larven wurden in Ca<sup>2+</sup>-freier Saline präpariert. Die Cuticula wurde dorsal längs aufgetrennt und Fett sowie Därme entfernt. Dann wurde die Cuticula mit feinen Nadeln auf eine Unterlage aufgesteckt. Es folgte eine 90-minütige Fixierung bei 4 °C in 4%igem PFA (ph 7,0-7,2) in PEM-Puffer. Danach wurde zweimal 15 min bei RT mit PEM gewaschen und 1 h bei RT geblockt mit 2% BSA und 5% NGS in PBS-0,1% Triton (PBST). Die Inkubation mit dem 1. Ak in PBST erfolgte bei 4 °C ÜN. Um Ak zu sparen wurde dieser Schritt außer bei nc46 und nc82 in 96-well Platten durchgeführt. Am Folgetag wurde vier mal 1 h mit PBST gewaschen, dann 2 h bei RT mit dem 2. Ak inkubiert und noch mal vier mal 1 h mit PBST gewaschen. Danach wurden die Präparate in Vectashield eingedeckelt.

#### 2. 2. 21. Testung der Motorik und Koordination bei Mäusen

Zwei Monate alte RSK2-KO und -WT Mäuse wurden bezüglich motorischer Defizite untersucht. Die Kraft der Vorderfüße wurde mit einem automatischen Kraftmessgerät bestimmt. Dazu klammert sich die Maus mit den Vorderfüßen an einen Bügel, an dem sich das Meßgerät befindet. Maus und Gerät werden auseinandergezogen, bis die Maus losläßt. Die Kraft beim Loslassen wird festgehalten und in Newton angezeigt (Masu 1993). Das Gewicht der Mäuse wurde ebenfalls bestimmt.

Die spontane Aktivität wurde mit einem Laufrad über sieben Tage gemessen. Die Zahl der Umdrehungen wurde automatisch gemessen.

Die Koordination wurde mit einem „rotarod“ getestet. Dazu wurde die Maus auf eine sich drehende Stange gesetzt. Die Geschwindigkeit nahm kontinuierlich zu bis die Maus herunterfiel. Die Zeit bis zum Herunterfallen wurde gemessen. Falls eine Maus sich so gut an der Stange festhalten konnte, daß sie sich um die Stange herum drehte ohne herunterzufallen wurde dies zwei mal toleriert. Beim dritten Mal wurde es als Herunterfallen gewertet und der Versuch abgebrochen. Dies kam nur in seltenen Fällen vor.

### **3. Ergebnisse**

#### **3. 1. Lokalisation von Rsk2 im Hippocampus der Maus**

Wie in der Einleitung dargelegt, hat RSK2 einen Einfluß auf Lernen und Gedächtnis. Es war deshalb zu vermuten, daß es eine Rolle bei der Ausbildung von synaptischer Plastizität im Gehirn, insbesondere im Hippocampus spielt. Tatsächlich war durch *in situ* Hybridisierung gezeigt worden, das die *RSK2* m-RNA im Hippocampus stark exprimiert wird (Zeniou 2002; Abb. 7). Weitere Orte der Expression waren v.a. die Purkinje-Zellen und die Kerne des Kleinhirns. Ein besonders intensives Signal hatte sich in der CA3-Region des Hippocampus gezeigt. Zusätzlich zur Lokalisation der m-RNA möchte man gerne wissen, wo das Protein exprimiert wird. Die Detektion des RSK2-Proteins im Hippocampus mit Hilfe von Antikörpern ist bislang nicht überzeugend durchgeführt worden. Bei Zeniou wurde keine Spezifitätskontrolle gemacht und die genannten Befunde wurden ohne Abbildung nur kurz im Text erwähnt.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, mit RSK2-Antikörpern in adulten wildtypischen C57Bl/6 Mäusen RSK2 im Hippocampus zu detektieren. Ein monoklonaler (sc9986) und eine polyklonaler (sc1430) Rsk2 Antikörper von Santa Cruz zeigten jedoch beide kein Signal im Hippocampus. Dagegen konnte ein polyklonaler p-RSK2 Antikörper von Santa Cruz mit einer deutlichen Färbung verwendet werden, um das RSK2-Protein im Hippocampus zu lokalisieren. Er ist gegen die Phosphorylierungsstelle bei Threonin (Thr) 577 in der C-terminalen Domäne gerichtet. Die Phosphorylierung von Thr 577 durch ERK führt zur

Aktivierung der C-terminalen Domäne (Dalby 1998, siehe auch Einleitung). Es zeigte sich mit diesem Ak ein Signal in den Pyramidenzellen der CA1, CA2 und CA3 Region sowie in den Zellkörpern des Gyrus Dentatus. Zudem zeigte sich ein „halbmondförmiges“ Band apikal der Pyramidenzell-Schicht in CA3 (Abb. 7 A, B).

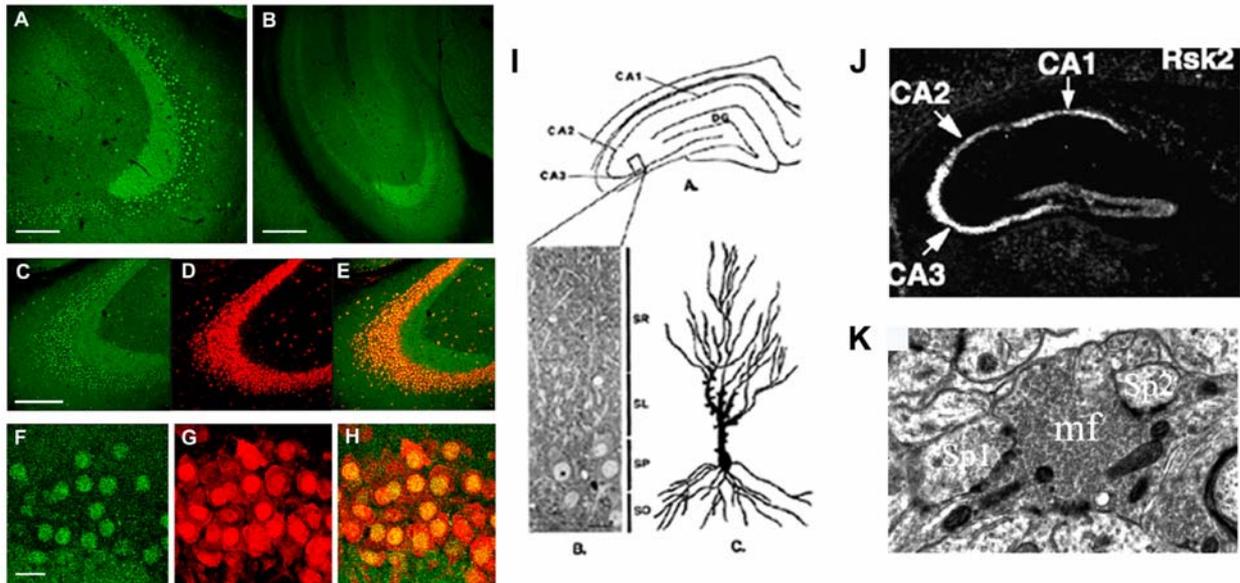


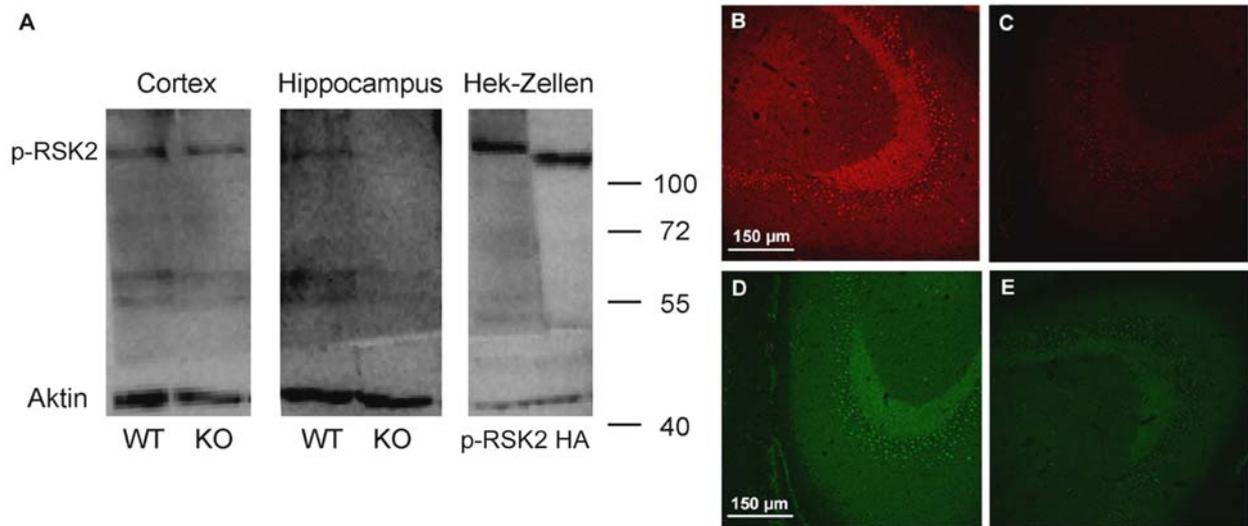
Abb. 7: Immunhistochemie des Hippocampus mit einem *p-RSK2* Antikörper. Es zeigt sich eine Anfärbung der Pyramidenzellen der CA1, CA2 und CA3-Region sowie, schwächer, auch der Körnerzellen des Gyrus dentatus (A, B). Die Doppelfärbung mit *NEU-N* bestätigt dies (C-H; *p-RSK2*:grün, *NeuN*: rot). F-H stellt CA3 Pyramidenzellen dar. Auffällig ist die Färbung der Region des synaptischen Kontakts zwischen Moosfaserterminalen und Pyramidenzellendriten in der CA3-Region (A, B). In I ist diese Region schematisch dargestellt. SO=Stratum Oriens, SP=Stratum Pyramidale, SL=Stratum Lucidum; SR=Stratum Radiatum, DG=Gyrus Dentatus. Die Moosfaserterminalen kontaktieren die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen (in C. der schematischen Abbildung) im Stratum Lucidum (Abb. aus Magarinos 1997). (J) Verteilungsmuster von *RSK2* im Hippocampus in der in situ Hybridisierung (aus Zeniou 2002). (K) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Moosfaserboutons (mf), der Kontakt zu zwei dendritischen Dornfortsätzen (spines) hat (Sp) (aus Feng 2002). Balken=150  $\mu\text{m}$  in A, 300  $\mu\text{m}$  in B, 200  $\mu\text{m}$  in C-E, 20  $\mu\text{m}$  in F-H.

### 3. 1. 1. Spezifitätskontrolle

Zur Beurteilung der Spezifität des Antikörpers wurde eine Kontrollfärbung ohne 1.Ak unter sonst identischen Bedingungen durchgeführt. Es zeigte sich kein Signal im Konfokalen Mikroskop bei Verwendung der gleichen Laser-Intensität wie in der Färbung mit 1.Ak, was darauf hinweist, daß die Färbung nicht durch eine unspezifische Reaktion des 2.-Antikörpers mit dem Hippocampus-Gewebe zustande kommt (auf eine Abbildung wurde verzichtet). Um zu zeigen, daß der 1.Ak auch genau an das Rsk2-Protein bindet, wurde eine Präadsorptions-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde der p-Rsk2-Ak mit dem kommerziell verfügbaren Rsk2-Peptid, welches zur Herstellung des Antikörpers verwendet worden war, inkubiert. Wenn der Ak an das Peptid bindet, sollte er zusammen mit dem Peptid abzentrifugiert werden können und danach nicht mehr in der Lösung vorhanden sein. Tatsächlich war das Immunfluoreszenz-Signal nach dieser Behandlung nicht mehr vorhanden. Bei der Ähnlichkeit der verschiedenen RSKs auch im Bereich der Phosphorylierungsstelle ist dennoch eine Kreuzreaktion mit den anderen RSK-Formen denkbar. Deshalb wurde eine Spezifitätskontrolle mit der RSK2-KO Maus von A. Hanauer unter sonst identischen Bedingungen durchgeführt. Wenn der Ak ausschließlich an RSK2 bindet, sollte das Signal im Hippocampus der KO-Maus verschwunden sein. Sowohl mit Cy2- als auch Cy3-gekoppelten 2.Ak war das Signal fast vollständig verschwunden (Abb. 8, B-E). Allerdings war noch eine leichte Restfärbung zu sehen, die in der 2.Ak-Kontrolle bei fehlendem 1.Ak nicht zu sehen war. Diese geringe Restfärbung könnte durch eine Kreuzreaktion des p-RSK2-Aks mit z. B. RSK1 oder RSK3 zustandekommen.

Im Western blot von Hippocampus-Gewebe der RSK2-KO Maus war hingegen keine p-RSK2 Bande zu sehen (Abb 8 A). Interessanterweise war im Cortex der KO-Maus das p-RSK2 Signal noch vorhanden. Dies könnte dadurch erklärt werden, daß im Cortex z. B. RSK3 sehr viel stärker exprimiert wird als im Hippocampus. Das Gegenteil gilt für RSK2 (Zeniou 2002). Deshalb dürfte die mögliche Kreuzreaktion des p-RSK2-Aks mit den anderen RSK-Formen im Hippocampus nicht so ins Gewicht fallen. Diese Spezifitätskontrollen zeigen, daß der p-RSK2-Ak im Hippocampus der Maus zumindest vorläufig als brauchbarer Marker der Verteilung

des RSK2-Proteins verwendet werden kann, letztlich aber nicht völlig spezifisch nur die RSK2-Isoform erkennt.



*Abb. 8: Kontrollen der p-RSK2-Antikörper Spezifität. (A) Western-blot mit Cortex- und Hippocampus-Gewebe einer zwei Monate RSK2-KO Maus und einer WT-Kontroll-Maus aus dem gleichen Wurf. Die p-RSK2 Bande ist bei der KO-Maus im Hippocampus verschwunden. Zur Bestimmung der Höhe, auf der das RSK2-Protein läuft wurden HEK293T-Zellen mit HA-gekoppeltem WT-RSK2 mit Hilfe von Lentiviren transfiziert und das Lysat parallel im WB mit aufgetragen (rechtes Drittel in A). Die eine Seite wurde mit dem p-RSK2-Antikörper inkubiert, die andere Seite mit einem HA-Antikörper. Als Beladungskontrolle wurde Aktin verwendet. Das Molekulargewicht wird in kDa angegeben. (B-E) Spezifitätskontrolle des p-RSK2 Antikörpers in der Immunhistochemie. Die Färbung ist im Hippocampus einer zwei Monate alten RSK2-KO Maus (C, E) deutlich reduziert im Vergleich zur WT Kontroll-Maus (B, D). Dies trifft für Cy2 (D, E) und Cy3 (B, C) als 2.-Antikörper zu. Balken=150 μm.*

### 3. 1. 2. Doppelfärbungen mit Prä- und Postsynaptischen Markern

Zur genaueren Lokalisation des RSK2-Proteins wurden mehrere Doppelfärbungen durchgeführt. Zunächst bestätigte die Doppelfärbung von p-RSK2 mit NEU-N, einem Zellkern-Marker, der jedoch auch eine schwächere Färbung im Zytosol aufweist, daß RSK2 in den Pyramidenzellkörpern lokalisiert ist. Es befindet sich dort ausschließlich im Zellkern. In der erwähnten „halbmondförmig“ angefärbten Region liegen die

apikalen Dendriten der CA3 Pyramidenzellen, die dort in synaptischem Kontakt mit den Moosfaser-Terminalen stehen. Um zu beurteilen, ob das RSK2-Protein dort präsynaptisch in den Moosfaser-Boutons oder postsynaptisch in den Dendriten der Pyramidenzellen, in deren Zellkern es exprimiert ist, lokalisiert ist, wurden mehrere Doppelfärbungen mit prä- und postsynaptischen Markern durchgeführt.

Das Vesikelprotein Synaptobrevin oder VAMP2 (Kandel 2000) ist ausschließlich in der Präsynapse lokalisiert. In einer Übersichtsaufnahme ist in der Synaptobrevin-Färbung deutlich die „halbmondförmige“ Struktur wiederzuerkennen. In der starken Vergrößerung in der Abb. 9 A-C sind die Aussparungen der quer angeschnittenen Dendriten zu erkennen. Um die Dendriten herum liegen einige Cluster mit stärkerem Synaptobrevin-Signal. Dies entspricht der Anfärbung der Vesikel in den Moosfaser-Boutons. Die in dieser Vergrößerung in der RSK2-Färbung fleckförmig angefärbten Areale überlappen großteils mit den Synaptobrevin-Clustern. Das RSK2-Protein ist also großflächig in der Präsynapse verteilt.

Als nächstes galt es zu zeigen, daß es keine Überlagerung des RSK2-Signals mit Markern der postsynaptischen Region gibt. Dafür wurden ebenfalls ein breiter verteiltes Protein: MAP-2, sowie ein präzise an der postsynaptischen Membran gelegenes Protein: PSD-95 sichtbar gemacht. MAP-2 ist in Neuronen ausschließlich in Dendriten exprimiert. In der „halbmondförmigen“ Region zeigte sich eine punktförmige Färbung bei quer angeschnittenen Dendriten. Wenn sie längs angeschnitten waren, konnte man ihren Verlauf über einen längeren Bereich verfolgen. Um sicher zu sein, daß MAP-2 auch im Hippocampus genau die Dendriten anfärbt, wurde eine weitere Doppelfärbung mit MAP-2 und Calbindin gemacht (Abb 9 G-I). Von Calbindin ist bekannt, daß es im Hippocampus in den Moosfaser-Terminalen exprimiert wird. Es ergab sich ein komplementäres Färbemuster, so daß davon ausgegangen werden kann, daß MAP-2 im Hippocampus ein valider Dendriten-Marker ist. In der Doppelfärbung MAP-2/RSK2 zeigte sich ein ähnliches Bild (Abb 9 D-F). Die Aussparungen in der RSK2-Färbung waren durch die Dendriten-Färbung besetzt. In einer stärkeren Vergrößerung waren die grünen RSK2-Flecken den roten Dendriten immer genau benachbart, aber nicht überlagert. In der Doppelfärbung mit PSD-95, einem postsynaptischen Protein, welches sich an

der Membran befindet, zeigten sich ebenfalls dicht nebeneinander liegende grüne (RSK2) und rote (PSD-95) Punkte, aber kaum Überlagerungen (Abb 9 J, K).

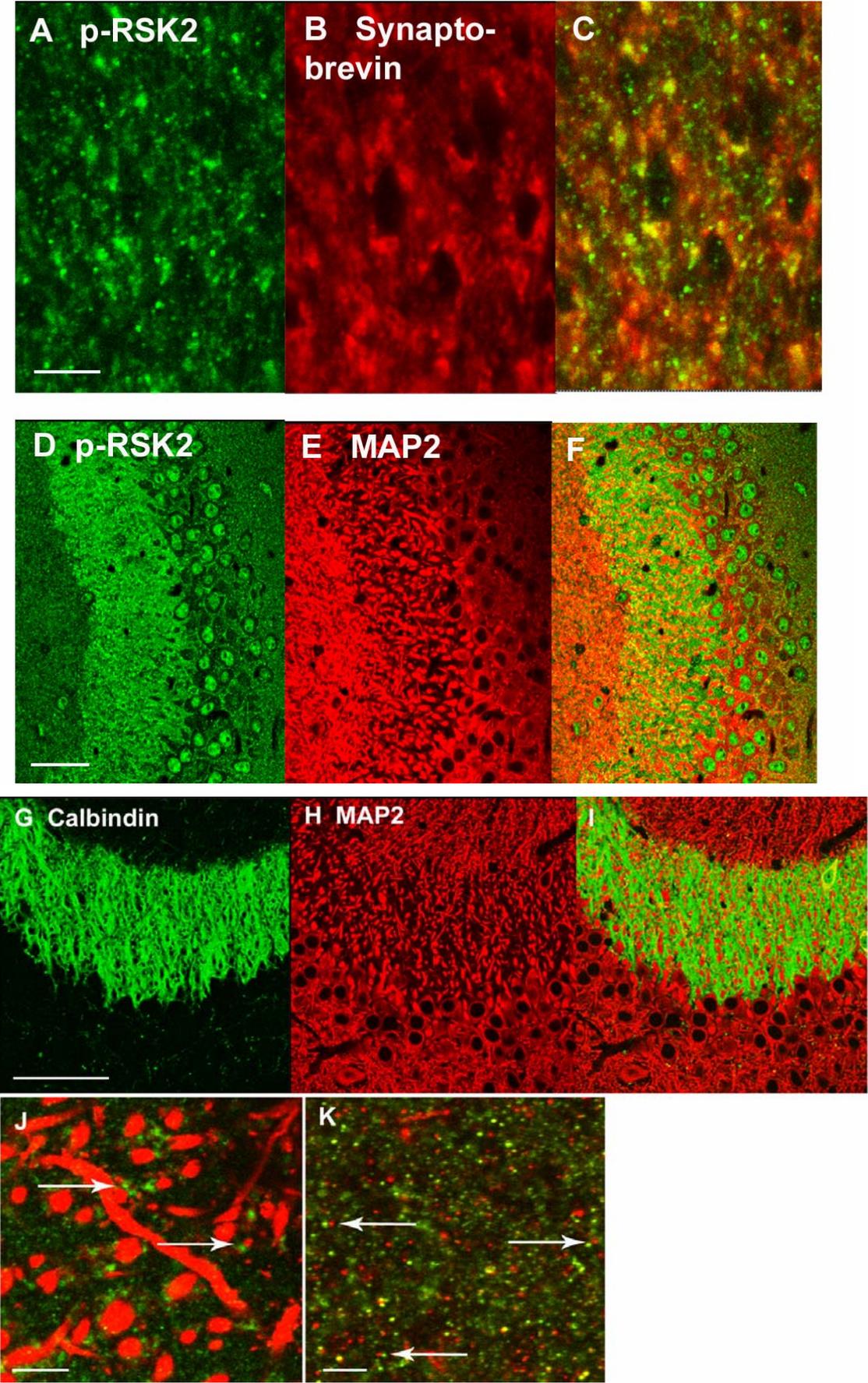


Abb. 9: Doppelfärbungen mit dem *p-RSK2* Antikörper und mit prä- und postsynaptischen Markern in der CA3-Region des Hippocampus der Maus. (A-C) Doppelfärbung *p-RSK2* mit *Synaptobrevin*. (D-F) Doppelfärbung *p-RSK2* mit *MAP-2*. (G-I) Doppelfärbung *Calbindin* mit *MAP-2*. (J) Stärkere Vergrößerung der Doppelfärbung *p-RSK2* mit *MAP-2*. Die den Dendriten unmittelbar benachbart liegenden grünen *p-RSK2* Flecken sind durch Pfeile gekennzeichnet. (K) Doppelfärbung *p-RSK2* mit *PSD-95*. Die benachbart liegenden roten und grünen Punkte sind durch Pfeile markiert. Balken=5  $\mu\text{m}$  in A-C, 50  $\mu\text{m}$  in D-F; 75  $\mu\text{m}$  in G-I, 5  $\mu\text{m}$  in J, K.

Nach diesen Befunden ist das RSK2-Protein im Gehirn der Maus also in der Kontaktregion zwischen Moosfasern und Pyramidenzellendriten in CA3 im Hippocampus der Maus präsynaptisch lokalisiert. Ob und wie dort die Funktion dieser Synapsen beeinflusst wird, ist derzeit nicht bekannt. Um mehr über die Funktionen von RSK2 auf neuronaler Ebene zu erfahren, wurden RSK2-KO Mäuse, die im Labor von A. Hanauer in Straßburg generiert worden waren, untersucht. Außer für die Spezifitätskontrolle des *p-RSK2*-Aks konnten diese Mäuse nicht für weitere Untersuchungen am Gehirn benutzt werden, da die Gruppe von A. Hanauer die Mäuse diesbezüglich für sich beanspruchte. Die ausschließliche Verwendung der Mäuse zur Untersuchung der Motoneurone wurde vereinbart.

### 3. 2. Untersuchungen an Motoneuronen der Maus

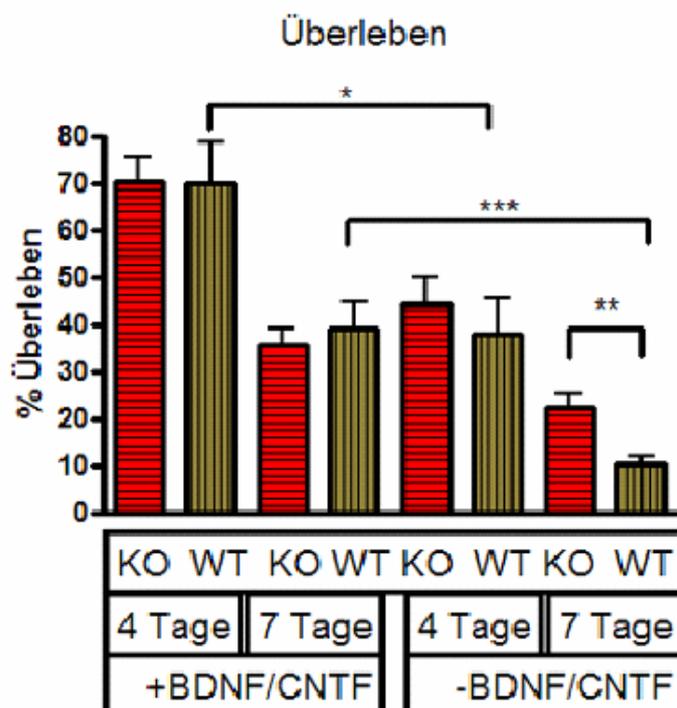
Ein Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf Untersuchungen von Motoneuronen *in vivo* und *in vitro*. Ein Großteil der Ergebnisse wurde in „Molecular and Cellular Neuroscience“ veröffentlicht (Fischer(a), 2009). Fortan werden die Motoneurone von männlichen, hemizygoten RSK2-KO Mäusen ( $\text{RSK2}^{\text{y/-}}$ ) meist kurz als RSK2-KO Motoneurone oder einfach KO-Neurone bezeichnet.

Da gezeigt worden war, daß RSK2 einen Einfluß auf das Überleben von Zellen hat (Bonni 1999, Hauge 2006) wurde zunächst die Überlebensrate von Motoneuronen sowohl in Zellkultur als auch im Nervensystem der adulten Maus bestimmt.

### 3. 2. 1. Überleben von Motoneuronen von RSK2-KO Mäusen *in vitro*

Es wurde das Überleben von Motoneuronen unter dem Einfluß von neurotrophen Faktoren getestet, da RSKs Teil der Signalkaskade unterhalb der Neurotrophin-Rezeptoren sind, so z.B. unterhalb von TrkA in PC12 Zellen oder unterhalb von TrkB in corticalen Neuronen (Rakhit 2004, Silverman 2004). Das Überleben der ausplattierten Motoneurone wurde nach vier und sieben Tagen bestimmt und in Beziehung zur ursprünglich ausgesäten Anzahl an Motoneuronen auf dem Deckgläschen gesetzt (Abb 10). Es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen Neuronen von WT Kontrollmäusen und den entsprechenden hemizygoten RSK2-KO-Männchen von dem selben Muttertier unter den Standardbedingungen mit den zum Überleben notwendigen neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF. In diesem Fall scheint RSK2 ohne Bedeutung für den Zelltod zu sein. Zur Kontrolle wurden in einem parallelen Experiment die neurotrophen Faktoren weggelassen. Wie erwartet war das Überleben der Motoneurone reduziert. Interessanterweise überlebten nach sieben Tagen unter diesen Bedingungen die KO-Neurone signifikant besser als die WT-Neurone.

Abb. 10: Überleben von primären Motoneuronen in Zellkultur nach vier und sieben Tagen von RSK2-KO und -WT Mäusen mit und ohne Behandlung mit neurotrophen



Faktoren (BDNF und CNTF). Mit Faktoren besteht kein Unterschied zwischen den Genotypen, unter Weglassung der Faktoren ist nach 7 Tagen das Überleben von KO-Neuronen erhöht. Die N-Zahl pro Balken bezüglich der Embryonen beträgt von links nach rechts: 14, 7, 18, 11, 14, 7, 14, 7. Die Daten stammen aus insgesamt drei Motoneuronpräparationen. Der %-Wert bezieht sich auf die

Ausgangszahl an Motoneuronen nach dem Ausplattieren.

### 3. 2. 2. Überleben der Motoneurone *in vivo*

Ob RSK2 einen Einfluß auf das Überleben von Motoneuronen *in vivo* hat, wurde durch Zählung von Motoneuronenzellkörpern im lumbalen Rückenmark und im Nucleus facialis untersucht. Außerdem wurden die Axone im N. phrenicus bei RSK2-KO und WT-Mäusen gezählt. Bei den zwei Monate alten männlichen Tieren zeigten sich jeweils keine Unterschiede. RSK2 hat offenbar auch *in vivo* keinen Einfluß auf das Überleben (Abb 11).

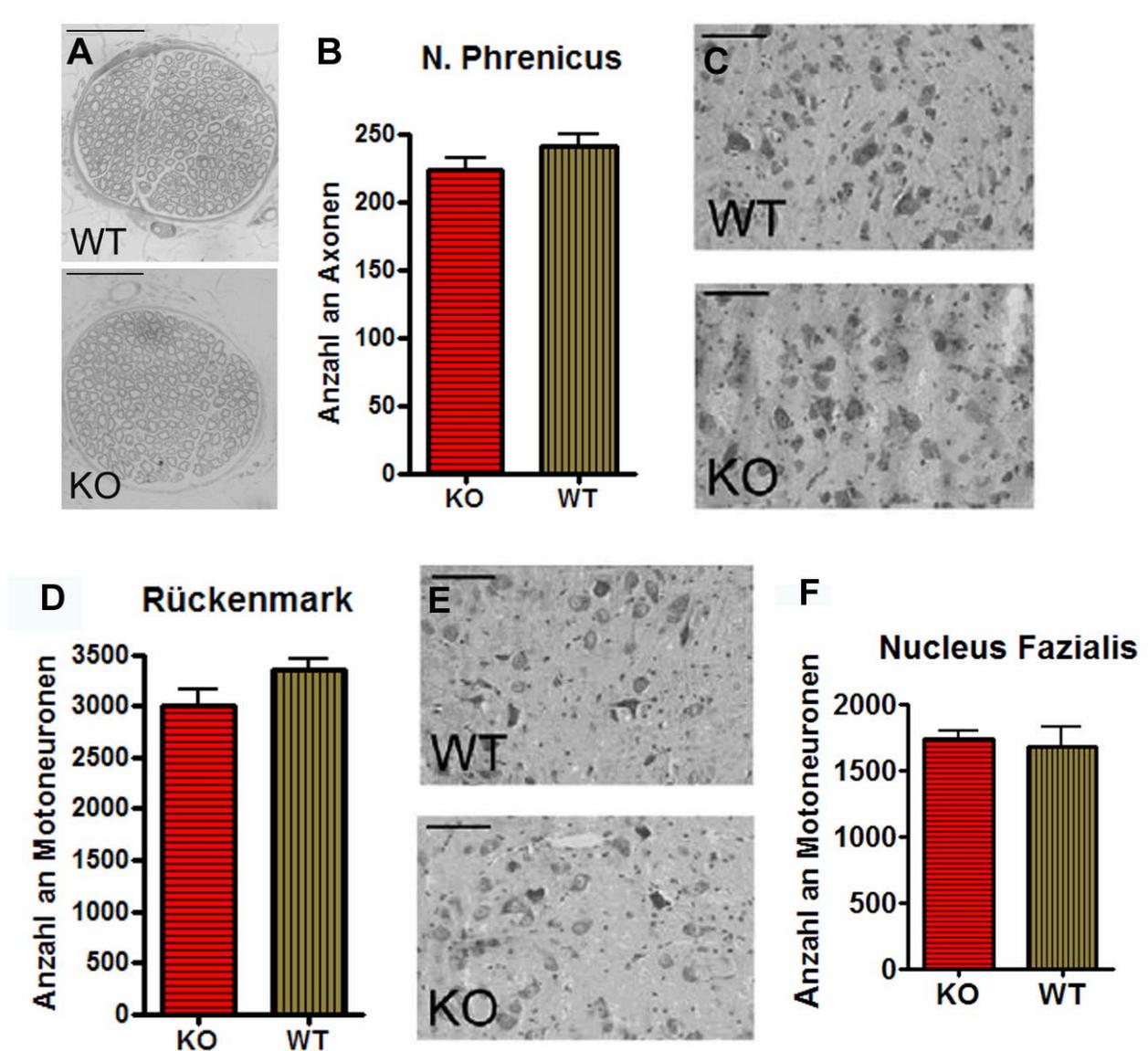


Abb. 11: Motoneuronzahl *in vivo*. (A) Beispielhafter Schnitt durch den N. phrenicus einer RSK2-KO und einer WT-Maus aus dem selben Wurf, angefärbt mit Azur-

*Methylenblau; Balken=50 µm. Die Anzahl der myelinisierten Axone war bei KO und WT gleich; N=3 (B). Ebenso war die Anzahl der Motoneuron-Zellkörper im lumbalen Rückenmark (D; N=4) und im Nucleus Fazialis (F; N=8) nicht verändert. Beispielhafte Nissl-Färbungen aus dem lumbalen Rückenmark (C) und dem Fazialis-Kerngebiet (E). Balken in C und E=100 µm.*

### 3. 2. 3. Axonwachstum *in vitro* bei Motoneuronen von RSK2-KO Mäusen

Identisches Überleben ist eine Voraussetzung für den Vergleich des Neuritenwachstums. Ansonsten könnte ein selektives Wachstum von Subpopulationen, die sich hinsichtlich des Axonwachstums unterscheiden, diese Größe beeinflussen. Das Axonwachstum wurde ausschließlich in Gegenwart von BDNF und CNTF untersucht. Hier zeigte sich nach sieben Tagen in Kultur überraschenderweise ein stärkeres Axonwachstum bei den KO-Neuronen. Dies traf sowohl auf den Hauptstamm des Axons als auch auf die Gesamtlänge von Hauptstamm plus Verzweigungen zu (Abb 12 A). Bei den Dendriten gab es eine Tendenz zu längerem Wachstum bei RSK2-KO Neuronen, der Unterschied war aber wechselnd und nicht signifikant.

Die Länge eines Axons mit Verzweigungen wird unter anderem durch die Anzahl der Verzweigungen bestimmt. Das Ergebnis der Zählung der Verzweigungen war, daß ein WT-Neuron im Durchschnitt zwei Endigungen zusätzlich zur Endigung des Hauptastes hatte. Ein KO-Neuron hatte signifikant mehr Verzweigungen, nämlich drei (Abb 12 C). Damit ist die Zunahme der Zahl an Verzweigungen in etwa proportional zur Längenzunahme des Hauptastes, was bedeutet, daß die Zahl an Verzweigungen pro Länge des Hauptastes bei KO-Neuronen nicht verändert ist. Die durchschnittliche Länge eines Nebenastes betrug für KO-Neurone 44,1 µm und für WT-Neurone 49,1 µm und war damit nicht wesentlich verschieden.

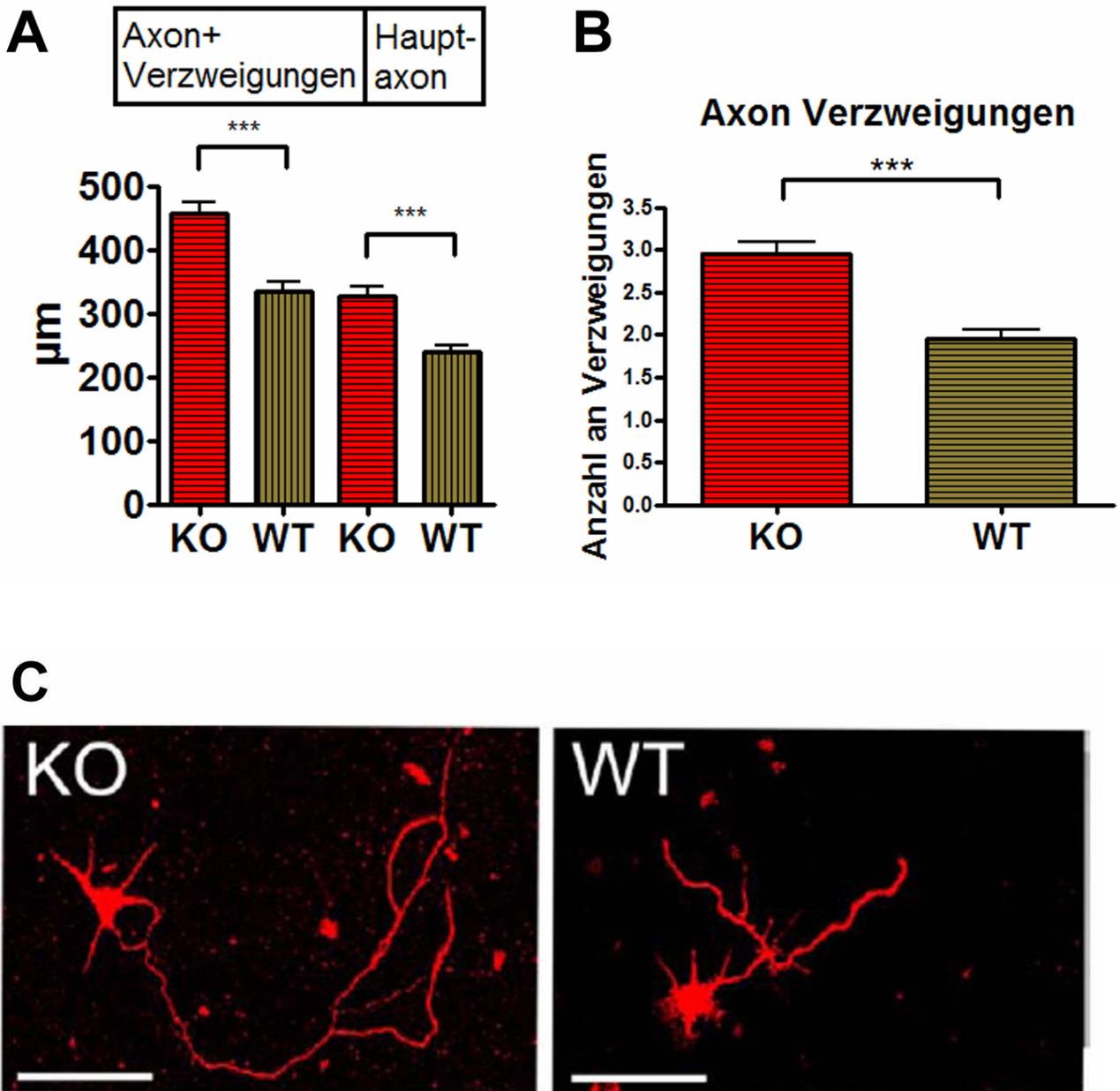


Abb. 12: (A) Länge von Axon plus Verzweigungen und Hauptaxon von Motoneuronen nach sieben Tagen in Kultur. Verglichen wurden Neurone von RSK2-KO Embryonen und WT-Kontrollen aus der selben Präparation. Die Längenmessungen aus drei verschiedenen Motoneuronpräparationen mit insgesamt sechs KO-Embryonen und fünf WT-Embryonen wurden miteinander kombiniert. KO: N=336; WT: N=264 bezüglich Anzahl der Motoneurone insgesamt. (B) Zahl der Verzweigungen eines Motoneuron-Axons. Die Anzahl gibt die Verzweigungen bzw. Endigungen ohne Berücksichtigung der Hauptstammendigung wieder. (C) Repräsentative Bilder eines KO- und eines WT-Motoneurons, angefärbt mit anti-Tau. Balken=100  $\mu\text{m}$ .

Als nächstes wurde die Größe der Wachstumskegel bestimmt. Dazu wurden sie mit anti- $\beta$ -Aktin angefärbt. Die durchschnittliche Fläche eines Wachstumskegels betrug ca.  $20 \mu\text{m}^2$ . Die Wachstumskegel von KO-Neuronen waren kleiner als die von WT-Neuronen (Abb 13). Der Unterschied war signifikant, betrug jedoch nur etwa  $2 \mu\text{m}^2$ . Die Anzahl kollabierter Wachstumskegel, die sich also in ihrer Breite nicht wesentlich vom Axon unterschieden, betrug bei KO-Neuronen 13% und bei WT-Neuronen 14% und war damit nicht verschieden.

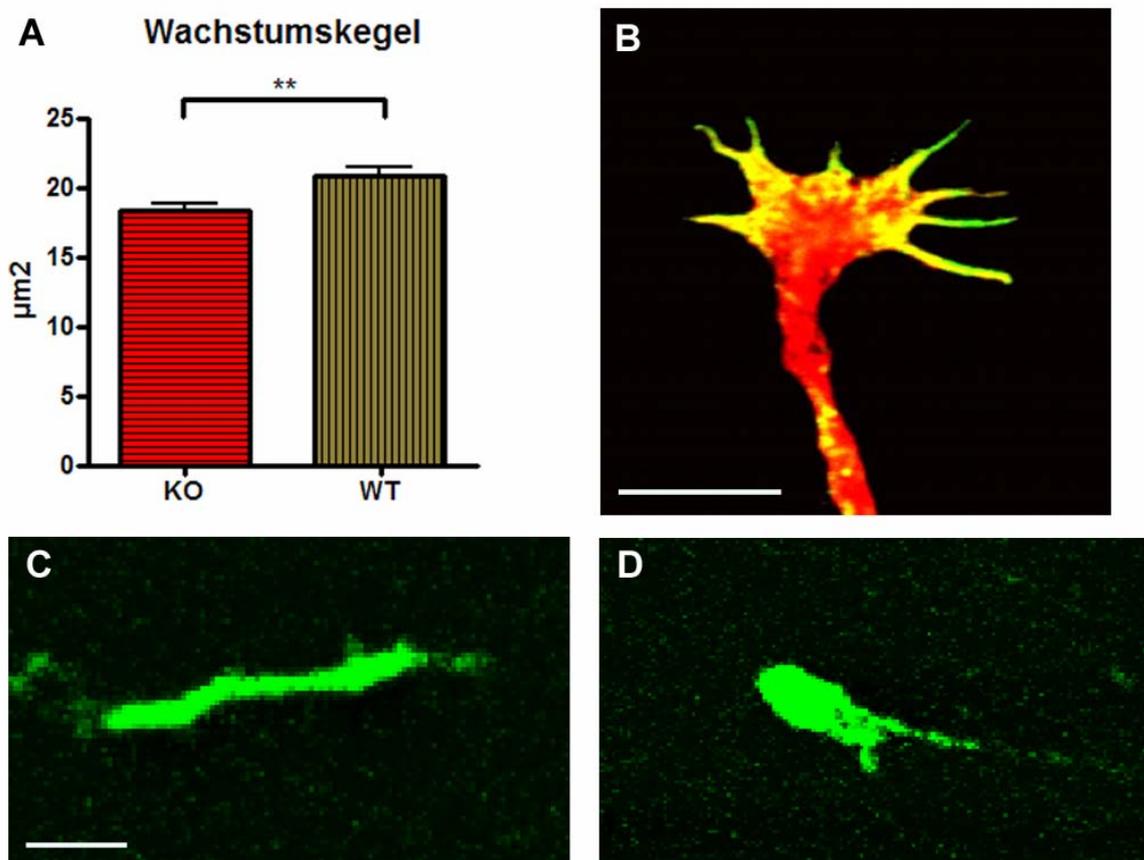


Abb. 13: (A) Die Wachstumskegel sind bei RSK2-KO-Motoneuronen signifikant kleiner als beim WT. Der Unterschied ist jedoch minimal.  $N=491$  für KO;  $N=378$  für WT. (B) Aufnahme eines relativ großen Wachstumskegels mit Filopodien eines RSK2-KO Motoneurons (*anti-Tau: rot, anti- $\beta$ Aktin: grün*; Überlagerung erscheint gelb). (C) Beispiel eines kollabierten WT-Wachstumskegels. (D) Beispiel eines normalen, nicht-kollabierten WT-Wachstumskegels. Balken= $5 \mu\text{m}$  in B-D.

### 3. 2. 4. Die neuromuskuläre Synapse *in vivo*

Um zu beurteilen, ob die veränderten Wachstumseigenschaften der Motoneurone sich *in vivo* auf die Kontaktregion zwischen Neuron und Muskel, die neuromuskuläre Endplatte, auswirken, wurde mit  $\alpha$ -Bungarotoxin die postsynaptische Region im Muskulus deltoideus bei zwei Monate alten männlichen Mäusen angefärbt. Die Größe der Fläche dieses postsynaptischen Acetylcholinrezeptor-reichen Areal lässt in etwa auf die Größe der präsynaptischen Region zurückschließen. Bei RSK2-KO Mäusen war die durch Bungarotoxin angefärbte Region vergrößert, der Unterschied war höchst signifikant (Abb 14 A). Als zusätzlicher Parameter wurde die Anzahl an Verzweigungen ausgezählt, wozu 3D rekonstruierte Bilder verwendet wurden, um durch Überlagerung unsichtbar gemachte Strukturen mitzuerfassen (Abb 14 B). Diese zusätzlichen Präparationen, Färbungen und 3D Rekonstruktionen wurden von Christian Simon angefertigt. Endplatten von RSK2-KO Mäusen hatten signifikant mehr Verzweigungen. RSK2 hat also einen Einfluß auf die Morphologie der Postsynapse.

Um die präsynaptische Region direkt beurteilen zu können wurden motorische Endplatten mit einem Antikörper gegen den Spannungs-gesteuerten N-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ( $\text{Ca}_v2.2$ ) gefärbt (Westenbroek 1992). Dieser hauptsächlich embryonal exprimierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal kommt zusammen mit dem P/Q-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ( $\text{Ca}_v2.1$ ) auch an der adulten Endplatte vor (Pardo 2006) und lieferte eine bessere Färbung mit dem entsprechenden Antikörper als der P/Q-Typ Kanal-Ak. Zudem wurde das CAZ-associated structural protein 2 (CAST2), welches wie  $\text{Ca}_v2.2$  präsynaptisch an der aktiven Zone lokalisiert ist, untersucht. Für beide Färbungen wurden die fluoreszierenden Flächen umfahren und in diesem Bereich die mittlere Fluoreszenzstärke quantifiziert. Die Größe des umfahrenen Areals spielt dabei keine Rolle, da die mittlere Fluoreszenz pro Fläche bestimmt wurde. Bei beiden Antigenen war die mittlere Fluoreszenzstärke pro Fläche bei RSK2-KO Mäusen stärker (Abb 14 C). Daraus kann man nicht schließen, daß die präsynaptische Fläche ähnlich wie die postsynaptische größer ist, es weist aber darauf hin, daß in der KO-Präsynapse wichtige struktur-bildende Proteine stärker vertreten sind. Da im embryonalen Rückenmark von RSK2-KO Mäusen die ERK-Phosphorylierung erhöht war (siehe 3. 2. 8.) wurde an der muskulären Endplatte mit dem selben p-ERK-Antikörper eine

Färbung durchgeführt. Auch hier war bei KO Mäusen mehr p-ERK Signal vorhanden, wobei es wieder nicht auf die untersuchte Fläche ankommt da die mittlere Intensität pro Fläche bestimmt wurde (Abb 14 D).

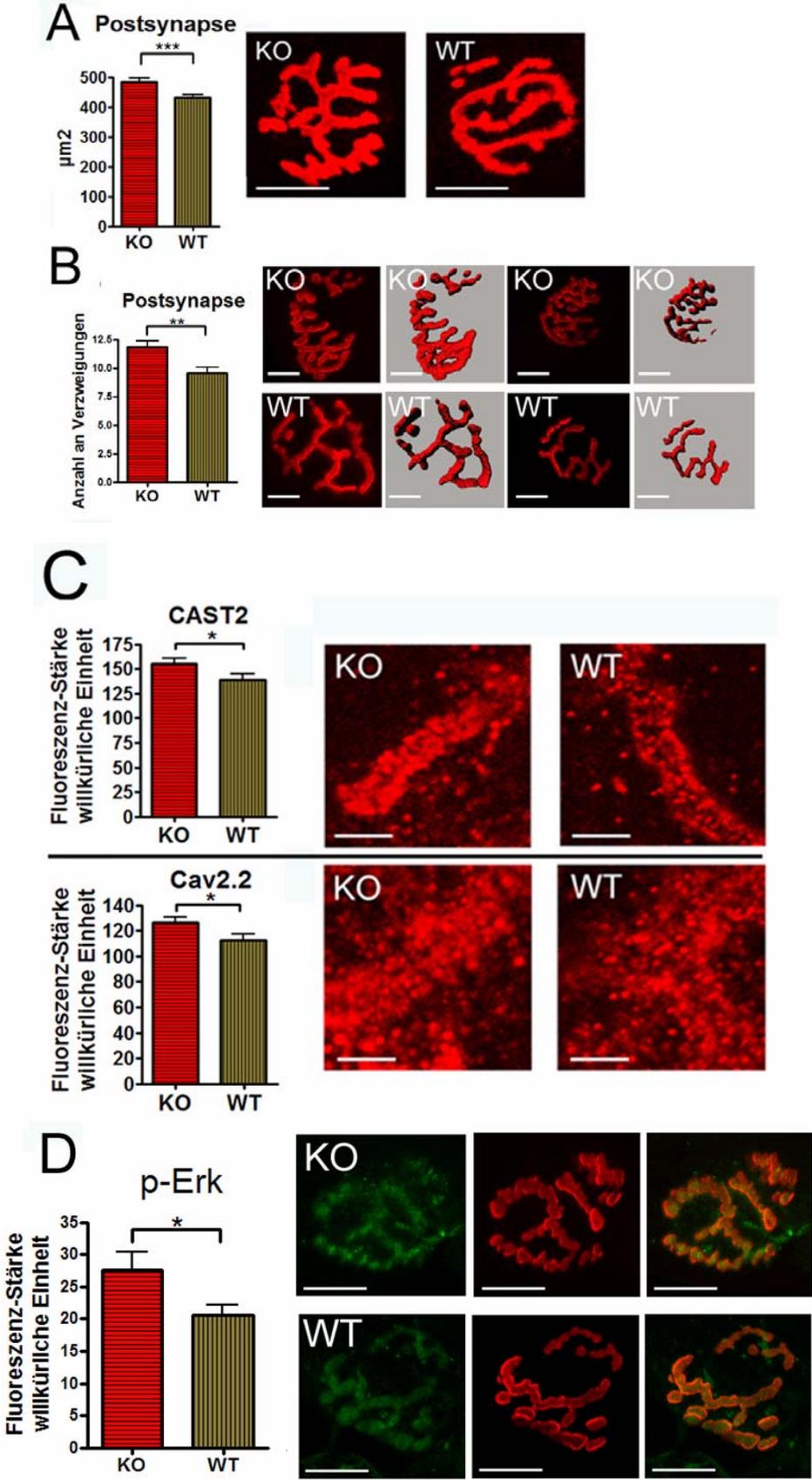


Abb. 14: Untersuchung der neuromuskulären Endplatte im Musculus deltoideus bei zwei Monate (A und C) und drei Monate (B und D) alten RSK2-KO und WT-Mäusen aus jeweils dem selben Wurf. (A) Die Endplatte ist bei KO Mäusen signifikant größer als bei WT-Mäusen. Gefärbt wurde die postsynaptische Region mit  $\alpha$ -Bungarotoxin. N=110 für KO; N=132 für WT. Balken=20  $\mu$ m. (B) Anzahl der Verzweigungen an der Postsynapse. KO-Endplatten haben mehr Verzweigungen, bestimmt aus 3D-Rekonstruktionen nach Anfärbung mit  $\alpha$ -Bungarotoxin. Jeweils zwei Beispiel-Endplatten für KO und WT im Original und als 3D-Rekonstruktion. Balken=10  $\mu$ m. (C) Untersuchung der Präsynapse mit einem CAST2- und  $Ca^{2+}$ -Kanal-Antikörper. Bei KO-Endplatten ist die Färbung stärker. Balken=3  $\mu$ m. (D) p-ERK-Färbung an der Postsynapse. Das p-ERK Signal fällt bei RSK2-KO Endplatten signifikant stärker aus. Links/grün: p-ERK; Mitte/rot:  $\alpha$ -Bungarotoxin; rechts: Überlagerung. Balken=10  $\mu$ m.

### 3. 2. 5. Überleben und Neuritenwachstum von Virus-transfizierten Motoneuronen *in vitro*

#### 3. 2. 5. 1. Herstellung der Lentiviren

Zusätzlich zu den Experimenten mit Motoneuronen von RSK2-KO Mäusen wurden C57Bl/6 WT Maus-Motoneurone *in vitro* untersucht, welche mit verschiedenen RSK2-Konstrukten transfiziert wurden. Da bei Motoneuronen durch Elektroporation nur ca. 5% der Neurone transfiziert werden, wurden Lentiviren verwendet, die eine Transfektionseffizienz von ca. 50% erreichen (Bender 2006). Zunächst wurden die Viren kloniert (siehe Materialien und Methoden) und in HEK-Zellen hergestellt (Abb 15 B), wobei ein PGJ3-Vektor mit RSK2-Konstrukt und der VSV-G-Vektor, der das Hüllprotein kodiert, zur Virenherstellung kombiniert werden müssen. Die HA-getagten Konstrukte (WT, ein konstitutiv aktives Konstrukt mit einer Deletion, ein konstitutiv aktives Konstrukt mit einer Punktmutation (A statt Y) und ein Kinase-inaktives Konstrukt, fortan als W, D, Y und K bezeichnet) konnten mit Hilfe des HA-Antikörpers nicht in Motoneuronen detektiert werden so daß für diese vier Konstrukte zusätzlich noch Lentiviren hergestellt wurden, die den stärkeren CMV Promotor statt dem SFFV Promotor und GFP statt HA als tag enthielten. Diese Konstrukte konnten in Motoneuronen detektiert werden.

Ein Western blot aus transfizierten HEK-Zellen, also den Zellen, die zur Virusproduktion benutzt worden waren, zeigte mit dem HA-Ak Banden bei ca. 100 kDa für W, Y und K (Abb 15 A). Bei D mit der C-terminalen Deletion von 50 As lief die Bande etwas niedriger. Als Kontrolle wurden HEK-Zellen verwendet, die mit einem PGJ3-Vektor ohne RSK2-Konstrukt und dem VSV-G-Vektor transfiziert worden waren. Hier zeigte sich keine Bande. Zusätzliche Banden bei ca. 55 kDa, deren Bedeutung ungeklärt ist, liefen alle auf gleicher Höhe. Ein zweiter WB mit den gleichen Proben wurde mit zwei Santa Cruz RSK2-Ak und dem p-RSK2-AK, der für die Hippocampus-Immunhistochemie verwendet wurde, inkubiert (in Abb. 15 ist nur der WB mit monoklonalem Santa Cruz Ak dargestellt). Es zeigten sich Doppelbanden bei ca. 100 kDa für die HA-getaggte und die endogene Form von RSK2. In der Kontrolle mit PGJ3-Vektor ohne RSK2-Konstrukt zeigte sich nur die leichtere Bande des endogenen RSK2. Das „D“-Konstrukt lieferte eine Bande, die auf Höhe der endogenen Bande lief (Abb. 15 A). Damit ist gezeigt, daß durch die Konstrukte entsprechende RSK2-Proteine produziert werden. Für die Viren mit GFP-tag und CMV-Promotor wurde kein WB durchgeführt. Hier wurde auf das Ergebnis der Sequenzierung und die sichtbare Immunfluoreszenz in den entsprechenden Zellen vertraut. Alle acht Virus-Konstrukte wurden auch für die Infektion von PC12-Zellen verwendet (siehe Abb. 19).

### 3. 2. 5. 2. Kultur infizierter Motoneurone

Motoneurone konnten nur mit den GFP/CMV-Viren sichtbar infiziert werden. Für das Ausmessen der Neuritenlänge wurden nur stark grün leuchtende und damit unzweifelhaft infizierte Zellen ausgewählt. In Abb 15 C und D ist ein mit Y infiziertes Motoneuron neben einem nicht infizierten Motoneuron zu sehen. Als Ergebnis der Längenmessung der infizierten Motoneurone zeigte sich, daß als einziges Konstrukt D einen Einfluß auf das Neuritenwachstum hatte. Das ebenfalls konstitutiv aktive Y hatte, ebenso wie W und K, keinen Einfluß (Abb 16 A). Das Überleben der Motoneurone wurde durch die Vireninfection nicht beeinträchtigt (Abb 16 B).

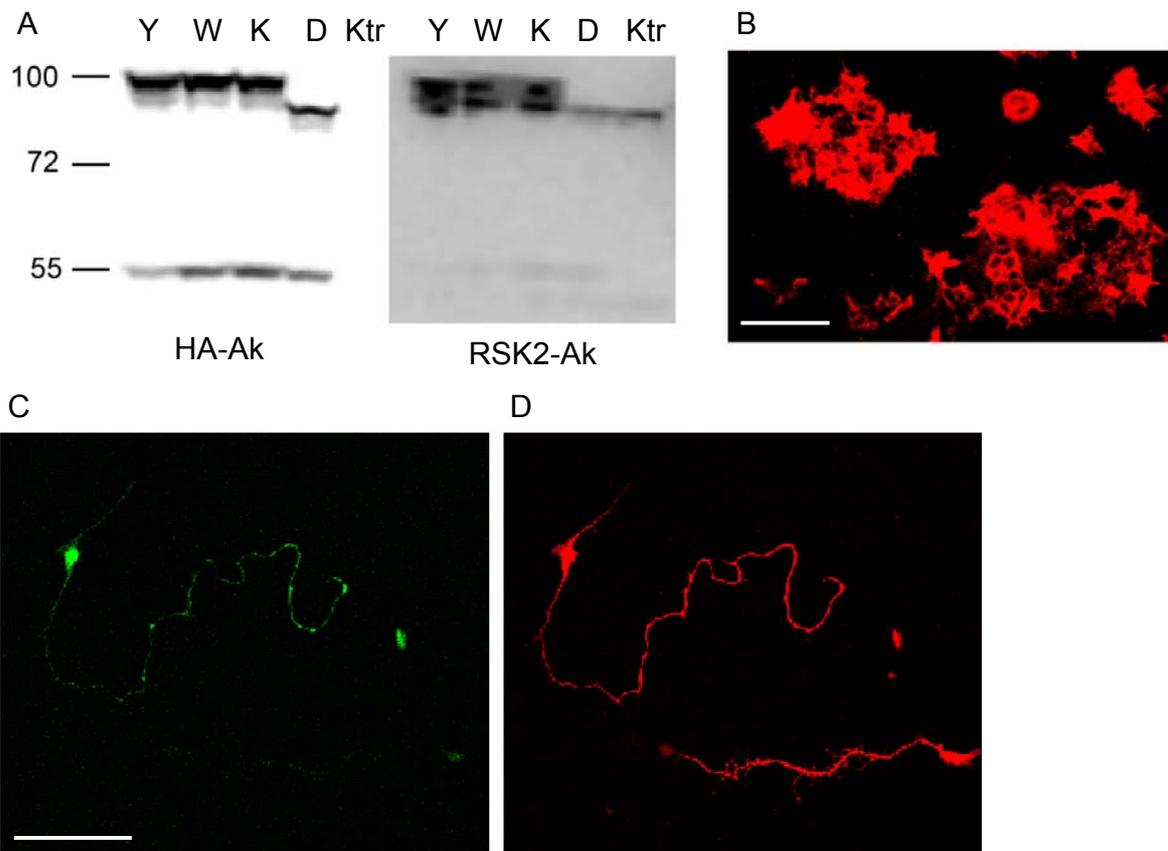


Abb. 15: RSK2-Lentiviren und infizierte Motoneurone. (A) WB von HEK293T-Zell-Lysat von HEK-Zellen, in denen Viren mit SFFV-Promotor und HA-tag hergestellt wurden. Auf der linken Seite wurde der blot mit einem HA-Ak behandelt. Auf der rechten Seite wurde ein monoklonaler RSK2-Ak (Santa Cruz) verwendet. Ktr=Kontrolle. Weitere Abkürzungen siehe Text. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. (B) Immunzytochemie mit HEK293T-Zellen, in denen Viren mit WT-RSK2, SFFV-Promotor und HA-tag hergestellt wurden. Als 1.Ak wurde ein HA-Ak verwendet, als 2.Ak ein Cy3-gekoppelter Ak. Balken=150  $\mu$ m. (C) Ein mit CMV/GFP-Y (konstitutiv aktiv) infiziertes Motoneuron. (D) Gleiches Neuron wie in (C), jedoch mit anti-TAU angefärbt. Man sieht im gleichen Ausschnitt ein weiteres Motoneuron, welches nicht infiziert ist. Balken in C und D= 100  $\mu$ m.

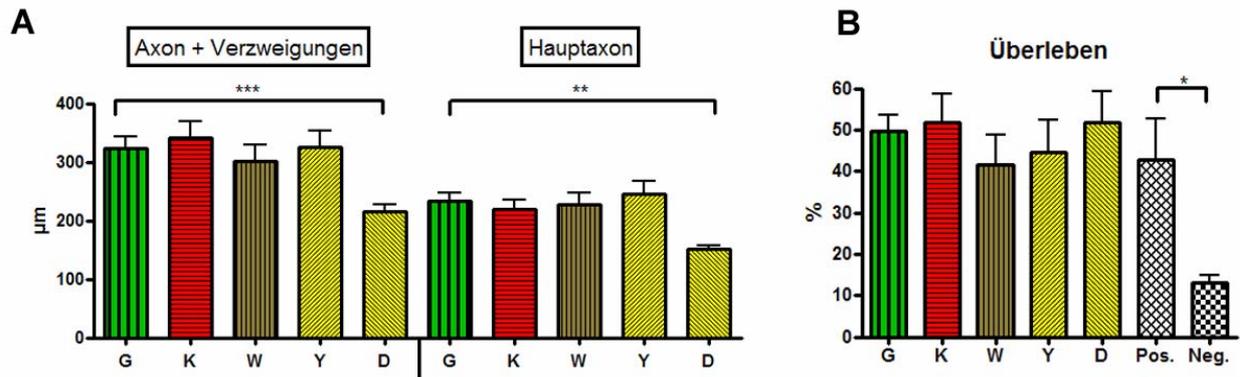


Abb. 16: WT Motoneurone in Gegenwart von BDNF und CNTF wurden mit verschiedenen RSK2-Konstrukten mit Hilfe von Lentiviren transfiziert und das Neuritenwachstum und Überleben bestimmt. (A) Ein signifikanter Unterschied im Neuritenwachstum zeigte sich nur bei dem konstitutiv aktiven Konstrukt mit der Deletion (D), was zu verringertem Axonwachstum führte. Als Kontrolle wurden Viren mit GFP ohne RSK2 verwendet (G). Die N-Zahl bezüglich Motoneuronen beträgt: G: 148; K: 115; W: 131; Y: 120; D: 140. Es wurden drei verschiedene Präparationen durchgeführt, wobei in jeder Präparation die vermischten Motoneurone von drei Embryonen auf die Deckgläschen übertragen wurden. (B) Das Überleben wurde durch die Transfektion nicht verändert. Pos. = Kontrolle ohne Viren und mit BDNF/CNTF. Neg. = Kontrolle ohne Viren und ohne BDNF/CNTF. G=GFP Kontrolle ohne RSK2-Konstrukt. N=6 bezüglich ausgezählter Deckgläschen. Der %-Wert bezieht sich auf die Ausgangszahl an Motoneuronen nach dem Ausplattieren. Zur Beschriftung der X-Achsen siehe Text.

### 3. 2. 6. Lokalisation von RSK2 in kultivierten Motoneuronen

Bislang war vom ZNS nur bekannt, daß RSK2 im Hirnstamm und Rückenmark exprimiert wird (Zeniou 2002), nicht aber, ob es tatsächlich in den in diesen Regionen liegenden motorischen Neuronen vorhanden ist. Um zu untersuchen, ob RSK2 in Motoneuronen exprimiert und in welchen Zellkompartimenten es lokalisiert ist, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Es wurden mehrere kommerzielle RSK2-Ak getestet, von denen die meisten kein spezifisches Signal erbrachten: Zwischen KO- und WT-Motoneuronen war kein Unterschied in der Färbeintensität zu erkennen, was am ehesten durch Kreuzreaktionen mit anderen

RSK-Familienmitgliedern erklärt werden könnte. Es wurden Ak von Abcam, R&D Systems, Invitrogen, Santa Cruz, MoBiTec und Biotrend eingesetzt. Nur der Biotrend-Ak zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen KO und WT (Abb. 17 C), so daß davon auszugehen ist, daß er in Motoneuronen spezifisch RSK2 erkennt. Die 2.Ak-Kontrolle zeigte keine Färbung. In Abb. 17 A und B sind Doppelfärbungen von anti-RSK2 und dem Dendritenmarker MAP2 sowie TAU dargestellt, die zeigen, daß RSK2 in Motoneuronen im Zellkörper, im Nukleus, im Axon und im Wachstumskegel exprimiert ist. Zusätzlich wurde GFP-markiertes WT-RSK2 in Motoneurone transfiziert, wobei die Verteilung sich ebenfalls auf alle Zellkompartimente erstreckte (Abb 17 D). In diesem Fall sieht man unmittelbar das durch GFP leuchtende RSK2-Protein, allerdings nicht das endogen vorkommende, sondern das als cDNA von außen in die Zelle transfizierte. In diesem Fall stößt man nicht auf das Problem der korrekten Antikörper-Bindung.

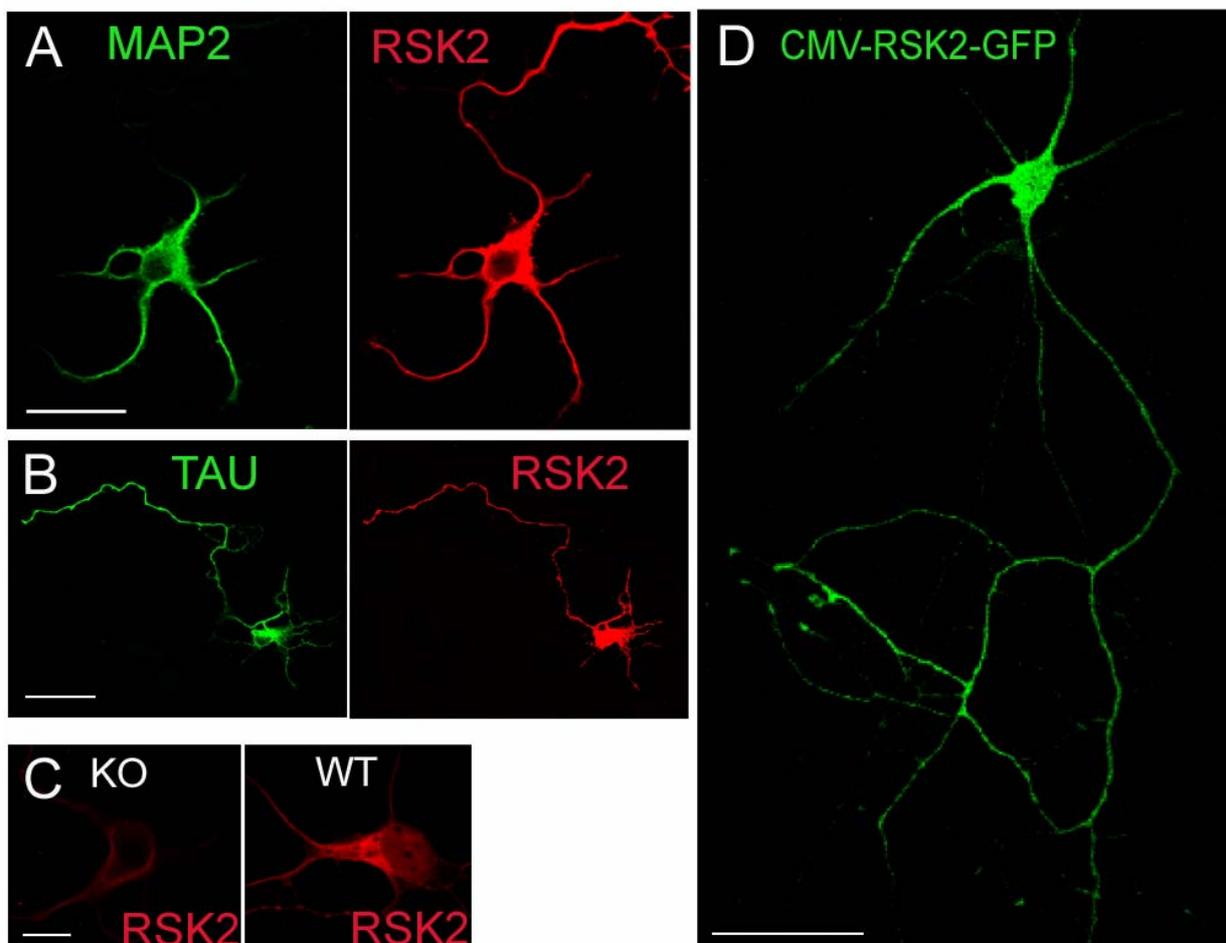
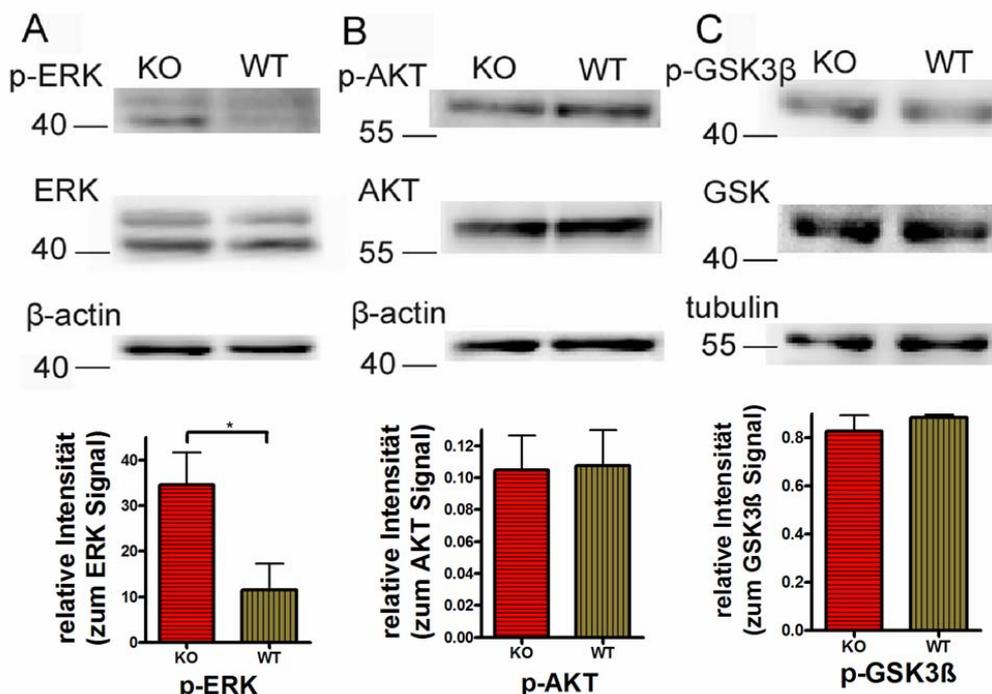


Abb. 17: Immunzytochemische Färbung von Motoneuronen nach sieben Tagen in Kultur. (A) Doppelfärbung *anti-RSK2* (rot), *anti-MAP2* (grün). Balken = 25  $\mu$ m. (B)

Doppelfärbung *anti-RSK2* (rot), *anti-TAU* (grün). Balken = 50  $\mu\text{m}$ . (C) Spezifitätskontrolle mit RSK2-KO Motoneuronen für den abcam RSK2-Ak. Balken = 5  $\mu\text{m}$ . (D) GFP-Fluoreszenz in einem mit *WT-RSK2-GFP* Viren infizierten Motoneuron. Balken = 50  $\mu\text{m}$ .

### 3. 2. 7. Höhere ERK-Phosphorylierung im embryonalen Rückenmark von RSK2-KO Mäusen

Um zu untersuchen, auf welche Weise RSK2 zur Hemmung des Neuritenwachstums bei Motoneuronen führt, wurden in Western blots die Expressionsniveaus und die Phosphorylierung von verschiedenen Kinasen bestimmt, die mit RSK2 interagieren. Es zeigte sich eine höhere ERK 1/2 – Phosphorylierung im RSK2-KO Rückenmark von E12 Embryonen (Abb. 18 A). Die Expression von ERK selbst war nicht verändert. Besonders deutlich war der Unterschied bei der Phospho-ERK2-Bande (p42). Keine Unterschiede wurden bei den Kinasen AKT und GSK3 $\beta$  bezüglich Expression und Phosphorylierung gesehen (Abb. 18 B, C). Im adulten Rückenmark von zwei Monate alten männlichen RSK2-KO Mäusen konnte die veränderte ERK-Phosphorylierung nicht gesehen werden, die Ergebnisse für AKT und GSK3 $\beta$  fielen wie im embryonalen Rückenmark aus (Abb. 18 D-F). Als Beladungskontrolle wurde Tubulin oder  $\beta$ -Aktin verwendet.



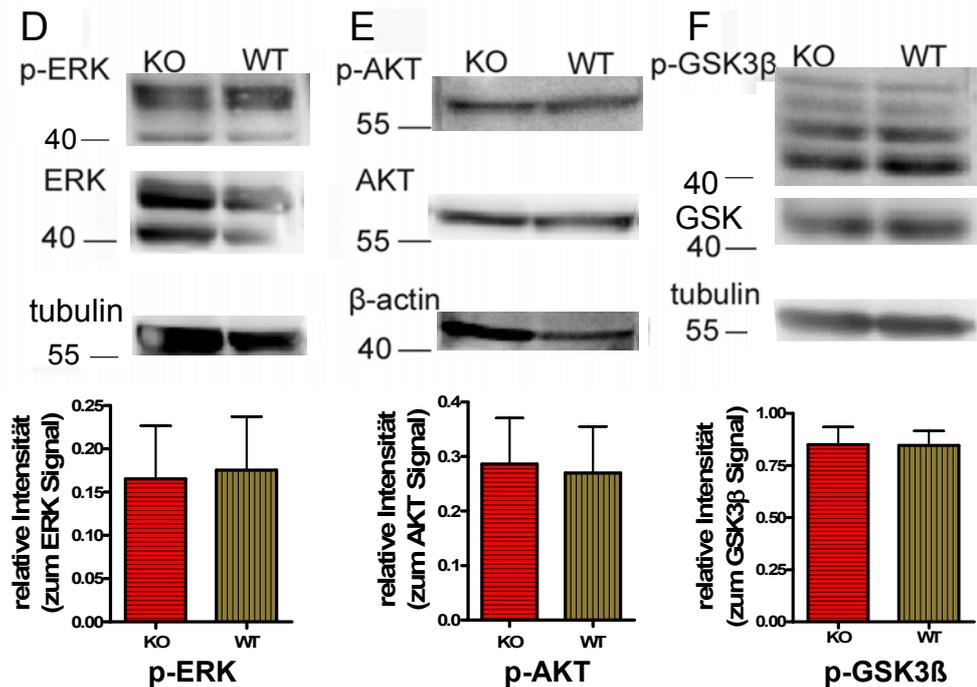


Abb. 18: (A-C) Phosphorylierung und Expressionsniveau von ERK, AKT und GSK3 $\beta$  im Rückenmark von E12 RSK2-KO Embryonen und WT-Kontroll-Embryonen im Western blot. Die Phosphorylierung von ERK 1/2 ist bei fehlendem RSK2 signifikant erhöht (A; N=4). Bei AKT (N=5; B) und GSK3 $\beta$  (N=5; C) liegt kein Unterschied vor. Dargestellt ist der Quotient der Bandenintensitäten der Phospho- und der jeweiligen Kontrollbanden. (D-E) Phosphorylierung und Expressionsniveau von ERK, AKT und GSK3 $\beta$  im Rückenmark von zwei Monate alten RSK2-KO und WT-Kontrollmäusen aus dem selben Wurf im Western blot. In der Phosphorylierung und im Expressionsniveau zeigten sich keine Unterschiede. Dargestellt ist der Quotient der Bandenintensitäten der Phospho- und der jeweiligen Kontrollbanden. N=3 für AKT und GSK3 $\beta$ ; N=4 für ERK.

### 3. 2. 8. Höhere ERK- und AKT-Phosphorylierung in RSK2-KO Motoneuronen *in vitro*

Mit denselben Phospho-Ak, die in den WB Experimenten verwendet wurde, wurden Immunfärbungen mit kultivierten Motoneuronen durchgeführt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden ohne neurotrophe Faktoren 30 Minuten lang BDNF und CNTF ausgesetzt und zeigten im Falle von p-ERK und p-AKT ein punktförmiges Muster im

Zellkörper und teilweise auch in Neuriten. Eine Quantifizierung der Stärke dieser Signale zeigte wie in den WB-Experimenten eine stärkere ERK-Phosphorylierung in den RSK2-KO-Motoneuronen. Im Gegensatz zum WB war auch das p-AKT-Signal in KO-Neuronen signifikant stärker. Bei p-GSK3 $\beta$  war das Signal diffuser und es wurde wegen einer Färbung in Nukleus und Zytoplasma in beiden Regionen getrennt ausgewertet. In beiden Fällen bestand kein Unterschied zwischen KO und WT (Abb. 19 A). Um zu ergründen, was der Hintergrund der punktförmigen Verteilung von p-ERK und p-AKT ist wurde eine Doppelfärbung mit einem Antikörper gegen Cytochrom C Oxidase gemacht, der Mitochondrien markiert. Da der p-ERK-Ak ebenfalls ein Maus-Ak ist konnte nur eine Doppelfärbung mit dem p-AKT-Ak durchgeführt werden. Hier zeigte sich eine klare Überlagerung der Färbung, so daß davon auszugehen ist, daß nach 30 minütiger Stimulation mit neurotrophen Faktoren sich p-AKT an den Mitochondrien befindet (Abb. 12 B). Wegen des sehr ähnlichen Musters ist zu vermuten, daß es sich bei p-ERK ebenso verhält.

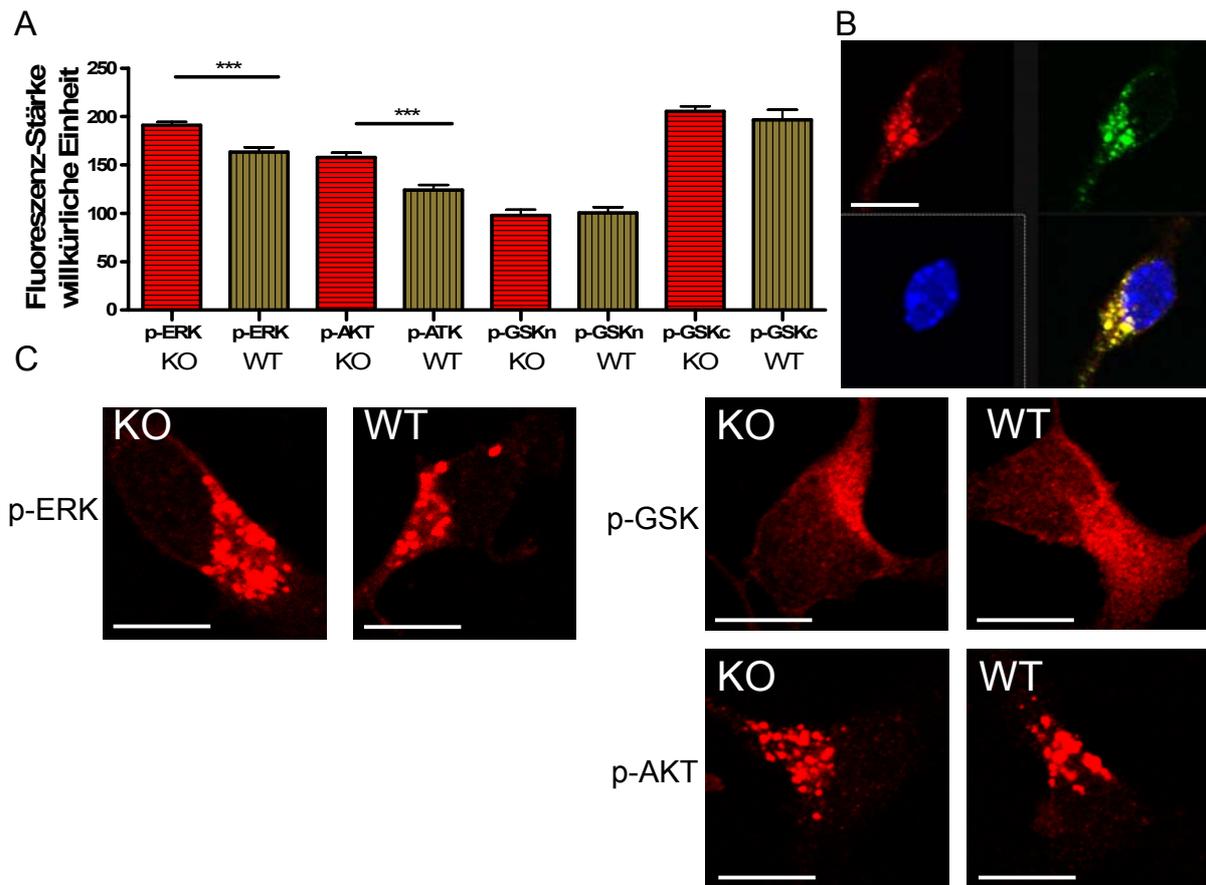


Abb. 19: (A) Phosphorylierung von ERK, AKT und GSK3 $\beta$  in kultivierten Motoneuronen nach einem Tag in Kultur. p-GSKn = nukleäres p-GSK3 $\beta$ ; p-GSKc = zytoplasmatisches p-GSK3 $\beta$ . Das p-ERK und das p-AKT Signal sind in RSK2-KO

Neuronen stärker. Bei *p-GSK3 $\beta$*  besteht kein Unterschied. *P-ERK*, KO: N=120; *p-ERK*, WT: N=126; *p-AKT*, KO: N=94; *p-AKT*, WT: N=93; *p-GSKn* und *p-GSKc*, KO und WT: N=20 (B) Beispielhafte Abbildung eines WT-Motoneurons, welches nach einem Tag in Kultur 30 min lang mit BDNF und CNTF behandelt wurde. Färbung gegen *p-AKT* (rot) und den Mitochondrien-Marker *Cytochrom C Oxidase* (grün). Der Zellkern ist mit *4',6-Diamidin-2'phenylindol dihydrochlorid* (DAPI) angefärbt. Die Doppelfärbung zeigt eine deutliche Kolokalisation von *p-AKT* mit Mitochondrien. Balken=10  $\mu$ m. (C) Repräsentative immunzytochemische Bilder von Motoneuronen, die einen Tag nach dem Ausplattieren 30 min lang mit BDNF und CNTF behandelt worden waren und mit *p-ERK*, *p-GSK3 $\beta$* , und *p-AKT* gefärbt wurden. Balken=10  $\mu$ m.

### 3. 2. 9. Der Mek-Inhibitor U0126 reduziert das überschießende Axonwachstum von RSK2-KO Motoneuronen

Um herauszufinden ob die höhere ERK-Phosphorylierung, die im WB und der Immunhistochemie beobachtet wurde, für die längeren Axone verantwortlich ist, wurden kultivierte Motoneurone mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 behandelt. Die MAPK Kinase MEK1/2 phosphoryliert ERK1/2. Damit sollte in den mit U0126 behandelten Neuronen die ERK-Phosphorylierung reduziert sein. Zunächst bestätigte sich der Längenunterschied zwischen RSK2-KO und -WT Motoneuron-Axonen mit dem Unterschied, daß sich zusätzlich DMSO im Medium befand. In U0126 behandelten Kulturen hatten RSK2-KO Neurone jedoch keine längeren Axone als RSK2-WT-Neurone (Vergleich der beiden rechten Säulen in Abb. 20 A und B). D.h. das übermäßige Axonwachstum im KO wurde auf WT-Niveau reduziert. Andererseits wurde durch den MEK-Inhibitor das Axonwachstum bei WT-Neuronen nicht reduziert (Vergleich der beiden braunen Säulen mit senkrechtem Muster in Abb. 20 A und B). Unter U0126 war die Anzahl an Axon-Verzweigungen vermindert, dies jedoch nicht signifikant (Abb. 20 C).

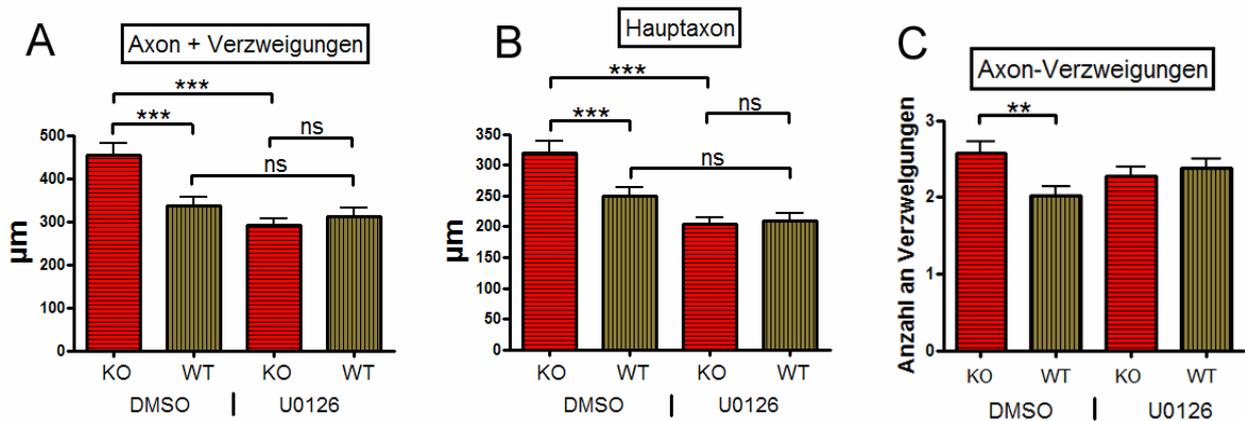


Abb. 20: (A, B) Der MEK-Hemmer U0126 führt dazu, daß RSK2-KO Neurone von der Länge her wildtypisch werden. Wenn man nur DMSO als Kontroll-Medium zu den Kontroll-Kulturen gibt, zeigt sich der bekannte Längenunterschied zwischen WT- und KO-Axonen. Dies gilt sowohl für die Gesamtlänge aller Verzweigungen (A) als auch für das isolierte längste Axon. Die Länge von WT-Neuronen wird durch U0126 nicht reduziert. N-Zahlen in A und B: DMSO: KO: N=110; WT: N=114; U0126: KO: 107; WT: 111. (C) Die Anzahl an Verzweigungen wurde durch U0126 vermindert, jedoch nicht signifikant. Es wurden wieder die Endigungen unter Ausschluß der Hauptaxon-Endigung gezählt. N-Zahlen wie in A und B.

### 3. 2. 10. Spontane Erregbarkeit von kultivierten Motoneuronen

Kultivierte Motoneurone zeigen spontane Depolarisationen. Diese werden durch spannungsabhängige Natrium-Kanäle vermittelt, denn sie können durch Tetrodotoxin inhibiert werden. Sie können durch den Calcium-Sensor FURA2 sichtbar gemacht werden, der bei der mit der Depolarisation einhergehenden intrazellulären Erhöhung von  $Ca^{2+}$  ein Signal erzeugt (siehe Motoneuron-Soma in Abb. 21). Der Inhibitor von N-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen Omega-Conotoxin hemmt solche Signale (Jablonka 2007). Bei Motoneuronen von SMN-KO Mäusen, dem Tiermodell der spinalen Muskelatrophie, korreliert der Axonwachstumsdefekt mit einer Abnahme der spontanen neuronalen Erregbarkeit (Jablonka 2007). Es wurde deshalb von Sibylle Jablonka untersucht, ob bei RSK2-KO Motoneuronen eine Veränderung in der Erregbarkeit besteht. Interessanterweise zeigte sich hier ein drastischer Effekt im Sinne einer Abnahme der Erregbarkeit, ähnlich wie bei SMN-KO Neuronen, wobei RSK2-KO Neurone nicht kürzere sondern längere Axone haben. Nach zwei Tagen in Kultur unter den gleichen

Kulturbedingungen wie bei den Längenmessungen war der Unterschied signifikant für die vier untersuchten Zell-Regionen: Zellkörper (Soma), Dendrit, Axon und Wachstumskegel (Abb. 21). Nach vier Tagen sinkt bei WT-Neuronen schon die Anzahl an Transienten. Wegen des geringeren Unterschieds war die Abnahme der Anzahl an Transienten nur im Soma signifikant. Wenn mehr Zellen getestet worden wären, was nicht erfolgt ist, wäre eine Signifikanz sehr wahrscheinlich auch in den anderen drei Zellkompartimenten erreicht worden, zumal bei KO-Neuronen fast überhaupt keine Transienten mehr auftraten.

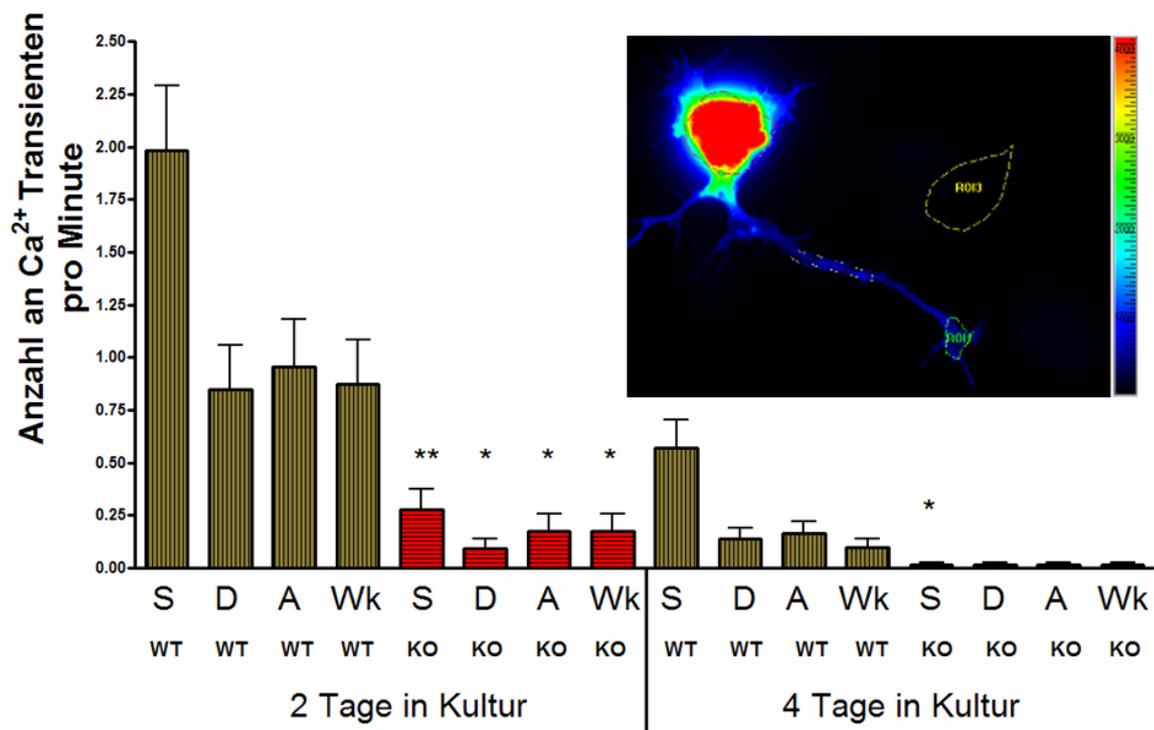


Abb. 21: Messung der spontanen Ca<sup>2+</sup>-Transienten in kultivierten Motoneuronen nach zwei bzw. vier Tagen in Kultur. Nach zwei Tagen produzieren RSK2-KO Neurone signifikant weniger Depolarisationen als die WT-Neurone. Nach vier Tagen zeigen sich in KO-Zellen fast keine Transienten. Der Unterschied ist auf Grund der relativ niedrigen N-Zahl bei kleinem absolutem Unterschied in diesem Fall jedoch nur im Soma signifikant. Es wurden vier Regionen untersucht: S=Soma; D=Dendrit; A=Axon; Wk=Wachstumskegel. Die Abbildung zeigt eine Beispiel-Zelle mit den vier Regionen und einem Ca<sup>2+</sup>-Transienten im Soma. N=25 WT-Neurone und 10 KO-Neurone an Tag 2. N=24 WT-Neurone und 10 KO-Neurone an Tag 4.

### 3. 2. 11. Immunzytochemie im Wachstumskegel von Motoneuronen

Als nächstes galt es, eine Ursache für die Auffälligkeiten im  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging zu finden. Um die Verteilung oder Expression von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in RSK2-KO Motoneuronen zu bestimmen, wurden immunzytochemische Färbungen an Wachstumskegeln durchgeführt. Mit Antikörpern gegen den embryonalen N-Typ ( $\text{Ca}_v2.2$ ) als auch den vornehmlich adult vorkommenden P/Q-Typ ( $\text{Ca}_v2.1$ ) Kanal zeigte sich in Färbungen von zwei bzw. sieben Tagen alten Motoneuronen auf Laminin und Merosin, einer Form von Laminin, die die präsynaptische Anordnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen beeinflusst, kein Unterschied in der Färbeintensität (Abb. 22 A). Ob vielleicht nicht die Menge sondern die Anordnung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle verändert ist, könnte eine Doppelfärbung mit einem anderen an der aktiven Zone vorkommenden Protein zeigen. Bei SMN-KO Motoneuronen war die Überlagerung mit Piccolo, einem aktive Zonen Protein, reduziert (Jablonka 2007). Es ist gezeigt worden, daß die  $\beta 2$  Kette von Merosin, einer Form von Laminin, mit dem Calcium-Kanal  $\text{Ca}_v2.2$  interagiert. Diese Interaktion führt zur präsynaptischen Differenzierung und zur Bildung von Calcium-Kanal Clustern (Nishimune 2004). Falls die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle weniger Cluster bilden könnten, würde sich das relative Färbemuster in einer Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen  $\text{Ca}_v2.2$  und Piccolo verändern. Auch hier war jedoch kein Unterschied in der prozentualen Pixel-Überlagerung zu finden (Abb. 22 B). Offensichtlich muß das auffällige spike-Verhalten einen anderen Grund haben als die Verteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Schließlich wurde auch noch Bassoon, ein weiteres aktive Zonen Protein, betrachtet: Auch hier war kein Unterschied in der Fluoreszenz-Stärke zu finden (Abb 22 C).

### 3. 2. 12. Merosin hemmt das Axonwachstum auch bei RSK2-KO Motoneuronen

Der in Zellkultur beobachtete Axonwachstumsphänotyp führt *in vivo* zu keinen sichtbaren Beeinträchtigungen (siehe unten). Deshalb wurde die Zellkultur auf einem Endplatten-ähnlichen Belag, wie schon bei der Calcium-Kanal Färbung (3. 2. 11.) wiederholt. Die Endplatten-spezifische Laminin-Form ist Laminin 211/221 (Merosin). Das Neuritenwachstum auf diesem Belag ist reduziert (Porter 1995). Möglicherweise könnte Merosin dem Neuron signalisieren, daß es die Endplatte erreicht hat, damit es

das Wachstum einstellt. Die Frage war, ob RSK2-KO Motoneurone in Zellkultur längere Axone haben, weil das verwendete Laminin 111 bei diesen Neuronen das

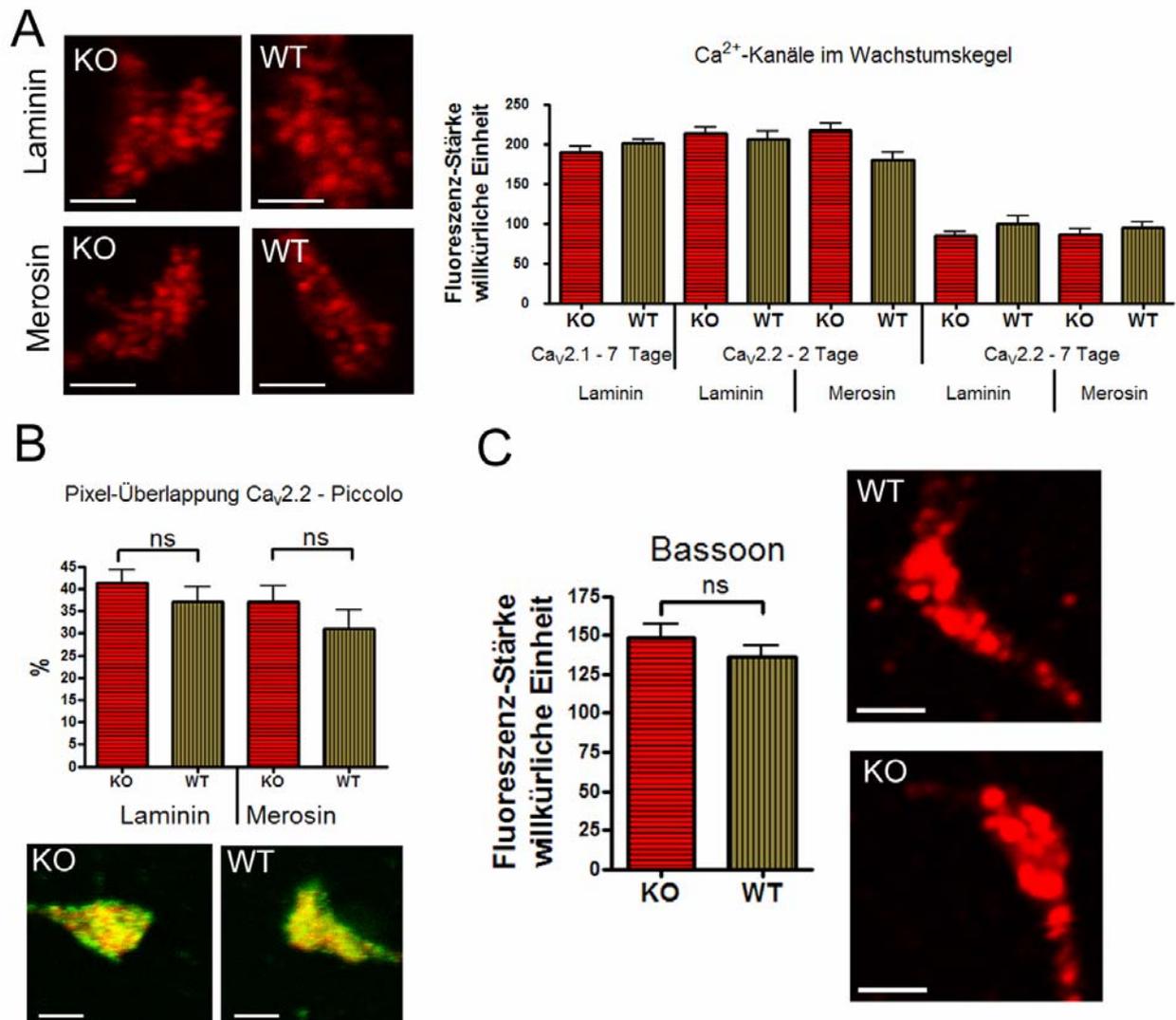


Abb. 22: Immunzytochemie Wachstumskegel. (A) Auf Merosin und Laminin wurden Motoneurone für sieben Tage kultiviert (bei Ca<sub>v</sub>2.2 auch für zwei Tage) und mit Antikörpern gegen den P/Q- und N-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanal gefärbt. In keinem Fall bestand ein Unterschied in der Fluoreszenz-Stärke zwischen RSK2-KO und -WT Wachstumskegeln. Auf der linken Seite sind beispielhafte Wachstumskegel abgebildet. Balken=2 μm; (B) In RSK2-KO und WT Wachstumskegeln gibt es keinen Unterschied in der relativen Verteilung von Ca<sub>v</sub>2.2 Kanälen und dem aktive Zonen Protein Piccolo. Es wurde der Überlagerungsgrad des Ca<sub>v</sub>2.2 –Signals (grün) mit dem Piccolo-Signal (rot) in % angegeben. Überlagerung in gelb. Die Unterschiede zwischen KO und WT sind nicht signifikant: P-Wert auf Laminin: 0.30; p-Wert auf

Merosin: 0.33. Balken=10  $\mu\text{m}$ ; (C) Die Fluoreszenz-Stärke des **Bassoon**-Signals ist zwischen RSK2-KO und WT nicht verschieden. Balken=2  $\mu\text{m}$ .

Wachstum weniger hemmt und ob Merosin zu normalem Neuritenwachstum führt.

Andererseits ist gezeigt worden, daß die  $\beta 2$  Kette von Merosin mit dem Calcium-Kanal  $\text{Ca}_v2.2$  interagiert. Diese Interaktion führt zur präsynaptischen Differenzierung und zur Bildung von Calcium-Kanal Clustern (Nishimune 2004). Wegen der veränderten Calcium-Transienten bestand die Möglichkeit, daß durch eine Veränderung in der Anordnung oder dem Vorhandensein von Calcium-Kanälen oder der Bildung von Calcium-Kanal Clustern diese Interaktion nicht mehr stattfindet, und auch das „Stopp-Signal“ von Merosin nicht erkannt wird, was dazu führen würde, daß die Axone der RSK2-KO Neurone durch Merosin im Gegensatz zum WT nicht verkürzt werden. In der Tat hatten die WT-Neurone auf Merosin kürzere Axone, auch bestätigte sich der ursprüngliche Wachstums-Phänotyp von RSK2-KO-Motoneuronen auf Laminin. Auf Merosin waren die RSK2-KO-Axone etwas länger als die WT-Axone, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 23 A). Auf Merosin verschwindet also der Unterschied im Axonwachstum zwischen WT und KO. Alle Ergebnisse gelten sowohl für das Haupt-Axon als auch für das Axon mit den Verzweigungen. Damit zeigte sich, daß unter Bedingungen, die der *in vivo* Situation mehr ähneln, der Axonwachstumsphänotyp nicht vorhanden ist. Die RSK2-KO Neurone erkennen also das Stopp-Signal. Bei der Anzahl an Verzweigungen bestätigte sich nicht die höhere Anzahl bei RSK2-KO Neuronen auf Laminin. Der Grund dafür ist nicht klar (Abb. 23 B).

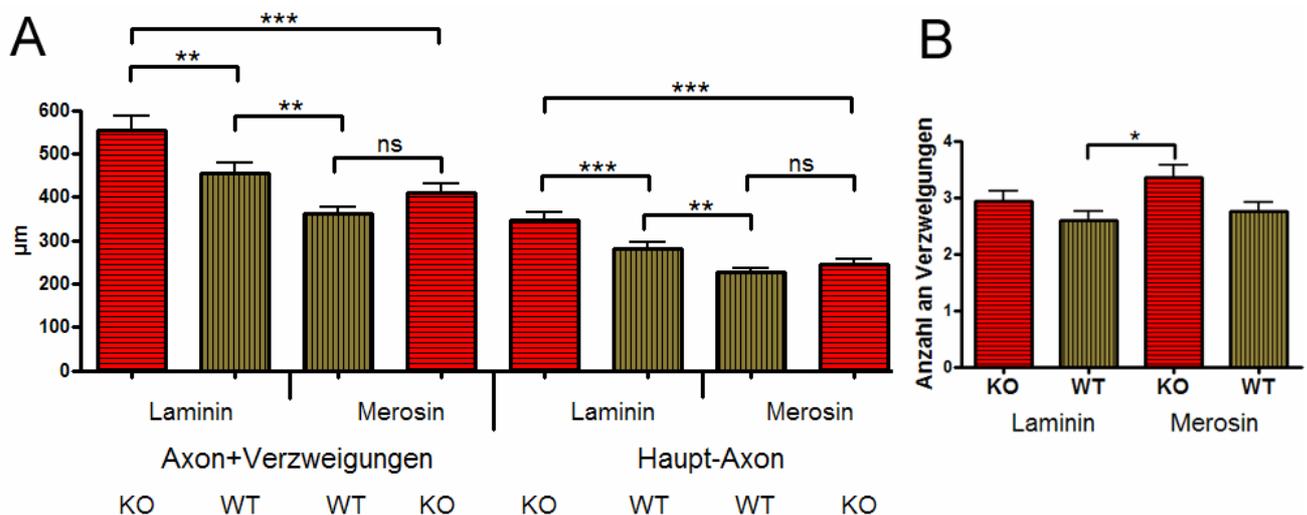


Abb. 23: Axon-Länge von Motoneuronen nach sieben Tagen in Kultur auf Laminin und Merosin. (A) Auf Laminin sind die Axone von RSK2-KO Motoneuronen länger als bei WT-Kontroll-Neuronen. Merosin als Grundlage, auf der die Neurone wachsen, führt zu kürzeren Axonen, sowohl bei KO- als auch bei WT-Neuronen. Der Unterschied in der Axon-Länge ist auf Merosin nicht mehr vorhanden. Dies gilt für das Haupt-Axon und das Axon mit allen Verzweigungen. N (von links nach rechts)=165, 172, 176, 172, 165, 172, 176, 172. (B) Auf Laminin besteht in diesem Experiment kein Unterschied zwischen WT und KO bezüglich der Verzweigungen. Der einzige signifikante Unterschied bei Vergleich der vier Balken untereinander besteht zwischen WT auf Laminin und KO auf Merosin. N-Zahlen wie in A. Ein ANOVA mit Newman-Keuls Test wurde jeweils für eine vierer Gruppe von KO und WT auf Laminin und Merosin durchgeführt. Der Vergleich der zwei Balken auf Merosin bei Axon+Verzweigungen und bei der Anzahl an Verzweigungen mit dem t-Test führte jeweils zu einem signifikanten Unterschied.

### 3. 3. Koordination und Muskelkraft bei RSK2-KO Mäusen

Auf den ersten Blick schien das Verhalten der RSK2-KO Mäuse normal zu sein. Mit verschiedenen Tests wurde untersucht, ob motorische Beeinträchtigungen, die nicht unmittelbar ins Auge stechen, als *in vivo* Korrelate der Befunde in Zellkultur und an der Endplatte bestehen. Zunächst wurde die Muskelkraft an der vorderen Extremität gemessen (Abb 24. A). Dabei muß die Maus einen Draht mit den Vorderfüßen festhalten, und es wird so lange vom Experimentator daran gezogen, bis die Kraft der Maus nicht mehr ausreicht. Die Kraft im Moment des Loslassens wird gespeichert und in Newton angezeigt. Es wurden in diesem Test keine Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. Da es Berichte gibt, daß RSK2-KO Mäuse kleiner und leichter sind als die WT-Kontrollmäuse (Dufresne 2001) wurde parallel bei den selben Mäusen das Körpergewicht bestimmt, da dieses auch eine Korrelation mit der Kraft haben sollte. Bei Mäusen in diesem Alter bestand hier kein Unterschied im Gewicht (Abb. 24 B). Kraft und Gewicht wurden von Bettina Holtmann gemessen.

Da in der oben erwähnten Untersuchung von Dufresne (2001) auch Koordinationsdefekte berichtet wurden, wurde die Fähigkeit der Mäuse, auf einem sich zunehmend schneller drehenden Rad (rotarod) zu balancieren, untersucht. Die

Zeit bis die Tiere herunterfielen wurde gemessen. Auch hier bestand kein Unterschied zwischen WT und KO (Abb. 24 C). Um die spontane Aktivität zu bestimmen, wurden die Mäuse in einen Käfig mit Laufrad gesetzt. Die spontane Laufaktivität, angegeben in Umdrehungen des Rades innerhalb von sieben Tagen, war nicht signifikant verschieden (Abb. 24 D).

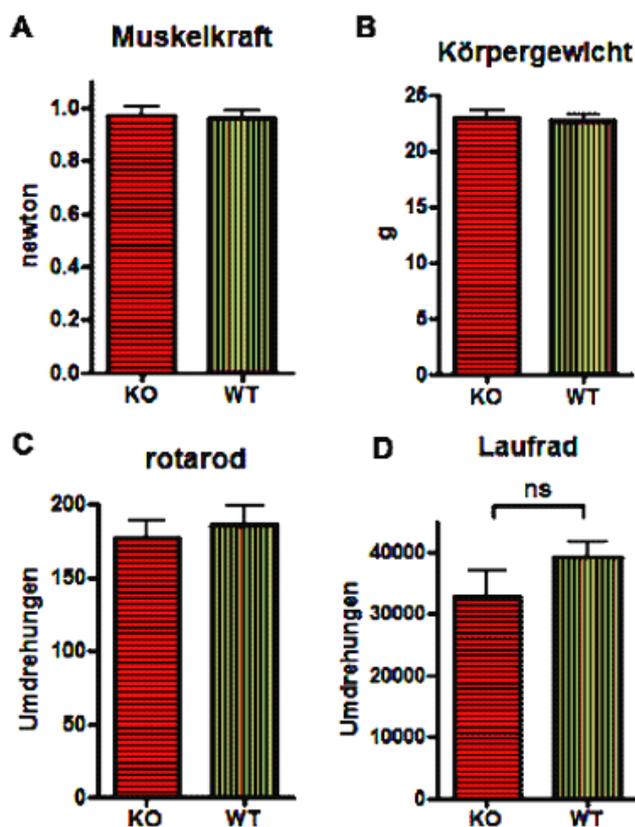


Abb. 24: Motorisches Verhalten von zwei Monate alten männlichen RSK2-KO und -WT Mäusen. (A) Kraft der vorderen Extremität in Newton. N=11. (B) Körpergewicht der in (A) gemessenen Mäuse. (C) Koordinationsfähigkeit auf dem rotarod. N=10. (D) Spontane Laufaktivität, gemessen im Laufrad in Anzahl der Umdrehungen in einer Woche. N=10.

### 3. 4. Der Einfluß von RSK2 auf das Neuritenwachstum bei PC12-Zellen

Die oben verwendeten Lentiviren, mit denen Motoneurone transfiziert wurden, wurden auch zur Transfektion von PC12-Zellen verwendet. Mit dieser Technik war eine Transfektionsrate von ca. 95% zu erreichen (Bender 2006). Die ursprünglich hergestellten Viren mit dem SFFV Promotor und HA tag, welche in Motoneuronen zu keinem Färbesignal geführt hatten, konnten in PC12-Zellen gut verwendet werden. Damit lagen also für die wildtypischen, Kinase-inaktiven und konstitutiv aktiven RSK2-Konstrukte jeweils zwei Virenkonstrukte vor: Eines mit SFFV Promotor und HA tag und eines mit CMV Promotor und GFP tag. Zellen, die mit ersterem Konstrukt

erfolgreich transfiziert wurden, können mit einem HA-Ak und entsprechendem 2.Ak sichtbar gemacht werden. Zellen, die mit dem Konstrukt mit GFP tag transfiziert wurden leuchten direkt durch das in den Zellen anwesende GFP. Der Kontroll-Virus mit SFFV Promotor bildet eine Ausnahme indem er selbst ein GFP-Konstrukt hinter diesem Promotor trägt. Hier muß also nicht mit einen HA-Ak gefärbt werden.

Schon nach zwei Tagen in Kultur mit NGF waren die Neuriten mit etwa 70 µm im Falle der GFP-Kontrolle ausreichend lange, um die Zellen fixieren zu können und die Neuriten-Länge auszumessen. Sämtliche Neuriten und Verzweigungen ergeben als Summe den Wert der Neuritenlänge einer Zelle. Als weitere Kontrolle wurden PC12-Zellen ausplattiert, die kein NGF erhielten. Die Länge konnte nach Anfärbung mit Neurofilament-M ausgemessen werden. Es zeigte sich auch ohne NGF ein geringes Neuritenwachstum. In einem Experiment wurden parallel ausplattierte PC12-Zellen mit den verschiedenen Viren transfiziert und auf gleiche Weise ausgewertet. Ein solches Experiment wurde drei mal wiederholt. Da in den drei Experimenten die absoluten Werte der GFP-Kontrolle nicht völlig gleich waren, wurde die Neuritenlänge in Prozent der Länge der GFP-Kontroll Neuriten, die als 100% gesetzt wurde, angegeben. Damit konnten die Ergebnisse der Experimente besser miteinander kombiniert werden. Interessanterweise wies in den beiden Ansätzen mit den verschiedenen Promotoren und tags das Ergebnis in die gleiche Richtung: Die konstitutiv aktiven Konstrukte verkürzten die Neuritenlänge, das dominant negative verlängerte sie. Das wildtypische Konstrukt hatte keinen Effekt (Abb. 25 B, D). Der Effekt des dominant negativen Konstrukts war nur beim SFFV Promotor mit HA tag signifikant. Das selbe Konstrukt unter dem CMV Promotor zeigte nur eine Tendenz zu längeren Neuriten. Das konstitutiv aktive Konstrukt mit der Punktmutation („Y“ in Abb 25) hatte einen signifikant verkürzenden Effekt bei beiden Virenkonstrukten. Beim konstitutiv aktiven Konstrukt mit der Deletion („D“) war ein Effekt, der signifikant war, nur mit dem CMV Promotor und GFP tag zu sehen. Mit SFFV Promotor und HA tag kam es auch zu keiner Tendenz hin zu verkürzten Neuriten.

Wie auf den beispielhaften Aufnahmen in Abb. 19 A zu sehen, haben einige Zellen keine Fortsätze. Sie haben also eine Neuritenlänge von 0 µm. Da einige Autoren statt der Neuritenlänge die Anzahl an PC12-Zellen mit Fortsätzen angeben, was ein weniger aussagekräftiger Parameter ist, da unberücksichtigt bleibt, wie lange

eigentlich die Fortsätze sind, seien hier noch die Prozentzahlen an Zellen mit der Neuritenlänge 0  $\mu\text{m}$  angegeben: CMV Promotor: K: 22%; W: 26%; Y: 45%; D: 35%; G: 14%; SFFV Promotor: K: 16%; W: 23%; Y: 38%; D: 23%; G: 26%. RSK2 hemmt also auch in PC12-Zellen das Neuritenwachstum, wie es sich schon bei Motoneuronen herausgestellt hat. Ein besonderes Gewicht erhält dieser Befund einerseits dadurch, daß das Neuritenwachstum in beide Richtungen verändert werden kann, nämlich durch konstitutiv aktive Konstrukte reduziert, durch das dominant negative verstärkt, andererseits durch die Parallelität der Ergebnisse in zwei unabhängigen Virenkonstrukt-Reihen. In Abb. 26 sind in stärkerer Vergrößerung mit den vier verschiedenen Konstrukten transfizierte PC12-Zellen dargestellt. Es besteht kein Unterschied in der Verteilung zwischen den Konstrukten: Das GFP-markierte RSK2 ist in allen Zellkompartimenten vorhanden. Die Verteilung wurde untersucht, da die RSK2-Varianten möglicherweise in der Zelle unterschiedlich verteilt sein könnten, insbesondere da bei D eine Region, die als PDZ-Ligand bezeichnet wird, fehlt. Mit dieser Region kann RSK an Proteine mit PDZ-Domänen z. B. aus der Shank-Familie binden, wodurch eine Regulierung der subzellulären Verteilung möglich wäre. Die transfizierten Zellen wurden auch mit Ak gegen APC, GSK3 $\beta$  und Y10B gefärbt um eine mögliche Kolokalisation auszumachen. Aufgrund des sehr diffusen Musters der GFP-Fluoreszenz konnte jedoch keine klare Kolokalisation festgestellt werden.

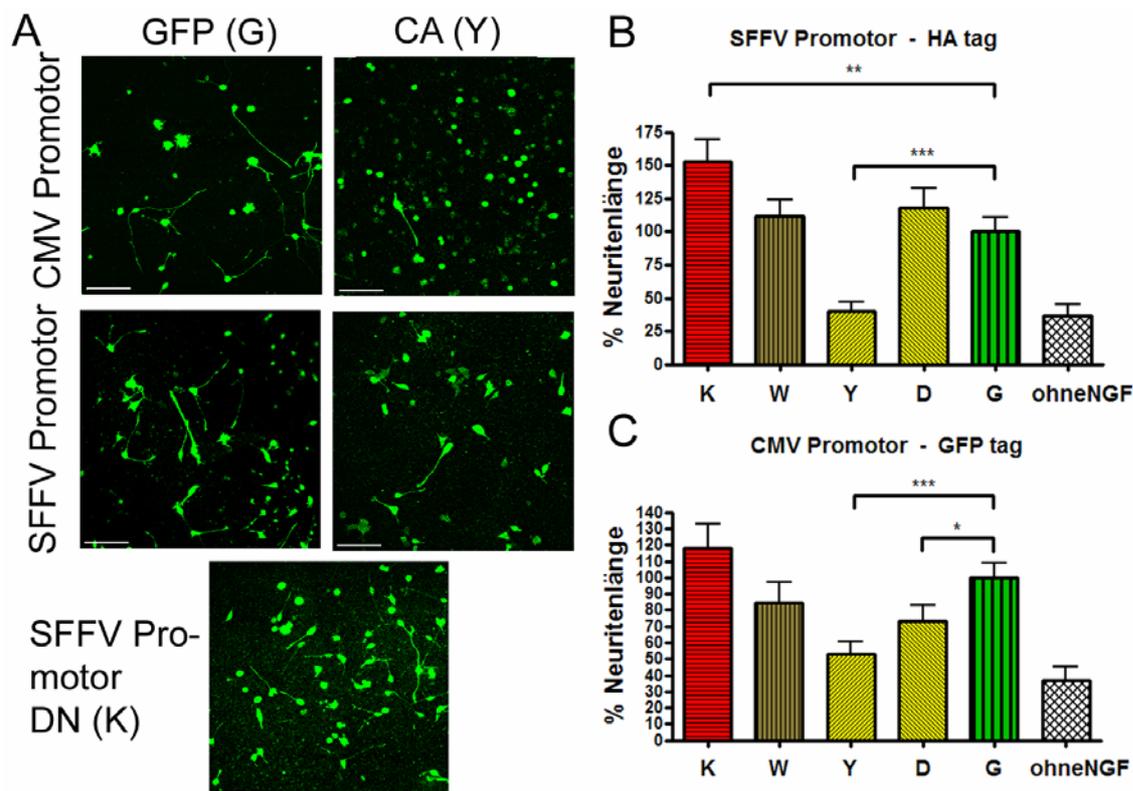


Abb. 25: Neuritenwachstum bei PC12-Zellen, die mit Lentiviren transfiziert wurden, die verschiedene RSK2-Konstrukte beherbergen. (A) Beispielhafte Abbildungen von PC12-Zellen, die durch GFP grün leuchten (beide linken Bilder) oder durch HA-1.Ak - Alexa Fluor 488 2.Ak Färbung (drei restliche Bilder). Balken=150  $\mu$ m. (B) Das konstitutiv aktive Konstrukt „Y“ mit einer Punktmutation im autoinhibitorischen Bereich hemmt das Neuritenwachstum. Das Konstrukt mit der Kinase-inaktiven Domäne („K“) steigert das Wachstum. Als Promotor wurde der SFFV Promotor verwendet. Ein N-terminaler HA tag diente zur Sichtbarmachung. (C) Die selben Konstrukte wie in B führen mit dem CMV Promotor und GFP tag zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Das konstitutiv aktive Konstrukt „Y“ hemmt das Neuritenwachstum, wogegen das Konstrukt mit der Kinase-toten Domäne („K“) nur tendenziell zu einer Verlängerung der Neuriten führt. Hier verkürzt auch das konstitutiv aktive Konstrukt mit der Deletion der autoinhibitorischen Domäne („D“) das Wachstum. K=Dominant negatives Konstrukt mit Kinase-inaktiver Domäne. W=wildtypisches RSK2 Konstrukt. Y=Konstitutiv aktives Konstrukt mit Punktmutation. D=Konstitutiv aktives Konstrukt mit Deletion. G=GFP Kontrolle ohne RSK2-Konstrukt. Es wurden drei Experimente durchgeführt mit einer Gesamtzahl von ca. 120 PC12-Zellen pro Balken.

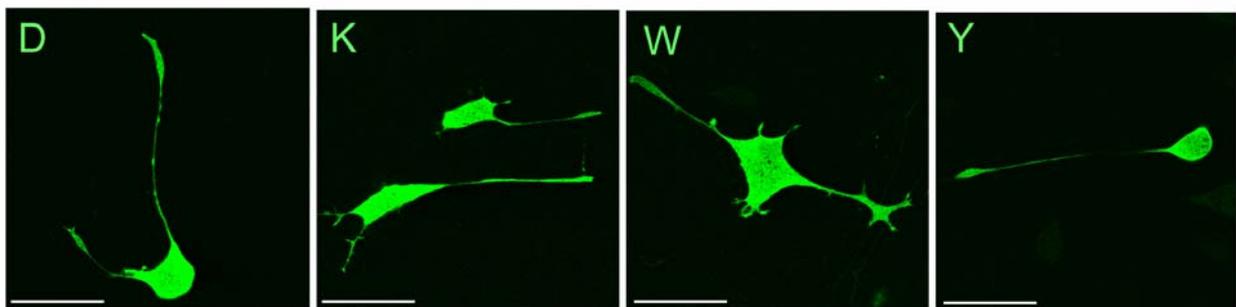


Abb. 26: Dargestellt sind PC12-Zellen in stärkerer Vergrößerung, die mit den vier GFP-markierten RSK2-Konstrukten unter dem CMV Promotor transfiziert wurden. Das Protein ist in allen Fällen im Zellkörper, Zellkern, Neurit und Wachstumskegel zu finden. K=Dominant negatives Kostrukt mit Kinase-toter Domäne. W= wildtypisches RSK2 Konstrukt. Y=Konstitutiv aktives Konstrukt mit Punktmutation. D=Konstitutiv aktives Konstrukt mit Deletion. Balken=200  $\mu$ m.

### 3. 5. Die Bedeutung von RSK für die neuromuskuläre Synapse bei *Drosophila melanogaster*

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß RSK2 bei der Maus das Motoneuron-Wachstum beeinflusst, wurde an der neuromuskuläre Synapse von *rsk*-Mutanten bei *Drosophila* nach Auffälligkeiten gesucht. Zwischen Maus und Fliege waren ja schon beim Lernen Parallelitäten gefunden worden. Die Ergebnisse der *Drosophila*-Experimente wurden in „Developmental Neurobiology“ veröffentlicht (Fischer(b), 2009). Die neuromuskuläre Synapse von *Drosophila* ist in der Vergangenheit im Blick auf Morphologie und Funktion bei zahlreichen Mutanten, auch Lernmutanten, charakterisiert worden. In dieser Arbeit wurde nur die Struktur und nicht die Funktion untersucht. Bei Larven im dritten Larvenstation wurde im Segment A3 die synaptische Region an den Muskeln 6 und 7 durch Immunhistochemie mit dem SAP47-Ak nc46 (Reichmuth 1995) sichtbar gemacht und die Boutons gezählt bzw. die Synapsen-Längen ausgemessen. Dabei wurden die neuromuskulären Synapsen auf der linken und rechten Seite der gleichen Larve als unabhängige einzelne Synapsen gesehen (der Begriff Synapse schwankt im Folgenden zwischen: aktive Zone, einzelner Bouton und gesamte Kontaktfläche aller Boutons, die die Muskeln 6/7 versorgen und wird präzisiert, wenn Mißverständnisse entstehen könnten).

#### 3. 5. 1. Größe der neuromuskulären Synapse

Es wurde zunächst untersucht, ob bei *rsk* Mutanten von *Drosophila* (*Drosophila* hat nur ein *rsk* Gen) eine Veränderung in der Größe motorischer Synapsen besteht. Dazu wurden die RSK Nullmutante *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* (58/1) und die N-terminale Mutante *Df(1)ign<sup>Δ24/3</sup>* (24/3) (Deletion von 1322 Basenpaaren) mit WT *CantonS* (CS) Larven verglichen. Es stellte sich heraus, daß die Anzahl an Endknöpfchen (Boutons) bei den Mutanten signifikant größer als im WT ist. Dies war sowohl für die absolute Bouton-Zahl als auch für die auf die Muskelfläche bezogene Zahl gültig (Abb. 27, B, C). Je größer das Muskelsegment ist, desto mehr Boutons sind zu erwarten. Deshalb wurde zusätzlich dieser relative Wert bestimmt. Die Signifikanz bei der relativen Bouton-Zahl war höher. Die getrennte Auszählung der kleinen und großen Boutons (1s und 1b) machte klar, daß nicht eine der beiden Arten isoliert im KO vermehrt vorkommt, sondern beide gleichermaßen (Abb. 27 D, E).

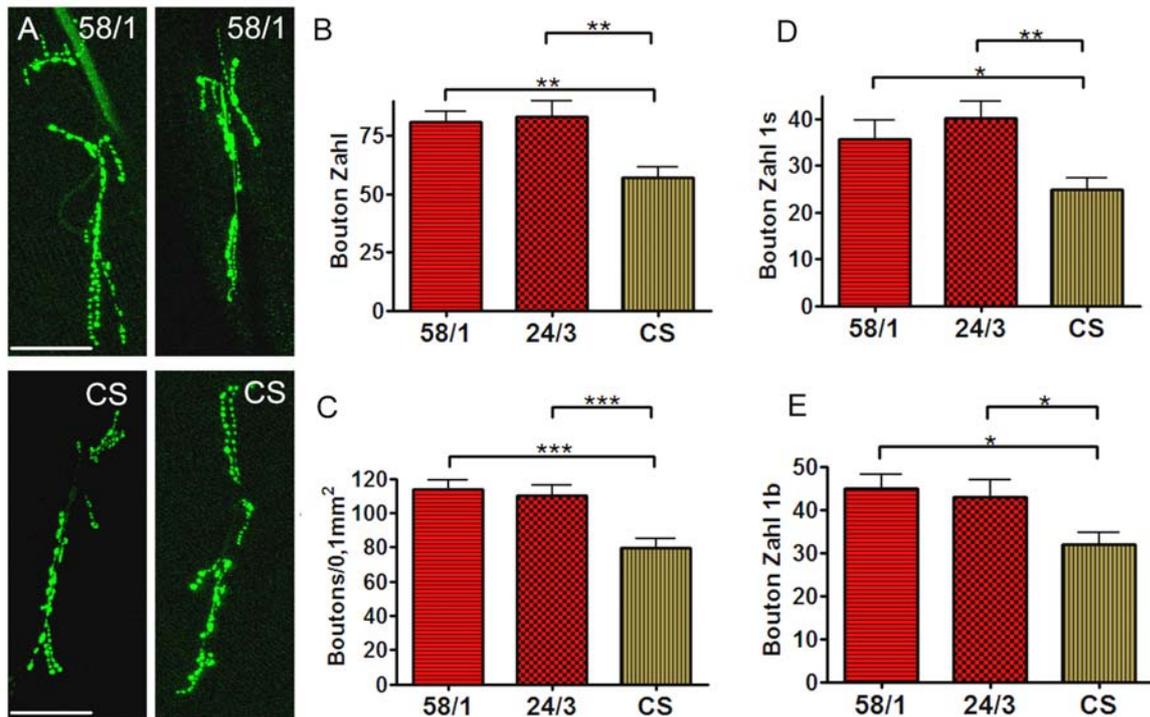


Abb. 27: Die Bouton-Zahl ist in *rsk* Mutanten bei *Drosophila* erhöht. (A) Repräsentative Abbildungen von neuromuskulären Synapsen von WT CantonS (CS) Fliegen und *Df(1)ign*<sup>Δ58/1</sup> (58/1) Fliegen, gefärbt mit *nc46* (SAP 47). (B) Absolute Bouton-Zahl in CantonS (CS) Fliegen, *Df(1)ign*<sup>Δ58/1</sup> (58/1) und *Df(1)ign*<sup>Δ24/3</sup> (24/3) Fliegen. (C) Boutons pro Fläche der Muskel 6/7 im Segment A3. (D) Isolierte Quantifizierung von Typ 1s-Boutons. (E) Isolierte Quantifizierung von Typ 1b-Boutons. Balken = 50 μm. 58/1: N=21; 24/3: N=14; CS: N=20 in B-E.

Neben der Bouton-Zahl wurde auch die Länge der neuromuskulären Synapse bestimmt. Sie war im Gegensatz dazu zwischen CS und den Mutanten gleich (Abb. 28 A). Es wurde der Abstand zwischen den am weitesten entfernt liegenden Boutons als Länge gemessen. Auch auf die Länge des Muskelsegments A3 bezogen bestand kein Unterschied, so daß die höhere Zahl an Boutons sich nicht auf eine größere Ausdehnung erstreckt, sondern wahrscheinlich eher dichter oder verzweigter vorliegt.

### 3. 5. 2. Rettung der Bouton-Zahl

Um zu beweisen, daß die Deletion von *rsk* für den Bouton-Phänotyp verantwortlich ist, wurden Rettungs-Experimente mit einer transgenen Linie mit einem 6,5 kb genomischen Fragment des *rsk* Gens auf Chromosom 2 durchgeführt (Putz 2004). Frühere WB Analysen von Fliegen-Lysaten hatten gezeigt, daß das endogene und

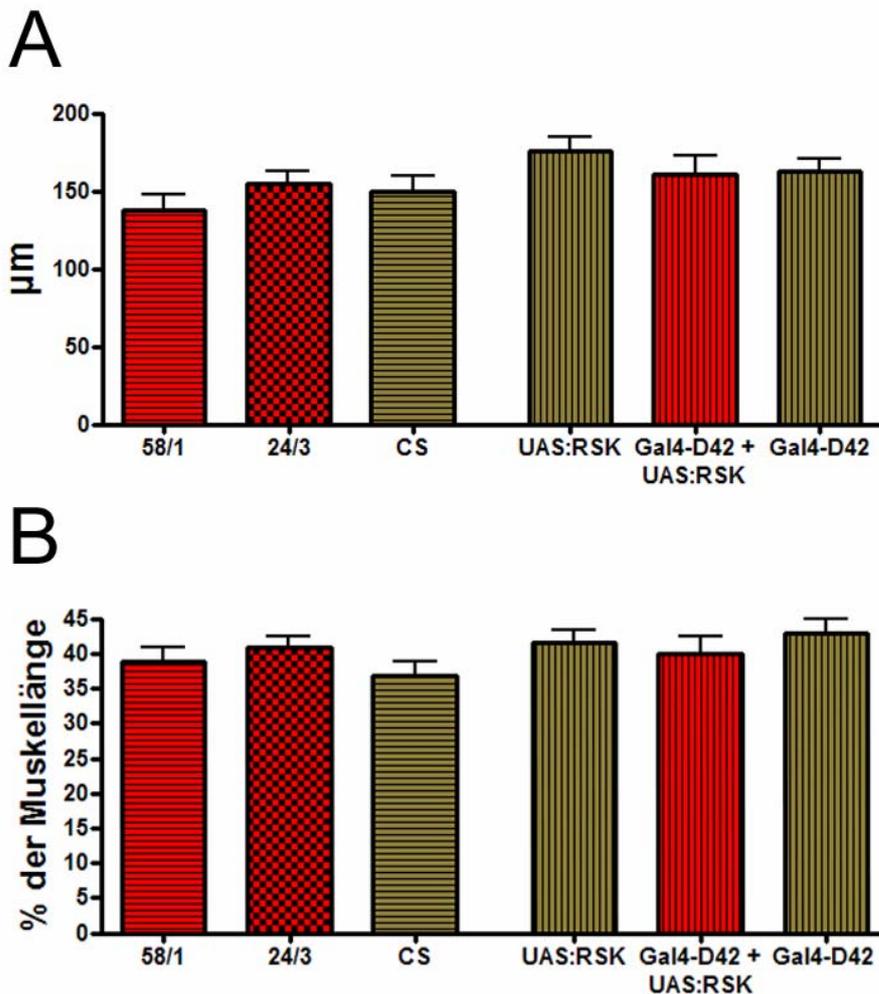


Abb. 28: Die Länge der neuromuskulären Synapse ist sowohl absolut (A) als auch auf die Muskellänge bezogen zwischen CS und den Mutanten nicht verschieden. Auch die Länge der neuromuskulären Synapse im Falle der Überexpression von *rsk* (rechte Hälfte der Graphen; siehe auch Abb. 23 E, F) wird nicht beeinflusst. 58/1: N=21; 24/3: N=14; WT-CS: N=20; UAS:RSK: N=22; GAL4-D42/UAS:RSK: N=22; GAL4-D42: N=27.

transgene RSK Protein in vergleichbaren Mengen exprimiert werden (Putz 2004). Weibliche *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* Fliegen wurden mit männlichen *gen-RSK(T1)* Fliegen (Putz 2004) gekreuzt. Die Boutons wurden ausschließlich in männlichen Nachkommen gezählt (*Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>/Y; T1/+* im Vergleich zu *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>/Y; +/+*), da diese nur ein X-Chromosom haben, welches die Nullmutation tragen muß, wogegen weibliche Nachkommen heterozygot für die Mutation sind. Die Bouton-Zahl war in den KO-

Nachkommen mit dem Rettungs-Konstrukt reduziert, was sowohl für die absolute Zahl als auch für die Zahl pro Muskelfläche zutrif (Abb. 29 A, B). Die transgene Überexpression von *rsk* in der Nullmutante kann also den Bouton-Zahl Phänotyp retten.

Diese Experimente mit dem genomischen Konstrukt geben jedoch keinen Hinweis darauf, ob RSK prä- oder postsynaptisch benötigt wird. Zu diesem Zweck wurde in einem weiteren Experiment RSK mit dem Gal4/UAS System (Brand 1993) in larvalen Motoneuronen von *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* Fliegen exprimiert. Der Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 wird im Falle der verwendeten Linie D42 in Larven im dritten Larvenstadium im zentralen Nervensystem sowie stark in Motoneuronen einschließlich der Nervenendigungen und synaptischen Boutons exprimiert (Yeh 1995). Männliche Gal4-D42 Fliegen wurden mit weiblichen *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* Fliegen gekreuzt, die hinter einer „upstream activating sequence“ (UAS) die *rsk* c-DNA tragen, die in den Nachkommen nach Bindung von Gal4 an die UAS-Sequenz in den Motoneuronen abgelesen wird. Es wurden wieder nur männliche Larven ausgewertet. Diese zellspezifische Rettung führte zu einer signifikanten Reduzierung der Bouton-Zahl, welche jedoch noch höher als das WT-Niveau war, so daß eine zur vollständigen Rettung nötige postsynaptische Komponente nicht ausgeschlossen werden kann. Der Unterschied zum KO war im Falle der relativen Anzahl noch deutlicher als bei der absoluten Anzahl von Boutons (Abb. 29 C, D). Als Kontrolle wurden männliche Larven verwendet, die bezüglich *rsk* wildtypisch waren und das D42-Gal4-Konstrukt homozygot trugen. Letzteres sollte keinen Einfluß auf die Bouton-Zahl haben. Außerdem wurden als Kontrolle *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>/Y; UAS:RSK* Männchen verwendet. Diese haben das UAS-Konstrukt, was aber ohne Gal4-Transkriptionsfaktor kein RSK Protein herstellen sollte.

### 3. 5. 3. Überexpression von RSK

In einem weiteren Experiment wurde RSK im WT-Hintergrund in Motoneuronen mit D42 überexprimiert. Dies führte zum gegenteiligen Effekt wie die *58/1* Deletion: Die Zahl der Boutons war verringert im Vergleich zu den beiden Kontrollen, die entweder nur das Gal4- oder das UAS:RSK-Konstrukt trugen (Abb. 29 E, F). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß RSK eine präsynaptische Funktion hat, da die

Überexpression genau dort zu einer Reduktion der Bouton-Zahl im Vergleich zum WT führt. Dabei wurden weibliche *D42; D42* Fliegen mit männlichen *UAS:RSK; UAS:RSK* Fliegen, und für die Kontrollen weibliche *CS* Fliegen mit männlichen *UAS:RSK; UAS:RSK* Fliegen und weibliche *CS* Fliegen mit männlichen *D42; D42* Fliegen gekreuzt. Die Länge der neuromuskulären Synapse war nicht verschieden (siehe oben Abb. 28). Die höhere Bouton-Zahl bei den wildtypischen Kontrollen in Abb. 29 E und F im Vergleich mit der WT-Kontrolle im ursprünglichen Experiment in Abb. 27 B kommt vermutlich daher, daß hier Kreuzungen mit wenigen Tieren durchgeführt wurden, statt einfach eine größere Anzahl an Fliegen von einem Glas auf das nächste umzusetzen. Dies bedeutet, daß weniger Fliegen in ein Glas gesetzt wurden und damit weniger Larven sich durch die gleiche Menge an Futter durcharbeiteten. Dies führte zu einer größeren Kraftanstrengung der einzelnen Larve und damit zu mehr Boutons, wie schon von Sigrist gezeigt worden ist (Sigrist 2003).

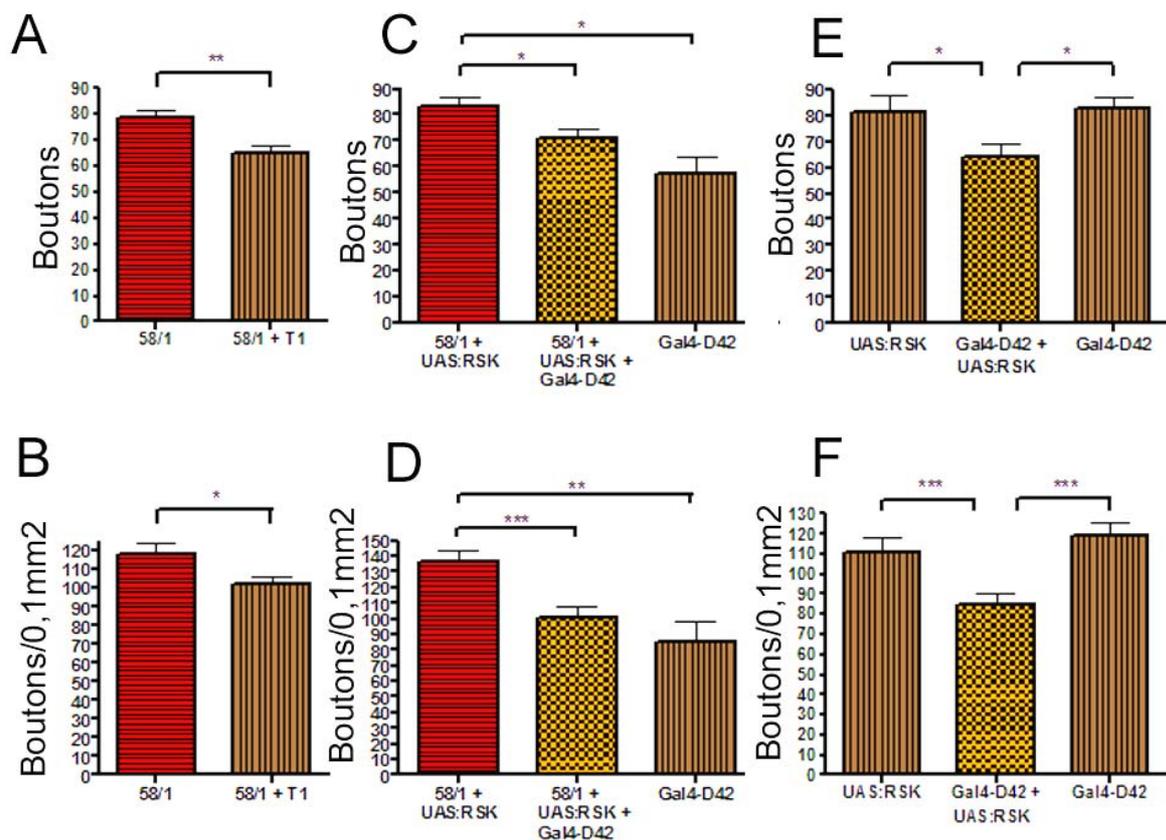


Abb. 29: (A) Die Expression eines genomischen *rsk* Konstrukts in der Nullmutante reduziert die absolute Bouton-Zahl auf WT-Niveau. *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>/Y; +/+*: N=43; *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>/Y; gen-RSK (T1)/+*: N=45. (B) Auch die Bouton-Zahl pro Muskelfläche ist

reduziert. N-Zahl wie in A. (C) Die präsynaptische Expression von RSK reduziert die Bouton-Zahl in der Nullmutante. *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>/Y; UAS:RSK*: N=41; *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>/Y; UAS:RSK; GAL4-D42*: N=33; *GAL4-D42*: N=8. (D) Auch die Bouton-Zahl pro Muskelfläche ist reduziert. N-Zahl wie in C. (E) Die absolute Bouton-Zahl ist in Larven reduziert, die RSK in Motoneuronen überexprimieren. *UAS:RSK*: N=22; *GAL4-D42/UAS:RSK*: N=22; *GAL4-D42*: N=27. (F) Auch die Bouton-Zahl pro Muskelfläche ist reduziert. N-Zahl wie in E. In allen Experimenten wurden nur männliche Larven verwendet.

#### 3. 5. 4. Durchschnittliche Anzahl an Synapsen in den Boutons

Eine Veränderung der Bouton-Zahl, wie sie sich bei den *rsk*-Mutanten herausgestellt hat, könnte mit einer kompensatorischen Erhöhung der Zahl an Synapsen in den Boutons einhergehen. Das Wort wird hier im Sinne der einzelnen aktiven Zone gebraucht. Um dies zu untersuchen, wurde eine Färbung mit dem nc82 („Bruchpilot“, BRP; Wagh 2006) Antikörper gemacht. Dieser erkennt das aktive Zonen Protein Bruchpilot (Wagh 2006). Das Färbesignal sollte in seiner Intensität proportional zur Zahl an aktiven Zonen sein. Das Signal wurde im Segment A3 an den Muskeln 6/7 als mittlere Fluoreszenzstärke pro Fläche der aktiven Zonen quantifiziert. Um den Einfluß des Hintergrundes auf das Ergebnis zu reduzieren wurde zusätzlich der 5000 hellste Pixel bestimmt. Außerdem wurden per Hand die einzelnen aktiven Zonen gezählt und mit diesen Werten die Zahl der aktiven Zonen pro Bouton-Fläche sowie die durchschnittliche Fläche einer einzelnen aktiven Zone berechnet. Bei keiner dieser Varianten der Bestimmung der Zahl bzw. Dichte oder Größe aktiver Zonen zeigte sich ein Unterschied zwischen der Nullmutante und dem WT (Abb. 30). Bei der mittleren Fluoreszenzstärke und dem 5000 hellsten Pixel bestand eine Tendenz zur Reduktion in der Nullmutante, die jedoch nicht signifikant war ( $p=0,28$  für die mittlere Fluoreszenzstärke;  $p=0,15$  für den 5000 hellsten Pixel). Daraus ist zu schließen, daß RSK die Zahl an Synapsen nicht unabhängig von der Bouton-Zahl reguliert.

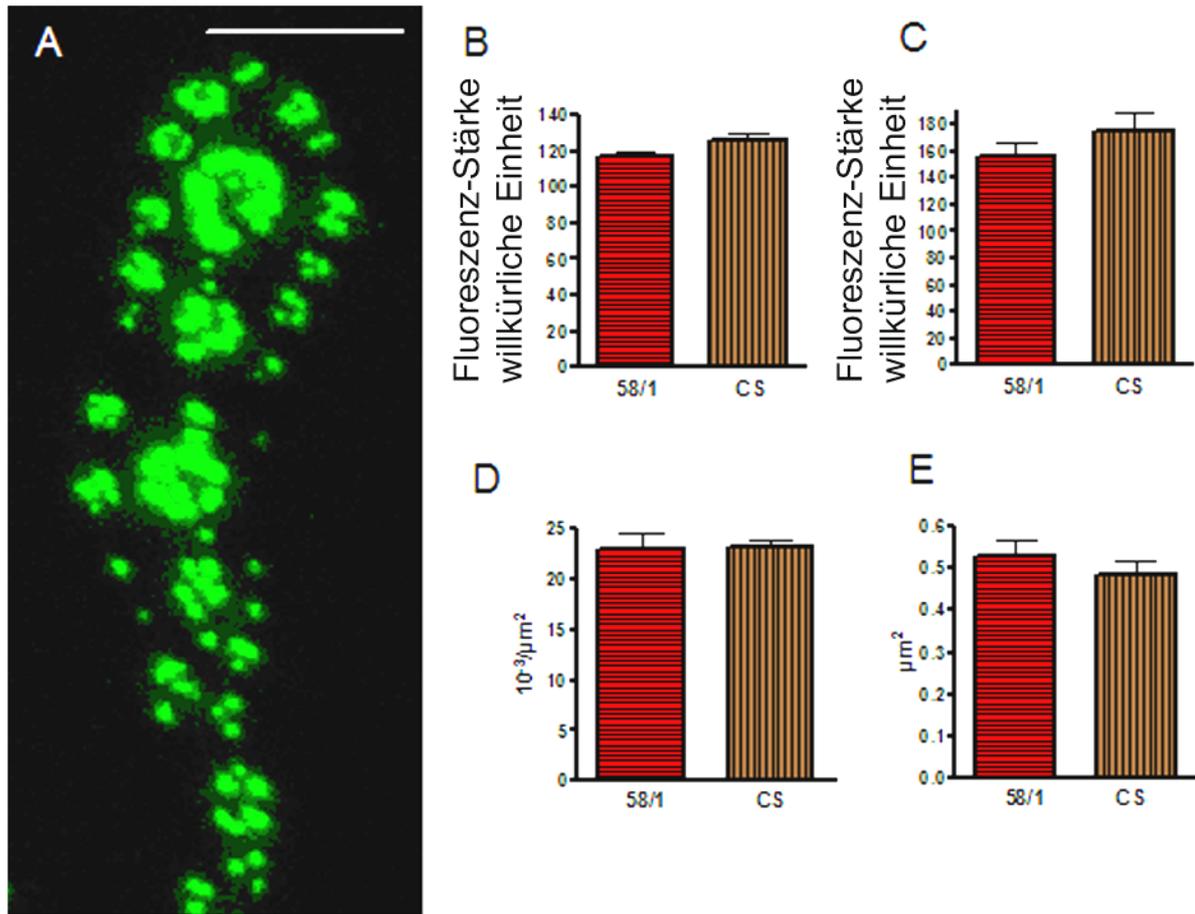


Abb. 30: Anzahl und Größe der Synapsen in den Boutons. (A) Beispielhafte Abbildung einer neuromuskulären Synapse einer WT Larve, angefärbt mit anti-BRP; Balken=10  $\mu\text{m}$ . Die mittlere Fluoreszenz-Stärke (B) und der 5000 hellste Pixel (C) waren zwischen Nullmutante  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}$  und WT nicht verschieden. Die Zahl an Synapsen pro Bouton-Fläche (D) und die durchschnittliche Größe einer einzelnen aktiven Zone (Synapse; E) waren ebenfalls nicht verschieden. 58/1: N=22; CS: N=24 in B-E.

### 3. 5. 5. Die Lokalisation von RSK an der neuromuskulären Synapse

Die bisherigen Befunde würden dafür sprechen, daß das *Drosophila* RSK-Protein auch direkt an der Synapse exprimiert ist. Es wären aber auch andere Mechanismen denkbar, wie RSK die Bouton-Zahl beeinflussen könnte. Um das zu untersuchen, wurden Färbungen mit einem Meerschweinchen Ak gemacht, der von Thomas Raabe hergestellt und schon im WB erprobt worden war. Er ist gegen die C-terminale Region des RSK-Proteins gerichtet. Im WB konnte von Thomas Raabe die Spezifität dadurch gezeigt werden, daß die RSK-Bande in Lysaten von  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}$  Fliegen

nicht mehr vorhanden war (Abb. 31 A). In der Immunhistochemie bei Larven im dritten Larvenstadium konnte jedoch keine spezifische Färbung an der neuromuskulären Synapse gefunden werden. Das nur sehr schwache Signal, was der Ak bei WT (CantonS) Larven lieferte, war unter exakt gleichen Bedingungen, z. B. bezüglich Laserintensität am konfokalen Mikroskop oder Färbeprozedur, genauso auch bei *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* Fliegen vorhanden. Das kann bedeuten, daß entweder kein RSK an der Synapse vorhanden ist, oder daß der Ak das endogene RSK nicht erkennt. Jedoch zeigte sich im Falle der Überexpression des RSK-Proteins in Motoneuronen mit der D42 Gal4-Linie ein deutliches Signal mit dem selben Ak.

Dazu wurden wieder weibliche *D42; D42* Fliegen mit männlichen *UAS:RSK; UAS:RSK* Fliegen gekreuzt. Die Boutons waren nicht flächig angefärbt, sondern man konnte noch Unterstrukturen erkennen, so daß Doppelfärbungen mit anderen präsynaptischen Proteinen gemacht wurden. Das Signal war von der Verteilung her identisch mit dem von Cystein String Protein (CSP), einem Marker synaptischer Vesikel (Mastrogiacomo 1994; Abb. 31 B). Hinweise dafür, daß RSK an den aktiven Zonen lokalisiert ist, gab eine Doppelfärbung mit Bruchpilot (BRP) nicht. Hier gab es nur eine partielle Überlagerung (Abb. 31 C).

Zur weiteren Bestätigung, daß RSK, wenn auch in überexprimierter Form, an der neuromuskulären Synapse vorkommt, wurde GFP-getaggetes RSK überexprimiert. Dazu war von Thomas Raabe das genomische *rsk*-Konstrukt [*gen-RSK(T1)*, Putz 2004], was für das Rettungsexperiment verwendet wurde (3. 5. 2.), dahingehend modifiziert worden, daß die GFP Sequenz 5' an das *rsk* offene Leseraster angehängt wurde, was ein GFP-RSK-Fusionsprotein zur Folge haben sollte (*gen-GFP-RSK*). Eine von Thomas Raabe durchgeführte WB-Analyse mit den entsprechenden transgenen Fliegen hatte die Expression dieses Fusionsproteins gezeigt, wobei das Expressions-Niveau in etwa dem des endogenen Proteins entsprach (Abb. 31 D). Auch dieses nun in allen Zellen und nicht nur in den Motoneuronen überexprimierte GFP-RSK Protein kolokalisierte mit CSP (Abb. 31 E). Das GFP-Signal konnte jedoch auch in einem schmalen Saum um die CSP-Region herum gefunden werden. Dies könnte postsynaptisches GFP-RSK sein, da das genomische Transgen auch im Muskel exprimiert werden sollte. An der neuromuskulären Synapse umfaßt die Postsynapse die Präsynapse, was diesen ringförmigen Saum erklären könnte. Diese

beiden Überexpressions-Experimente sprechen zusammen mit den Bouton-Zahl-Experimenten für eine präsynaptische Lokalisation und Funktion von RSK an der neuromuskulären Synapse bei *Drosophila*.

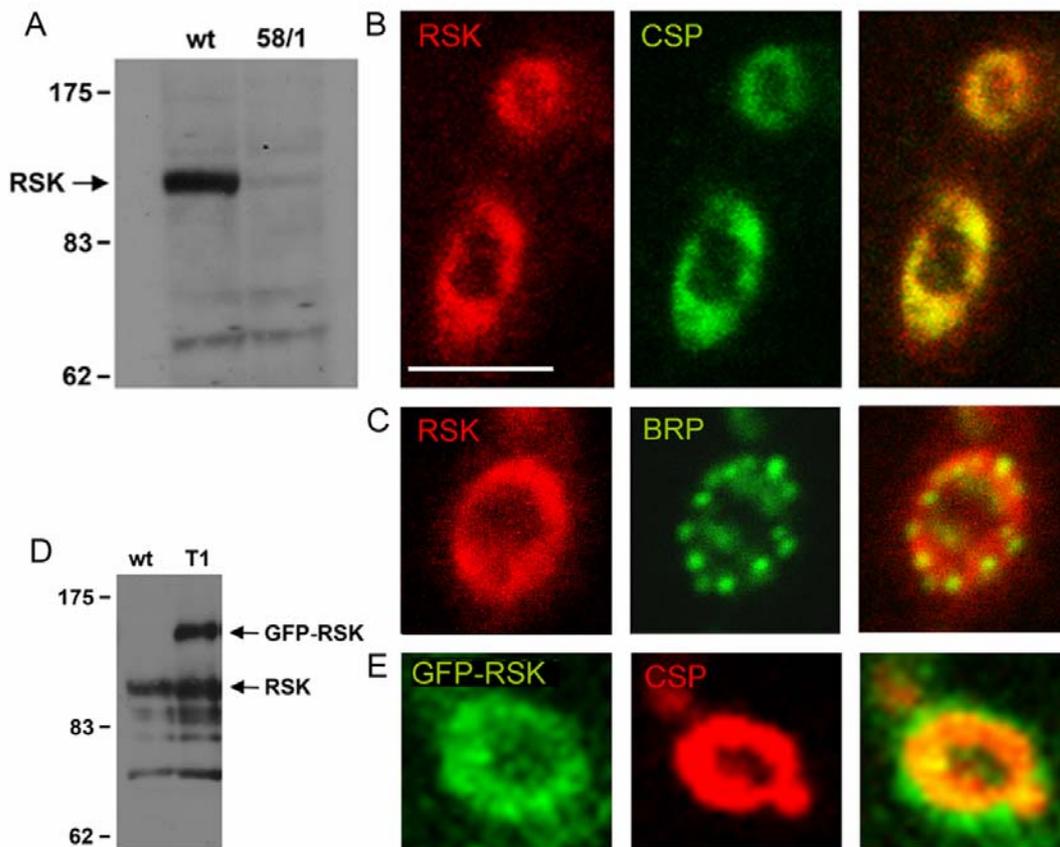


Abb. 31: Lokalisierung von RSK an der neuromuskulären Synapse von *Drosophila*. (A) WB Analyse von Fliegen-Lysaten von wild-typ (wt) und *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* (58/1) Fliegen mit einem Antiserum gegen die C-terminale Region von RSK (WB von Thomas Raabe). (B, C) Beispielhafte Abbildungen einzelner Boutons von *GAL4-D42/UAS:RSK* Larven, angefärbt mit anti-RSK und anti-CSP (B) und anti-RSK und anti-BRP (C) Antikörpern. Die Überlagerung ist in der dritten Spalte zu sehen. (D) WB von WT und transgenen Fliegen, die das GFP-RSK Protein exprimieren, mit dem Meerschweinchen RSK-Antiserum (WB von Thomas Raabe). (E) Larven, die das GFP-RSK Protein exprimieren, wurden mit anti-GFP und anti-CSP Ak gefärbt. Balken=5μm.

### 3. 5. 6. RSK vermindert die Bouton-Zahl durch Inhibition von ERK

*Drosophila* RSK wurde als negativer Regulator der Augen- und Flügelentwicklung beschrieben, und zwar über eine Hemmung der MAP-Kinase ERK (*Drosophila* Rolled;

RL; Kim 2006). Die folgenden Experimente sollten zeigen, ob RSK auch die Bouton-Zahl über eine Beeinflussung von RL negativ reguliert.

Es wurden weibliche *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* Fliegen mit männlichen *rl<sup>10a</sup>/BcGla* Fliegen gekreuzt. Da *rl* Fliegen homozygot nicht lebensfähig sind wird der Stamm über einem Balancer-Chromosom gehalten. Normalerweise trägt dieses die Marker *SM6* und

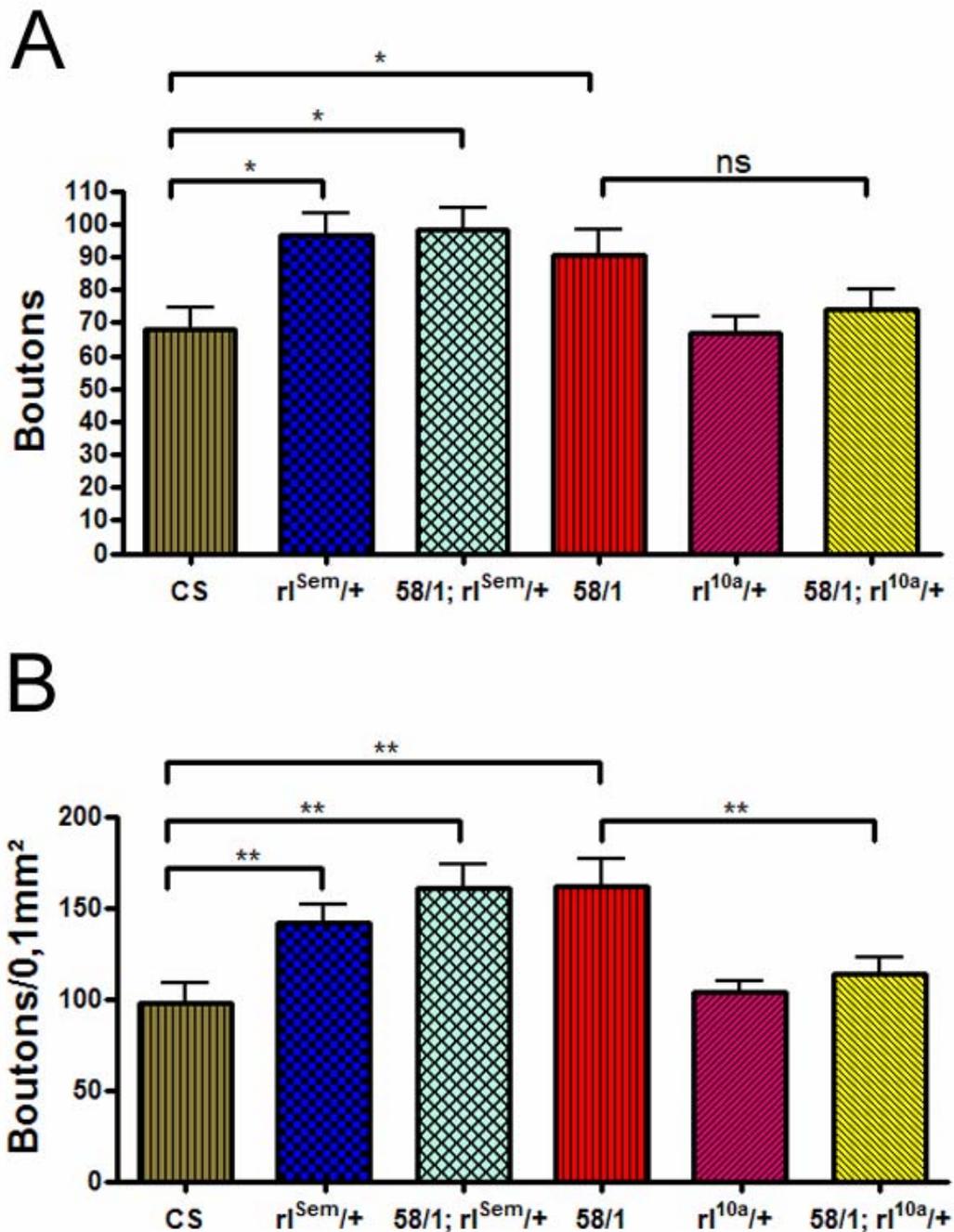


Abb. 32: Genetische Epistasis-Experimente mit *rsk* und *rl*. (A) Die Mutante *rl<sup>Sem</sup>* hat mehr Boutons als CS. Durch die zusätzliche Entfernung des *rsk*-Gens in der

Doppelmutante  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}/Y; r^{Sem}/+$  ( $58/1; r^{Sem}/+$ ) wird die Bouton-Zahl nicht weiter erhöht. Die  $r^{10a}$  Mutation hat keinen Effekt auf die Bouton-Zahl in heterozygoten Tieren, unterdrückt jedoch den Bouton-Defekt von  $58/1$ . Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant, im Gegensatz zur Bouton-Zahl pro Muskelfläche: Hier ist die Unterdrückung der Bouton-Zahl durch die  $r^{10a}$  Mutation bei  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}$  Larven signifikant (B). CS: N=15;  $r^{Sem}/+$ : N=14;  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}/Y; r^{Sem}/+$  ( $58/1; r^{Sem}$ ): N=12;  $58/1$ : N=17;  $r^{10a}/+$ : N=16;  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}/Y; r^{10a}/+$ : N=18 in A und B. Es wurden nur männliche Larven verwendet.

CyO. Zur Erkennbarkeit in der Larve wurde ein Balancer-Chromosom mit dem Marker *Bc* (*black cells*) verwendet welches bei Larven schwarze Punkte erzeugt. Die männlichen Larven aus oben genannter Kreuzung ohne schwarze Punkte müssen dann den Genotyp  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}/Y; r^{10a}/+$  haben und wurden auf ihre Bouton-Zahl untersucht. Sie hatten signifikant weniger Boutons als die männlichen Nachkommen einer Kontrollkreuzung zwischen  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}$  Weibchen und CS Männchen, in der Abb. 32 einfach als  $58/1$  bezeichnet. Für diese Kontrolle wurde auch eine Kreuzung angesetzt um gleiche Bedingungen v.a. bezüglich Anzahl der Larven pro Glas zu schaffen, da diese, wie oben erwähnt, einen Einfluß auf die Bouton-Zahl haben kann. Die Reduktion der Bouton-Zahl durch die *rl* Mutation war nur dann signifikant, wenn man die Bouton-Zahl auf die Muskelfläche bezog (Abb 32 B) und nicht bei der absoluten Bouton-Zahl. Das könnte daher kommen, daß noch eine normale Kopie des *rl* Gens vorhanden ist und damit der Effekt der Reduktion der Bouton-Zahl nurpartiell ist. Die männlichen heterozygoten  $r^{10a}/+$  Larven selbst hatten die gleiche Bouton-Zahl wie die CS-Larven, was das Ergebnis von Koh et al. (2002) bestätigt. Parallel wurde wieder die Bouton-Zahl in CS-Larven bestimmt und hierbei bestätigte sich noch einmal das Ergebnis, daß  $58/1$  Fliegen mehr Boutons als WT-CS Fliegen haben.

Die  $r^{Sem}$  Mutation führt durch den Ersatz der Aminosäure Aspartat Nummer 334 durch Asparagin (Brunner 1994) dazu, daß das RL Protein nicht mehr an das RSK Protein bindet. Dies sollte dazu führen, daß RSK RL-abhängige Prozesse nicht mehr hemmen kann. In der Tat haben  $r^{Sem}$  Larven ähnlich wie  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}$  Larven mehr Boutons, was ebenfalls schon von Koh (2002) gezeigt worden war. Wenn RSK die Bouton-Zahl wirklich über RL beeinflusst, sollte eine Doppel-Mutante  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}/Y;$

$rl^{Sem}/+$  nicht noch mehr Boutons haben als die Einzel-Mutanten. Wenn beide Proteine bezüglich des Bouton-Effekts in verschiedenen Signalwegen liegen und über verschiedene Signalwege das Boutonwachstum beeinflussen, sollte man erwarten, daß die Doppelmutante noch mehr Boutons hat. Der Effekt sollte also additiv sein. Es stellte sich heraus, daß die Doppelmutante genauso viele Boutons hat wie die Einzel-Mutanten. Daraus ist also zu folgern, daß RSK den hemmenden Effekt auf das Synapsenwachstum hauptsächlich über die Hemmung von RL ausübt. Es wurden  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}$  Weibchen oder, für die Kontrolle, WT CS Weibchen mit  $l(1)phl/Y$ ;  $rl^{Sem}/rl^{Sem}$  Männchen gekreuzt und nur männliche Larven mit dem Genotyp  $Df(1)ign^{\Delta 58/1}/Y$ ;  $rl^{Sem}/+$  oder  $+/Y$ ;  $rl^{Sem}/+$  ausgewertet (Abb. 26). Die  $l(1)phl$  Mutation unterdrückt die dominante Weibchen Sterilität von  $rl^{Sem}$ , und  $rl^{Sem}$  unterdrückt die Letalität der  $l(1)phl$  Mutation in dem Stamm, der für die Kreuzungen verwendet wurde.

#### **4. Diskussion**

Das *RSK2* Gen ist bei Coffin-Lowry-Syndrom Patienten mutiert. Dies führt einerseits zu geistiger Behinderung mit kognitiven Defiziten und Gedächtnisstörungen, andererseits zu Abnormalitäten des Skeletts sowie zu neurologischen und motorischen Auffälligkeiten. Eindeutige Hinweise für neurodegenerative Veränderungen gibt es bislang weder für das zentrale noch das periphere Nervensystem. Es war bislang zu vermuten, daß *RSK2* das Gedächtnis entweder über die synaptische Plastizität im adulten Organismus oder direkt über das Nervenwachstum oder -überleben schon in der Entwicklung beeinflusst. Möglicherweise waren feine Veränderungen auf neuronaler Ebene makroskopisch bislang nicht aufgefallen. Überraschenderweise stellte sich in dieser Arbeit heraus, daß fehlendes *RSK2* nicht zu Zelltod oder vermindertem Neuritenwachstum führt. Vielmehr führt es zu verstärktem Neuriten- und Synapsenwachstum. Das Überleben von Neuronen war im wesentlichen unbeeinträchtigt. Dies bedeutet für das Verständnis der Pathologie des CLS, daß der kognitive und neurologische Phänotyp am ehesten durch eine Dysregulation des Wachstums von Neuriten oder Synapsen entsteht, weniger durch eine degenerative Veränderung.

Im folgenden werden die einzelnen Ergebnisse in der Reihenfolge des 3. Kapitels (Ergebnisse) diskutiert.

#### 4. 1. Diskussion der Ergebnisse der Immunhistochemie im Hippocampus

Die Ribosomale S6 Kinase 2 beeinflusst das Lernen bei Mensch, Maus und Fliege. Darüber, wie RSK2 das Gedächtnis beeinflusst, lagen zu Beginn der Doktorarbeit keine Erkenntnisse vor. Da die RSK2-KO Linie von C. Bjorbaek (Dufresne 2001) nicht mehr existierte, und da A. Hanauer seine RSK2-KO Maus selbst für Untersuchungen des Gedächtnisses verwenden wollte, beschäftigte sich diese Arbeit mit den zellulären Wirkungen von RSK2 auf das Neuritenwachstum. Im Gegensatz zu anderen Modellen für neurodegenerative Erkrankungen, waren weder im Hippocampus noch im peripheren Nervensystem morphologische Korrelate eines neurodegenerativen Prozesses zu erkennen. In wildtypischen Mäusen wurde das RSK2-Protein im Hippocampus immunhistochemisch lokalisiert. Bislang war nur bekannt, daß die *RSK2* RNA v.a. in der CA3 Region des Hippocampus der Maus exprimiert ist. Mit einem N-terminalen Ak gegen RSK2 soll auch das Protein dort lokalisiert worden sein, dies ist aber ohne Abbildung im Text nur erwähnt (Zeniou 2002). Insbesondere existiert keine Spezifitätskontrolle des Antikörpers in der Immunhistochemie. Da die RSK Familienmitglieder starke Ähnlichkeit in verschiedenen Domänen miteinander haben ist eine Kreuzreaktivität des Antikörpers in der Immunhistochemie durchaus wahrscheinlich.

Deshalb wurden in dieser Arbeit drei RSK2-Ak auf ihre Spezifität an Hand der RSK2-KO Maus in der Hippocampus-Immunhistochemie getestet. Weitere RSK2-AK, die erst später bei Motoneuronen getestet wurden und zu Beginn der Arbeit noch nicht zur Verfügung standen, wurden im Hippocampus nicht getestet. Einer der drei Ak, ein p-RSK2-Ak, zeigte in der KO Maus so gut wie keine Färbung mehr, im WB war das Signal abwesend. Im Kortex der KO Maus lieferte der AK jedoch eine Bande, so daß davon auszugehen ist, daß er im Prinzip nicht spezifisch ist. Unter der Annahme, daß im Hippocampus RSK1 und RSK3 so niedrig exprimiert sind, daß der p-Ak dort praktisch nur p-RSK2 erkennt wurden mit diesem Ak Doppelfärbungen zur genaueren Lokalisation angefertigt. Diese zeigten eine präsynaptische Lokalisation in den Moosfaser-Terminalen sowie eine Lokalisation in den CA3 und CA1

Pyramidenzell-Körpern sowie in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus. Das Ergebnis ist wegen der möglichen Kreuzreaktivität im Hippocampus (stärkere Färbung als in der 2.Ak-Kontrolle) nicht voll befriedigend, gibt aber zumindest einen vorläufigen Hinweis auf die Verteilung des RSK2-Proteins im Hippocampus, nachdem von Zeniou überzeugend nur die *RSK2* RNA dort lokalisiert wurde. Das breite Band in Abb 7 dieser Arbeit aus der Publikation von Zeniou erinnert an die halbmondförmige Struktur in der p-RSK2 Färbung, die der synaptischen Kontaktregion zwischen Moosfasern und Pyramidenzell-Dendriten entspricht.

Die LTP in den Moosfasern ist im Gegensatz zu der Schaffer-Kollateral-LTP rein präsynaptisch (Zalutsky 1990). Sie ist abhängig von präsynaptischem  $Ca^{2+}$  Einstrom (Kandel 2000). RSK2 könnte also eine Rolle bei der Ausbildung von präsynaptischer LTP in dieser Hippocampus-Region bei der Maus spielen, möglicherweise auch durch eine Beeinflussung des  $Ca^{2+}$  Einstroms, da sich ja in den spontanen  $Ca^{2+}$ -Einströmen in RSK2-KO Motoneuronen deutliche Auffälligkeiten gezeigt hatten. Eine solche Funktion könnte auch beim Menschen für die Gedächtnisbildung wichtig sein. Für Menschen liegen kaum Erkenntnisse dahingehend vor. Es wurde bislang nur die *RSK2* RNA im Foetus in den Hippocampus Anlagen nachgewiesen (Guimiot 2004).

Bei *Drosophila* scheint RSK an der neuromuskulären Synapse auch eine präsynaptische Bedeutung zu haben. Dort wurde überexprimiertes RSK in der Immunhistochemie lokalisiert. Auch in Motoneuronen der Maus in Zellkultur ist RSK2 „präsynaptisch“ in den Wachstumskegeln exprimiert, wenn auch in Zellkultur mit vereinzelt Neuronen sich eigentlich keine funktionelle Synapse ausbilden kann. Färbungen an der Präsynapse der neuromuskulären Endplatte *in vivo* wurden mit RSK2-Ak nicht erfolgreich durchgeführt. Es ist ebenso möglich, daß RSK2 bei der Gedächtnisbildung im Hippocampus der Maus außer in der CA3 Region z.B. noch im Gyrus Dentatus oder in der CA1 Region eine Rolle spielt. Dort war das Phospho-Protein jedoch hauptsächlich in den Zellkörpern exprimiert. Die Lokalisation an der Präsynapse in CA3 macht einen Einfluß auf die Funktion der Synapse dort wahrscheinlicher.

Auf den ersten Blick scheinen Ergebnisse bei primären corticalen Neuronen auf eine postsynaptische Funktion von RSK2 bei der synaptischen Transmission hinzuweisen

(Thomas 2005). RSK2 bindet mit einer Region am C-Terminus, die als PDZ [postsynaptic density fraction (PSD)95/discs large/ZO-1] Ligand bezeichnet wird, PDZ Domänen Proteine wie z.B. Proteine der Shank (src homology 3 domain and Ankyrin repeat-containing protein-1) Familie. Eine Kinase-inaktive Variante von RSK2 hemmt nur dann die AMPA-Rezeptor abhängige mEPSC (miniature evoked postsynaptic current) Frequenz wenn auch der C-terminale PDZ Ligand vorhanden ist. Der Einfluß auf die postsynaptische EPSC Frequenz ist also von der PDZ-Region, also wahrscheinlich auch von der Bindung an PDZ Domänen Proteine abhängig. Die Frequenz der mEPSCs, die hier signifikant vermindert war, ist allerdings präsynaptischer Genese, da sie die Häufigkeit der einzelnen ausgeschütteten Transmittervesikel anzeigt, wogegen die mEPSC Amplitude postsynaptischer Natur ist und hier nicht verändert war. Die Autoren versuchen diesen Befund durch ein retrogrades Signal zur Präsynapse zu erklären, dies muß aber durch weiterführende Experimente erst bewiesen werden.

In einer anderen Arbeit wurde ein Anstieg von p-RSK1 in der CA3-Region und im Gyrus Dentatus der Maus nach Elektroschock-Kontext-Lernen (contextual fear conditioning) gezeigt. Dieser Anstieg wurde durch Quantifizierung des Signals in der Immunhistochemie mit einem p-RSK1 Ak von Santa Cruz gemessen ohne daß jedoch die Spezifität des Aks gezeigt wurde so daß hier durchaus auch das Signal von p-RSK2 gemessen worden sein könnte. P-RSK1 wurde sowohl in den Moosfasern als auch in den Pyramidenzellen nachgewiesen. 30 min nach Konditionierung war der Anstieg hauptsächlich in CA3 Pyramidenzell-Nuklei zu finden, so daß von einer Translokation in den Nukleus ausgegangen wird (Sananbenesi 2002).

Bei der wahrscheinlichen Redundanz der Funktionen der RSK Familienmitglieder wäre die Untersuchung einer RSK1-4 KO Maus interessant. Eine RSK1-3 Triple-KO Maus existiert im Labor von A. Hanauer. Es gibt eine Publikation über CSF (cytostatic factor) Aktivität in Oozyten von diesen Mäusen (Dumont 2005). Im Verhalten wurden sie noch nicht getestet wegen des großen Kreuzungsaufwandes (A. Hanauer, persönliche Mitteilung). Es wäre auch weiterführend, an diesen Mäusen die Spezifitätskontrolle mit dem p-RSK2 Ak durchzuführen, um zu sehen, ob das schwache Restsignal dann verschwunden ist.

Auf welche Weise RSK2 im Hippocampus die synaptische Plastizität beeinflusst, ist eine offene Frage. Falls es im Hippocampus auch, wie beim Axon- und Bouton-Wachstum, zu einer Hemmung der ERK-Phosphorylierung kommt, könnte bei fehlendem RSK2 eine überschießende ERK-Aktivierung die LTP ungünstig beeinflussen. ERK spielt nachweislich eine Rolle bei Lernen und Gedächtnis (Atkins 1998).

#### 4. 2. Diskussion der Ergebnisse der Motoneuron- und PC12-Zell Experimente *in vivo* und *in vitro*

Embryonale Motoneurone in Zellkultur eignen sich sehr gut für Kurzzeit-Untersuchungen zum Überleben und Neuritenwachstum oder zur Erforschung von damit zusammenhängenden Signalprozessen. Sie lassen sich durch einen Aufreinigungsvorgang mittels eines p75 Antikörpers von anderen Zellen des embryonalen Rückenmarks separieren. Man kann Dendriten und das Axon mit seinen Verzweigungen meist gut unterscheiden. In dieser Arbeit wurden einerseits Motoneurone von RSK2-KO Mäusen als auch WT-Motoneurone untersucht, die mit RSK2-Konstrukten infiziert wurden. Auf den ersten Blick mag es verwirrend scheinen, daß man Motoneurone von Mäusen untersucht, die keinen motorischen Phänotyp aufweisen, was sich auch in entsprechenden Untersuchungen der Koordination und Muskelkraft bestätigte. Es soll jedoch hier das kultivierte Motoneuron als eine Nervenzelle, die im Prinzip mit einem zentralen Neuron verglichen werden kann, untersucht werden. Man sollte so auch Aufschluß über zentrale Vorgänge, die die Kognition und das Gedächtnis betreffen, erhalten. In dieser Hinsicht ist der Einfluß auf das motorische System *in vivo* irrelevant. Andererseits haben CLS-Patienten in der Tat motorische Auffälligkeiten wie einen verminderten Muskeltonus oder eine Muskelatrophie und es zeigten sich auch histologisch neurogene Veränderungen in der Muskelbiopsie sowie eine verminderte Amplitude und Nervenleitgeschwindigkeit in der Neurographie (Vine 1986). Außerdem wurden die RSK2-KO Mäuse nur wenigen groben Motorik-Tests unterzogen, die nicht ausschließen, daß ev. feinere motorische Defekte vorliegen.

Das wichtigste Ergebnis bei den RSK2-KO Motoneuronen war zugleich ein überraschendes Ergebnis: Die Axone waren länger als bei WT-Kontroll Neuronen.

Dieser Befund bestätigte sich auch in mehreren wesentlich später durchgeführten Experimenten nach Rückkreuzung der Mäuse mit C57Bl/6 Mäusen. Bei den Dendriten war eine Tendenz zu verstärktem Wachstum vorhanden. Wegen wechselnder Ergebnisse bei fehlender Signifikanz wurden in späteren Experimenten nur noch die Axone beurteilt. In die gleiche Richtung wies der Befund, daß konstitutiv aktives RSK2 in WT Motoneuronen zu einer Verkürzung der Axone führt.

Die längeren Axone bei RSK2-KO Neuronen waren unerwartet, da RSK2 CREB phosphoryliert (Xing 1996, 1998), weshalb RSK2 früher auch als CREB-Kinase bezeichnet wurde. CREB wiederum wirkt positiv auf das Axonwachstum. Sensorische und sympathische Neurone von CREB-KO Mäusen haben kürzere Axone in Kultur (Schmid 1999, Lonze 2002, Banno 2008). Also sollte RSK2 als CREB-Kinase positiv auf das Axonwachstum wirken. Bisher gab es wenige Ergebnisse bezüglich der Bedeutung von RSK für Axonwachstum und synaptische Plastizität. RSK3 scheint einen positiven Effekt auf das Auswachsen von Neuriten bei PC12-Zellen zu haben, so ein vorläufiges Ergebnis aus dem Labor von W.D.Snyder (Poster neuroscience meeting; Li 2005). Überexpression von konstitutiv aktivem RSK1 in PC12-Zellen führt zu Neuritenwachstum in der Abwesenheit des normalerweise nötigen Wachstumsfaktors NGF, wogegen konstitutiv aktives RSK2 diesen Effekt nicht hat (Silverman 2004). Dieses Ergebnis stimmt damit überein, daß RSK2 auch in Motoneuronen keinen positiven Effekt auf das Neuritenwachstum hat, sondern im Gegenteil das Axonwachstum zu hemmen scheint. Denn in Abwesenheit des Proteins wachsen die Axone länger. In Zusammenschau mit den Befunden von Silverman läge hier eine der wenigen Isoform-Spezifitäten von RSKs vor, die sogar in die entgegengesetzte Richtung geht: RSK1 stimuliert das Neuritenwachstum, RSK2 nicht. RSK2 hat sogar einen negativen Effekt auf das Neuritenwachstum. Ob dies grundsätzlich und unter allen Bedingungen der Fall ist und ob es sowohl für die Entwicklung als auch für das adulte Nervensystem zutrifft gilt es durch weitere Experimente herauszufinden.

Im Gegensatz dazu besteht bei der Regulation des Überlebens von Motoneuronen vermutlich ein Ausgleich der verlorenen Funktion von RSK2 durch andere RSK Familienmitglieder oder MSK Familienmitglieder im Sinne einer Redundanz. Denn RSK2-KO Motoneurone sind in Bezug auf das Überleben unbeeinträchtigt.

Überraschend ist dieser Befund vor allem im Hinblick auf das degenerative Krankheitsbild beim CLS. Weiterhin ist er überraschend, da berichtet worden war, daß RSK2 in der Gegenwart von neurotrophen Faktoren das Überleben von Neuronen durch Phosphorylierung und damit Inaktivierung von BAD, einem proapoptotischen Protein, fördert (Bonni 1999). Phosphorylierung des proapoptotischen Proteins DAPK (Death-associated protein kinase) durch RSK1 und RSK2 ist ebenso überlebensfördernd (Anjum 2005). Über die Regulation der Transkription z.B. des anti-apoptotischen Gens *Bcl2* sollte RSK2 auch einen fördernden Effekt für das Überleben haben (Bonni 1999). Demgegenüber war das Überleben der Motoneurone nach vier und sieben Tagen in Zellkultur normal. Jedoch konnten die KO-Neurone bei fehlenden neurotrophen Faktoren nach sieben Tagen besser überleben.

Wie in der Einleitung dargelegt hat außer neurotrophen Faktoren auch noch das Vorkommen von Depolarisationen und damit zusammenhängendem  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom einen überlebens-fördernden Effekt auf Neurone. In PC12-Zellen unter genau solchen Bedingungen ohne neurotrophe Faktoren führt die Herunterregulation von RSK2 mittels siRNA zu einer erhöhten BAD-Phosphorylierung, was überlebens-fördernd sein sollte (Clark 2007). Es gibt Hinweise, daß eher MSK1 als RSK2 die hauptsächliche Kinase ist, die sowohl BAD als auch CREB phosphoryliert (Clark 2007). Das würde auch erklären, daß bei fehlendem RSK2 das Überleben mit neurotrophen Faktoren nicht verändert ist.

Möglicherweise hat RSK2 unter verschiedenen überlebens-fördernden Bedingungen wie neurotrophe Faktoren und z.B.  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in Abwesenheit von neurotrophen Faktoren unterschiedliche Funktionen. In Abwesenheit von neurotrophen Faktoren scheint es einen pro-apoptotischen Effekt zu haben, indem es die BAD-Phosphorylierung hemmt, und dies wahrscheinlich über eine Hemmung der ERK-Phosphorylierung erreicht (Clark 2007). Daß bei den Motoneuronen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom selbst von Bedeutung für diese Funktion ist, ist aber eher unwahrscheinlich, da die RSK2-KO Motoneurone kaum spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten aufweisen, v.a. nach sieben Tagen in Kultur, wenn der Überlebenseffekt am stärksten ist.

Das Überleben der Motoneurone *in vivo* bei RSK2-KO Mäusen war im N. phrenicus, im Rückenmarks-Vorderhorn und im N. fazialis nicht beeinträchtigt. *In vivo* stehen ja auch neurotrophe Faktoren zur Verfügung und damit stimmt das Ergebnis mit der Zellkultur überein. Die kultivierten Motoneurone wurden dann noch detaillierter bezüglich der Anzahl an Axon-Verzweigungen und der Größe der Wachstumskegel untersucht. Es war ja sowohl das Hauptaxon als auch das Axon mit allen Verzweigungen im KO verlängert. Die Anzahl der Verzweigungen nahm in etwa proportional zu der größeren Länge des Hauptaxons zu, was bedeutet, daß die längeren Axone nicht durch einen selektiven Mechanismus der stärkeren Verzweigung zustandekommen, sondern daß das gleichmäßige Wachstum selbst betroffen ist. An der Spitze des wachsenden Axons befindet sich der Wachstumskegel, der z.B. bei Motoneuronen von SMN-KO Mäusen um mehr als 60% kleiner ist als bei WT Mäusen (Rossoll 2003). Bei RSK2-KO Mäusen war der Wachstumskegel signifikant kleiner, wobei der Unterschied nur etwa 10% betrug. Aufgrund der hohen N-Zahl stellte sich aber doch ein signifikanter Unterschied heraus, dessen Bedeutung nicht klar ist, und der auch nicht weiter verfolgt wurde.

Um *in vivo* noch weitergehend das motorische System zu betrachten, wurde die motorische Endplatte angefärbt und die Größe der postsynaptischen Region bestimmt. Es zeigte sich, passend zu der inhibitorischen Funktion von RSK2, eine größere Bungarotoxin-positive Oberfläche auf Muskeln von RSK2-KO Mäusen. Auch die Anzahl an Verzweigungen der 3D rekonstruierten Postsynapse war im KO erhöht. Die relativ kleinen wenn auch signifikanten Unterschiede führen offensichtlich nicht zu einem motorischen Defekt im Verhalten. Sowohl Koordination als auch Muskelkraft waren bei RSK2-KO Mäusen unbeeinträchtigt. Möglicherweise existieren im lebenden Organismus kompensatorische Mechanismen die eine höhere Wachstumsbereitschaft der Motoneurone und auch leicht vergrößerte Endplatten kompensieren können.

Da v.a. auch die Präsynapse von Interesse ist und nicht automatisch von der Größe der Postsynapse auf die Präsynapse geschlossen werden kann, wurde die Lokalisation von CAST2 und von präsynaptischen  $Ca^{2+}$ -Kanälen immunhistochemisch untersucht. CAST2 ist ein aktive Zonen Protein, dem bei *Drosophila* das Homolog *bruchpilot* entspricht. Hierbei zeigte sich in RSK2-KO

Endplatten ein stärkeres Signal, was wieder in die selbe Richtung weist, daß RSK2 eine inhibitorische Funktion beim Nerven- und Synapsenwachstum hat.

Neben Motoneuronen von RSK2-KO Mäusen wurden auch WT-Motoneurone von C57Bl/6 Mäusen in Kultur untersucht. Diese wurden mit Lentiviren, die verschiedene RSK2-Konstrukte enthielten, infiziert. Bei den vier Konstrukten, die auch zur Infektion der PC12-Zellen verwendet wurden, zeigte sich nur in einem Fall ein Einfluß auf das Axonwachstum. Ein konstitutiv aktives Konstrukt führte zu einer Verkürzung der Axonlänge. Es handelt sich dabei um das Konstrukt mit einer C-terminalen Deletion von 54 Aminosäuren. Dadurch wird die autoinhibitorische Domäne entfernt, so daß das Protein konstitutiv aktiv wird. Die Autophosphorylierung von Ser-386, welches durch die C-terminale Domäne phosphoryliert wird, ist erhöht, und die S6 Peptid Phosphorylierung erfolgt trotz Behandlung mit einem MEK-Inhibitor, wogegen bei wildtypischem RSK2 diese nur in Abwesenheit des MEK-Inhibitors nach Insulin oder EGF Stimulation erfolgen kann (Poteet-Smith 1999). Der MEK-Inhibitor (PD 98059) hemmt mit MEK auch ERK und damit die Aktivierung von RSK2. Dies macht aber nur bei der anderen konstitutiv aktiven RSK2 Variante („Y“) einen Unterschied, da bei der als D bezeichneten Form mit der Deletion auch die ERK Bindungsdomäne fehlt, so daß die konstitutiv vorhandene Aktivität nicht noch weiter durch EGF gesteigert werden kann (Poteet-Smith 1999; Abb. 3b in dieser Veröffentlichung). Warum die Variante Y mit der Punktmutation in der autoinhibitorischen Domäne nicht zu einem verkürzten Axonwachstum führt ist nicht klar. Bezüglich der S6 Phosphorylierung ist die Y Variante nicht weniger aktiv als die D Variante. Möglicherweise könnte D in Hinsicht auf andere Effekte wie die Inhibition von ERK stärker konstitutiv aktiv sein als Y, obwohl die zusätzliche Aktivierung durch ERK fehlt. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, daß bei D die als PDZ Ligand bezeichnete Domäne, die an PDZ-Regionen bindet, fehlt, während sie bei Y vorhanden ist. Wie in der Einleitung ausgeführt hat Thomas (2005) gezeigt, daß RSK2 vermutlich über die Domäne mit der Aminosäure-Folge STAL am äußersten C-Terminus von RSK2 PDZ-Domänen Proteine wie Shank bindet. Durch einen solchen Mechanismus könnte die subzelluläre Lokalisation von RSK2 bestimmt werden. Da bei D eine solche Bindung wegfallen würde könnte über eine unterschiedliche Lokalisation der Unterschied in der Wirkung der beiden konstitutiv aktiven Konstrukte erklärt werden. Die Verteilung

der GFP-Fluoreszenz hatte nicht den Anschein, daß die RSK2-Varianten unterschiedlich verteilt waren, qualitativ hochwertige Bilder gibt es jedoch nicht.

Ebenso wie das konstitutiv aktive Y-Konstrukt konnte auch wildtypisches RSK2 das Axonwachstum nicht beeinflussen. Das Kinase-inaktive Konstrukt hat im Gegensatz zu PC12-Zellen kein längeres Axonwachstum induziert. Möglicherweise reichte für solche Effekte die intrazelluläre Menge an RSK2 nicht aus. Vielleicht war die Transfektionseffizienz zu gering, so daß zu wenig Viren in dasselbe Motoneuron gelangten. Oder die vorhandene Virus-DNA wurde, trotz CMV Promotor, zu gering exprimiert. Insgesamt weist der Befund trotzdem in die selbe Richtung wie die Experimente mit den RSK2-KO Neuronen: RSK2 hat eine inhibitorische Funktion beim Axonwachstum.

In PC12-Zellen waren die Ergebnisse konsistenter. Es wurden zwei verschiedene Viren-Konstrukte für jedes RSK2-Konstrukt verwendet: Einmal mit HA tag und dem schwächeren SFFV Promotor und mit GFP tag und dem stärkeren CMV Promotor. Nur letzterer war offensichtlich stark genug, auch in Motoneuronen zu einer Expression zu führen, die auch mittels GFP Fluoreszenz sichtbar gemacht werden konnte. In PC12-Zellen führte der schwächere SFFV Promotor jedoch ebenfalls zu stark angefärbten Zellen in der HA-Immunzytochemie so daß hier beide Konstrukt-Varianten verwendet werden konnten. Zusammengefasst führten die konstitutiv aktiven Konstrukte zu kürzeren und die Kinase-toten Konstrukte zu längeren Neuriten bei PC12-Zellen, bei denen kein Unterschied zwischen Axonen und Dendriten besteht. Im Gegensatz zu Motoneuronen führte das Y Konstrukt mit der Punktmutation zu einer stärkeren Verkürzung als D, welches im Falle des SFFV Promotors sogar überhaupt keinen Effekt zeigte. Hier wären ähnliche Unterschiede in der Verteilung durch den fehlenden PDZ-Liganden wie oben beschrieben denkbar. Die Lokalisation innerhalb der Zelle war jedoch bei den verschiedenen Konstrukten nicht verschieden. Vielleicht war die Sensitivität der Nachweismethode nicht hoch genug. Beim Kinase-toten Konstrukt war die Verlängerung der Neuriten nur beim SFFV Promotor signifikant.

Wenn fehlendes RSK2-Protein in Motoneuronen zu verändertem Wachstum führt sollte man annehmen, daß RSK2 in Motoneuronen exprimiert wird. Um endogenes

RSK2 zu detektieren stellt sich hier das gleiche Problem mit der Spezifität wie in der Hippocampus Immunhistochemie. Außer den drei RSK2-Ak, die im Hippocampus ausprobiert wurden, wurden noch mehrere weitere RSK2-Ak auf ihre Verwendbarkeit getestet. Einige zeigten überhaupt kein Signal, bei einigen war kein Unterschied zwischen WT- und KO-Neuronen zu sehen. Bei dem Biotrend Ak KAS-ST007E war ein Färbesignal im WT vorhanden, im KO war das Signal nicht mehr vorhanden, so daß von einer Spezifität ausgegangen werden kann. Mit diesem Ak konnte das endogene RSK2-Protein in Motoneuronen lokalisiert werden. Es war in Nukleus, Zellsoma, Axon, Dendriten und Wachstumskegel vorhanden. *In vivo* wurde der Ak nicht eingesetzt, ebenso nicht in PC12-Zellen.

RSK2 ist also in Motoneuronen exprimiert und hat einen Einfluß auf das Axonwachstum. Als nächstes stellte sich die Frage, über welchen Weg RSK2 einen solchen inhibitorischen Effekt ausübt. Das Axonwachstum in Motoneuronen könnte über eine veränderte Gen-Transkription, mRNA-Translation, dies ev. auch lokal, oder eine veränderte Synthese von Mikrotubuli und Neurofilamenten beeinflusst werden. Nach EGF-Stimulation von Fibroblasten oder murinen embryonalen Stammzellen phosphoryliert RSK2 das Histon H3, was über eine Veränderung der Chromatin-Struktur zu verstärkter Gen-Transkription führen könnte (Sassone-Corsi 1999). Falls RSK2 so in Motoneuronen zu einer verstärkten Transkription von bestimmten Wachstums-hemmenden Faktoren führt könnte dies die verlängerten Axone in RSK2-KO Motoneuronen erklären. Eine solche Hypothese ist aber schwer zu testen.

RSK2 hat auch einen Einfluß auf die lokale Translation. Wie in der Einleitung dargelegt ist die primäre *in vivo* S6 Kinase die p70 S6 Kinase, die von mTOR (mammalian target of rapamycin) aktiviert wird und die Initiierung der Translation unterstützt. Erst gegen Ende der Abfassung dieser Arbeit zeigten sich in Publikationen Hinweise, daß auch die p90 S6 Kinase, also RSK, *in vivo* das S6 Protein unabhängig von mTOR phosphoryliert (Roux 2007). Aber auch unabhängig von der S6 Phosphorylierung kann RSK2 die Translation beeinflussen: Nach Stimulation metabotroper Glutamatrezeptoren in hippocampalen Schnitten der Ratte wandern RSK1 und RSK2 zu Polyribosomen und bilden mit anderen Proteinen wie ERK2 und GSK3 $\beta$  einen Protein Translations-Komplex. Die Phosphorylierung der konstitutiv aktiven Kinase GSK3 $\beta$  durch RSK2 führt zu deren Inaktivierung. Die

Phosphorylierung des Translations Initiations Faktors eIF2B durch GSK3 $\beta$  hemmt die Translation. Also würde die Phosphorylierung und Inhibierung von GSK3 $\beta$  durch RSK2 an den Polyribosomen über eIF2B zu einer Steigerung der Translation führen (Angenstein 1998). Damit müßte über diesen Mechanismus in RSK2-KO Motoneuronen die Translation reduziert sein, was eher zu kürzeren Neuronen führen würde. Allerdings führt die Hemmung von eIF2B auch zur *Steigerung* der Translation einiger ausgewählter mRNAs wie z.B. ATF4, was als Transkriptionsfaktor wiederum die Transkription bestimmter für das Wachstum wichtiger mRNAs steigern könnte (Proud 2005). Also könnte nach diesem Mechanismus der KO von RSK2 über eine Steigerung ausgewählter mRNAs bei reduzierter Gesamt-Translation zu einem verstärkten Axonwachstum führen. Dieser sehr hypothetische Mechanismus wurde experimentell in dieser Arbeit nicht verfolgt.

Schließlich wurde über die Analyse der Expression und Phosphorylierung dreier Kinasen der Signaltransduktion, die mit RSK2 interagieren, ein möglicher Effekt von RSK2 auf das Axonwachstum über eine Beeinflussung der Mikrotubulus-Dynamik gefunden. Es wurden ERK1/2, AKT und GSK3 $\beta$  untersucht. ERK1/2 aktiviert, wie in der Einleitung erwähnt, RSK2 durch Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (Scimeca 1992). GSK3 $\beta$  wird von RSK2 an Ser<sup>9</sup> phosphoryliert (Sutherland 1993; Eldar-Finkelman, 1995). AKT wird durch PDK1 aktiviert (Alessi 1997), welches mit RSK2 assoziiert und durch diese Interaktion aktiviert wird (Frödin 2000). Die Expression und Phosphorylierung dieser drei Kinasen wurde im embryonalen Rückenmark, aus dessen Motoneuronen die Motoneuron-Kulturen hergestellt werden, und im adulten Rückenmark im WB untersucht. Die Expression der Proteine war im adulten Rückenmark zwischen RSK2-KO und WT nicht verschieden. Jedoch gab es einen Unterschied zwischen RSK2-KO und WT im embryonalen Rückenmark beim Phosphorylierungszustand von ERK1/2 (nicht bei AKT und GSK3 $\beta$ ). Hier war insbesondere die ERK2 Bande mit dem geringeren Molekulargewicht von 42 kDa im KO intensiver. Bei wahrscheinlicher Kreuzreaktion der Ak ist eine Differenzierung hier jedoch problematisch.

Mit den selben p-Ak wie im WB wurden Immunfärbungen in Motoneuronen in Kultur gemacht. Hier zeigte sich bei p-ERK ein stärkeres Signal bei RSK2-KO Motoneuronen, wie schon im WB. Zusätzlich war aber auch das p-AKT Signal bei

RSK2-KO Neuronen verstärkt, dies im Gegensatz zum WB mit dem p-AKT-Ak. Diskrepanzen zwischen WB von gesamtem Rückenmark und Immunzytochemie von isolierten Motoneuronen sind nicht erstaunlich, da die Motoneurone nur einen kleinen Teil der Zellpopulation im Rückenmark ausmachen. Man könnte sich vorstellen, daß bei fehlendem RSK2 weniger PDK1 an RSK2 gebunden vorliegt und damit mehr durch andere Mechanismen aktiviertes PDK1 bereitsteht, AKT zu phosphorylieren. Bei p-GSK3 $\beta$  bestand kein Unterschied in kultivierten Motoneuronen. Weiterhin war die ERK-Phosphorylierung an der neuromuskulären Synapse von adulten RSK2-KO Mäusen erhöht. Wie schon in mehreren früheren Veröffentlichungen angedeutet, hat also RSK2 einen inhibitorischen Effekt auf die ERK-Phosphorylierung.

Um einen Bezug zum Motoneuronwachstum herzustellen, wurde ein Rettungs-Experiment mit dem MEK-Inhibitor U0126 durchgeführt, der über MEK auch ERK hemmen sollte. Diese Hemmung von MEK bzw. ERK führte in RSK2-KO Motoneuronen zu einer Normalisierung des Axonwachstums. Das bedeutet, daß der Inhibitor die gesteigerte ERK-Phosphorylierung in RSK2-KO Motoneuronen reduziert und dadurch das Axonwachstum wieder verringert, was zeigt, daß ein Zusammenhang zwischen der höheren ERK-Phosphorylierung und dem gesteigerten Axonwachstum in RSK2-KO Motoneuronen besteht. Die Hemmung von p-ERK in WT-Neuronen reicht nicht aus, das Axonwachstum zu verringern, wobei keine Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors gemacht wurden. Möglicherweise könnte eine höhere Konzentration auch zu einer Verkürzung bei WT-Neuronen führen. Die verwendete Konzentration war 5  $\mu$ M. U0126 hemmt in der doppelten Konzentration von 10  $\mu$ M das Hinterwurzel-Ganglien-Axonwachstum (Liu 2001). Daß die RAS/RAF/MEK/MAPK-Kaskade bei Wirbeltieren das Neuritenwachstum positiv beeinflusst, wurde v.a. *in vitro* außer bei Liu noch in mehreren anderen Arbeiten gezeigt (Markus 2002). Das Neuritenwachstum bei embryonalen Hinterwurzel-Ganglien wird positiv durch RAF beeinflusst (Zhong 2007). Konsitutiv aktives RAS oder RAF stimulieren das Axonwachstum bei kultivierten Neuronen aus Hinterwurzel-Ganglien (Markus 2002). Kultivierte Motoneurone von C-RAF-KO Mäusen schienen in einer Untersuchung, die sich auf das Überleben konzentrierte, kürzere und weniger verzweigte Neuriten zu haben (Wiese 2001). Interessanterweise ist das Wissen über den genauen Mechanismus, wie ERK das

Axonwachstum beeinflusst, sehr gering. Ein solcher Mechanismus wird weiter unten beschrieben (Goold 2005).

Ob in PC12-Zellen die ERK-Phosphorylierung mit den konstitutiv aktiven RSK2-Konstrukten erniedrigt und durch das Kinase-inaktive Konstrukt erhöht wird konnte bis zum Abschluß der Doktorarbeit in WB-Experimenten nicht mehr beantwortet werden.

Wie in der Einleitung dargelegt, liegt RSK2 in der Signalkaskade unterhalb von ERK1/2. Die Phosphorylierung verschiedener Ser und Thr Reste von RSK2 wird direkt oder indirekt durch die Aktivierung von ERK1/2 initiiert (Blenis 1993, Dalby 1998, Frödin 1999). Damit muß die Hemmung der ERK-Aktivierung durch RSK2 über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus erfolgen. Ein solcher Mechanismus könnte über die Phosphorylierung von SOS durch RSK2 zustande kommen, was über eine Dissoziation von SOS von GRB2 zu einer Hemmung von RAS und damit auch von ERK führen würde (Douville 1997). Dieser Mechanismus wurde als Erklärung für die erhöhte ERK-Phosphorylierung im Muskel von RSK2-KO Mäusen vorgeschlagen (Dufresne 2001). Die Autoren schlugen außerdem vor, daß die Expression von ERK Phosphatasen in RSK-defizienten Zellen reduziert sein könnte, da der ERK Signalweg selbst die Expression von bestimmten ERK Phosphatasen erhöhen kann. Wenn ERK dies über RSK erreichen würde, hätten RSK2-defiziente Zellen weniger ERK Phosphatase Aktivität und damit eine höhere ERK Aktivität. Ein Beispiel einer solchen ERK Phosphatase ist MKP1/Dual specificity Phosphatase 1 (MKP1/DUSP1).

Ein weiteres Argument für eine Rückkopplungs-Hemmung des ERK Signalwegs ist der Befund einer erhöhten ERK-Phosphorylierung in PC12-Zellen und kortikalen Neuronen, wenn RSK2 durch siRNA knock-down reduziert wird (Clark 2007). Nach Ansicht dieser Autoren könnte RSK auch über 14-3-3 Proteine RAF regulieren, welches wie RAS oberhalb von ERK liegt. In einer anderen Publikation wurde gezeigt, daß die basale und 5HT<sub>2A</sub> Rezeptor vermittelte ERK-Aktivierung in RSK2-KO Fibroblasten erhöht ist (Sheffler 2006). Zudem hemmt RSK die ERK-abhängige Augen- und Flügel-Differenzierung bei *Drosophila*, und zwar unabhängig von SOS (Kim 2006), und reduziert, ebenfalls ERK-abhängig, die Bouton-Zahl an der

neuromuskulären Synapse, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde (Fischer(b), 2009). Auch RSK4 hemmt die Aktivierung von ERK (Myers 2004). Von RSK1 und RSK3 gibt es dahingehend bislang keine Anzeichen.

Auf welchem Weg führt nun die höhere ERK-Phosphorylierung zu längeren Axonen in Motoneuronen? Ein denkbarer Mechanismus ist in Abb. 33 dargestellt und betrifft die Mikrotubulus-Dynamik, die neben der Transkriptions- und Translationsregulierung oben als dritter möglicher Mechanismus der Axonwachstums-Regulation durch RSK2 beschrieben wurde. Phosphoryliertes MAP1b (Mikrotubulus assoziiertes Protein 1b) führt zu einem verstärkten Mikrotubulus- und Axonwachstum, indem die Mikrotubuli in einem dynamischen Zustand gehalten werden. Mikrotubuli, die sich fortdauernd verkürzen oder verlängern können insgesamt besser wachsen, da sie besser auf extrazelluläre Reize reagieren können. Weiterhin wichtig für die Länge von Mikrotubuli ist ihre Stabilität und Polymerisation, die über andere Wege reguliert wird (Zhou 2005). MAP1b wird interessanterweise durch phosphoryliertes GSK3 $\beta$  phosphoryliert und damit aktiviert, obwohl GSK3 $\beta$ , wie oben erwähnt, eine konstitutiv aktive Kinase ist, die nach Phosphorylierung inhibiert wird. Die Erklärung dafür ist, daß GSK3 $\beta$  sich gegenüber Kinasen, die vorher von anderen Kinasen phosphoryliert wurden („primed“) anders verhält als gegenüber Kinasen, die nicht durch andere Kinasen zusätzlich phosphoryliert werden wie MAP1b („unprimed“). Die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  an Ser9 z.B. durch PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) führt zur Inaktivierung von GSK3 $\beta$ . Unabhängig von dieser Ser9 Phosphorylierung führen Neurotrophine und der ERK-Signalweg zu einer Aktivierung von GSK3 $\beta$  bezüglich MAP1b und dadurch auch zu verstärktem Axonwachstum (Goold 2005). Obwohl die Aktivierung von MAP1b durch ERK über GSK3 $\beta$  läuft hängt sie nicht von einer erhöhten Phosphorylierung an einer bestimmten anderen Phosphorylierungsstelle bei GSK3 $\beta$  ab. Über diesen Weg ließe sich erklären, wie ein erhöhtes p-ERK Niveau in Motoneuronen zu längeren Axonen führt. GSK3 $\beta$  ist zwar daran beteiligt, ist aber nicht verändert phosphoryliert, weshalb im WB und der Immunzytochemie auch kein Unterschied gesehen wurde.

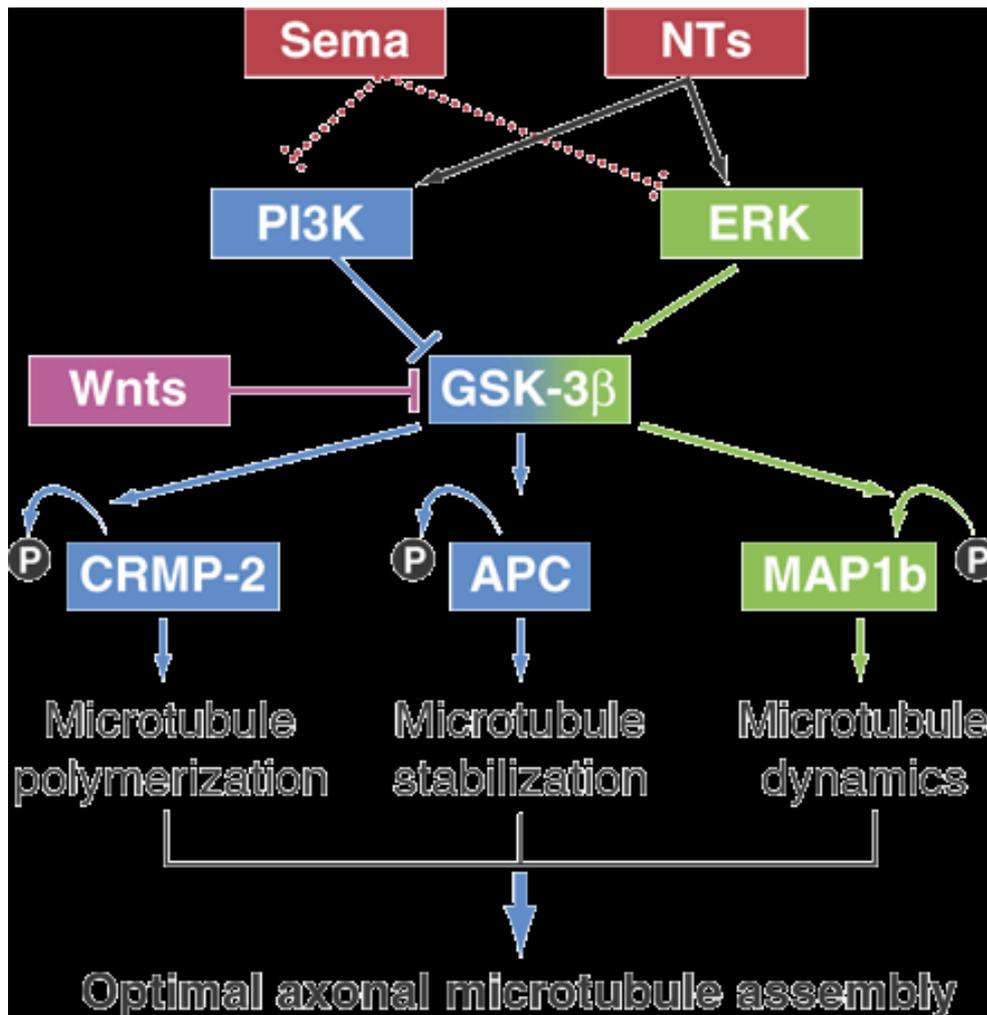


Abb. 33: Neurotrophine führen über den ERK-Signalweg und GSK3 $\beta$  zu einer Aktivierung von MAP1b. Dies führt zu einer Erhöhung der Mikrotubulus-Dynamik und damit zu stärkerem Mikrotubulus-Wachstum. Zwei andere Wege führen über eine Beeinflussung der Mikrotubulus-Stabilität und -Polymerisation ebenfalls zu verändertem Mikrotubulus-Wachstum (aus Zhou 2005).

Da bei Motoneuronen von SMN-KO Mäusen mit verändertem Axonwachstum auch Veränderungen im Ca<sup>2+</sup> Imaging bestanden (Jablonka 2007) wurden auch bei RSK2-KO Neuronen spontane Ca<sup>2+</sup>-Transienten gemessen, um möglicherweise eine Erklärung für das veränderte Axonwachstum zu finden. Es wurde bei RSK2-KO Motoneuronen eine sehr deutliche Reduktion in der Anzahl an spontanen Ca<sup>2+</sup> Einströmen in die Zelle gefunden, jedoch konnte weder ein Zusammenhang mit dem Axonwachstum hergestellt werden, noch konnte eine ursächliche Erklärung für diesen Befund gegeben werden. Die Anordnung und Menge an Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und aktive Zonen Proteinen war zwischen KO und WT nicht verschieden.

Zusätzlich wurde ein weiteres Axonwachstums-Experiment durchgeführt. Aufgrund des Befundes der veränderten Anzahl an spontanen  $\text{Ca}^{2+}$  Einströmen bestand die Vermutung, daß die KO-Motoneurone das Differenzierungssignal der  $\beta 2$ -Kette von Merosin nicht erkennen könnten. Dann würden sie auf Merosin, einer Form von Laminin mit Endplatten-typischen Untereinheiten, genauso lange Axone bekommen wie auf Laminin 111, was in den bisherigen Experimenten verwendet wurde. Dieser Verdacht bestätigte sich nicht, was auch mit dem normalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Clustering in der Immunzytochemie übereinstimmt. Merosin reduzierte sogar die Axonlänge auf WT-Niveau. Das könnte auch erklären, warum *in vivo* keine Beeinträchtigungen in der Motorik bei Testung der Muskelkraft, Koordination auf dem rotarod und der spontanen Laufaktivität im Laufrad zu finden waren. *In vivo* werden die Neurone am Muskel gestoppt. Das verlängerte Axonwachstum kommt nur in Zellkultur zum tragen, zu der zwar neurotrophe Faktoren hinzugegeben werden, in der aber keine Muskeln vorhanden sind, mit denen die Neurone synaptischen Kontakt aufbauen könnten. Durch den Kontakt mit Muskeln wird *in vivo* das Nervenwachstum eingestellt und die Differenzierung der Präsynapse beginnt.

Beim motorischen System von CLS-Patienten gibt es bislang keine Information über die Motoneuron-Anzahl, Axonwachstum sowie Anzahl an Axonen oder neuromuskulären Synapsen. Wie oben erwähnt, sprechen einige wenige elektrophysiologische Befunde für eine Schädigung von Motoneuronen. Vermutlich führt auch hier, wie bei der Maus, der Kontakt mit dem Zielgewebe zu einer regelrechten Beendigung des Neuritenwachstums.

#### 4. 3. Diskussion der Experimente an der neuromuskulären Synapse von *Drosophila*

Nachdem die *in vivo* Ergebnisse bei RSK2-KO Mäusen mit relativ geringen absoluten, wenn auch signifikanten, Unterschieden für eine Bedeutung von RSK2 für die Ausbildung der neuromuskulären Synapse sprachen, bestätigte die Untersuchung der neuromuskulären Synapse von *Drosophila melanogaster* diese Befunde. Denn auch hier hatte RSK einen negativen Einfluß auf die Synapsen-Bildung. Die absoluten Unterschiede waren deutlicher. Die Motoneurone von *Drosophila* wurden hingegen in Zellkultur nicht untersucht. Ausgegangen wurde auch von der Erkenntnis, daß bei *Drosophila* RSK die ERK-abhängige Differenzierung in der Flügel- und

Augenentwicklung hemmt (Kim 2006). Wie in der Einleitung erläutert, hat ERK einen positiven Einfluß auf die Bouton-Zahl. Also könnte RSK auch das ERK-abhängige Bouton-Wachstum hemmen. In der Tat war die Bouton-Zahl bei zwei verschiedenen RSK-Mutanten (mit der kompletten Deletion des RSK-Gens und einer N-terminalen partiellen Deletion) erhöht. Jedoch war die Größe (Länge) der Synapse im Gegensatz zu den Mäusen unverändert.

Auf genetischer Ebene konnte dieser Befund noch genauer untersucht werden. Zunächst wurde ein Rettungs-Experiment durchgeführt, um zu zeigen, daß die Veränderung auch tatsächlich durch das mutierte Gen hervorgerufen wird. Durch ein wildtypisches *rsk*-Transgen konnte die Bouton-Zahl wieder auf wildtypisches Niveau reduziert werden. Da dieses wildtypische genomische Transgen sowohl prä- als auch postsynaptisch exprimiert wird, wurde zusätzlich eine Rettung durch die Expression der *rsk* c-DNA nur in Motoneuronen versucht. Auch hier kam es zu einer signifikanten Reduktion der Bouton-Zahl, allerdings war sie nicht vollständig, so daß eine postsynaptische Komponente bei der Bestimmung der Bouton-Zahl durch RSK nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Alternativ könnte man sich vorstellen, daß die Expression präsynaptisch nicht ausreichend hoch war und deshalb nur eine partielle Rettung erreicht wurde. Ebenfalls präsynaptisch wurde die *rsk* c-DNA auch noch im Wildtyp-Hintergrund überexprimiert, was den Effekt hatte, daß die Bouton-Zahl unter das WT-Niveau reduziert wurde.

Eine höhere Bouton-Zahl könnte kompensatorisch zu einer niedrigeren Dichte an Synapsen im Sinne von aktiven Zonen führen. Der umgekehrte Fall wurde für Mutanten des cAMP Signalwegs gefunden (Shayan 2000). Larven mit der *rut<sup>1</sup>* Mutation oder Larven, die die *dnc* Phosphodiesterase überexprimieren, haben beide weniger cAMP und weniger Boutons. Dafür ist die Fläche und Menge an Synapsen in einem einzelnen Bouton erhöht. Um dies bei der RSK-Mutante (hier wurde nur die komplette Deletionsmutante untersucht) zu testen, wurden Färbungen mit dem Marker für aktive Zonen Bruchpilot (BRP) durchgeführt. Es zeigte sich in verschiedenen Auswertemethoden kein Unterschied in der mittleren Zahl oder Dichte an Synapsen pro Bouton, so daß also RSK, im Gegensatz zu cAMP, die Bouton-Zahl unabhängig von der Synapsen-Zahl (im Sinne von aktiven Zonen) reguliert.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse sollte man erwarten, daß RSK präsynaptisch in den Boutons lokalisiert ist. Es könnte aber auch sein, daß RSK vom Zellkern des Motoneurons her oder vom Muskel her das Bouton-Wachstum beeinflusst. Deswegen wurde mit Immunhistochemie versucht, das RSK-Protein zu lokalisieren. Hier existieren zwar nicht die Schwierigkeiten mit der Spezifität wie bei der Maus, da *Drosophila* nur ein RSK-Gen besitzt, wenn auch eine Kreuzreaktion mit der p70 Kinase auftreten könnte, aber bislang gibt es keinen gut funktionierenden *Drosophila*-RSK-Ak für die Immunhistochemie. Im *Drosophila* Nervensystem konnte eine schwache Färbung im Calyx-Bereich des Pilzkörpers mit einem RSK-Ak gefunden werden (T. Raabe, persönliche Mitteilung). An der neuromuskulären Synapse lieferte nur bei Überexpression von RSK ein neuer Meerschweinchen-Ak ein Signal. Da auch das GFP-markierte genomische RSK in den Boutons zu finden war, ist dies zumindest ein starker Hinweis darauf, daß RSK präsynaptisch in den Boutons lokalisiert ist. Doppelfärbungen wiesen auf eine großflächige Lokalisation im ganzen Bouton hin was an die Lokalisation in den Moosfaser-Boutons in der CA3 Region des Hippocampus erinnert, wo p-RSK2 mit Synaptobrevin kolokalisiert und ebenfalls großflächig verteilt in der Präsynapse vorliegt.

Nun stellte sich die Frage, ob RSK in *Drosophila* die Bouton-Zahl ähnlich wie bei der Flügel- und Augendifferenzierung und ähnlich wie bei Motoneuronen der Maus über ERK/RL hemmt. Dazu wurden einerseits *Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* Fliegen, also Fliegen mit der kompletten RSK-Deletion mit Fliegen mit der *erk/rl*-Mutation gekreuzt. Durch die *erk/rl*-Mutation konnte die Bouton-Zahl auf WT-Niveau reduziert werden, was bedeutet, daß bei fehlendem RSK die Erhöhung der Bouton-Zahl durch ERK erreicht wird. Ferner war bekannt, daß eine konstitutiv aktive Variante von *erk/rl* (*rl<sup>Sem</sup>*) bei *Drosophila* ebenso wie die RSK-Mutante mehr Boutons hat und daß bei dieser Mutante ERK RSK nicht mehr binden kann. Nach Kim (2006) sollte ja RSK ERK durch eine zytoplasmatische Ankerfunktion hemmen. Die Doppelmutante *rl<sup>Sem</sup>/Df(1)ign<sup>Δ58/1</sup>* hatte genau so viele Boutons wie die Einzelmutanten, so daß man daraus schließen kann, daß RSK und ERK als Teil des selben Signalwegs auf die Bouton-Zahl einwirken, sonst wäre der Effekt additiv. Beide Ergebnisse sprechen dafür, daß auch bei *Drosophila* RSK die Bouton-Zahl über eine Hemmung von ERK/RL hemmt. Diese Hemmung scheint nur bei homozygot wildtypischem ERK/RL nötig zu sein,

denn in heterozygotem Zustand macht es keinen Unterschied, ob RSK anwesend ist oder nicht. Bei niedrigerer ERK-Menge ist eine Hemmung dann nicht mehr nötig.

Nach Kim soll RSK die Translokation von ERK in den Zellkern inhibieren und dadurch die ERK-abhängige Transkription hemmen. Allerdings ist die neuromuskuläre Synapse ein eigenes Zellkompartiment, welches nur durch ein langes Axon mit dem Zellkern verbunden ist. Die Effekte von RSK und RL könnten auch lokal in der Präsynapse stattfinden. Die Verteilung von RSK in der Präsynapse nach den dargestellten Doppelfärbungen sieht der Verteilung von RL in Boutons sehr ähnlich, indem beide Proteine diffus und nicht an aktiven Zonen lokalisiert sind (Koh 2002). Es könnte also sein, daß RSK die Lokalisation von ERK in Boutons durch Bindung an ERK beeinflusst. Interessanterweise zeigt ein Ak, der aktiviertes RL erkennt, keine diffuse Verteilung mehr, sondern ein punktförmiges Muster, was am ehesten aktiven Zonen entspricht (Koh 2002). Möglicherweise könnte also an ERK gebundenes RSK dieses in der Synapse hemmen. Nur ungebundenes, phosphoryliertes und aktiviertes ERK würde zur aktiven Zone wandern.

Auch bei *Drosophila* stellte sich wie bei der Maus bezüglich des Axonwachstums die Frage, auf welche Weise ERK die Bouton-Zahl positiv beeinflusst. Ein ähnlicher Mechanismus wie in der Maus ist denkbar. Denn das *Drosophila* Homolog von MAP1b, Futsch, führt über eine Erhöhung der Mikrotubulus-Dynamik zu einem verstärkten Synapsenwachstum (Roos 2000). Ferner scheint *Drosophila* ERK über eine Regulation der Menge des Zelladhäsionsmoleküls FasciclinII die Bouton-Zahl zu regulieren (Koh 2002). Es reguliert z.B. bei *rl<sup>Sem</sup>* Fliegen die FasciclinII Menge herunter, was bekanntermaßen zu mehr Boutons führt, da für das Bouton-Wachstum die Anheftung an Umgebungsmoleküle gelockert werden muß.

#### 4. 4. Ausblick

Erstmals konnte mit den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten eine spezifische Funktion von RSK2 auf neuronaler Ebene gezeigt werden. Ein besonderes Gewicht bekommen die Ergebnisse durch die fast ausnahmslos widerspruchsfreien Einzelbefunde sowohl bei der Maus als auch bei der Fliege, die sich auch mit zahlreichen Ergebnissen aus der Literatur zur Deckung bringen lassen.

Unerwarteterweise nimmt RSK2 eine inhibitorische Funktion sowohl im ERK-Signalweg als auch beim Neuriten- und Synapsenwachstum ein. Es gab jedoch, wie in der Diskussion dargelegt, bisher schon mehrere Hinweise, daß RSK2 den ERK-Signalweg zu hemmen scheint. Interessanterweise hat die einzige RSK Form, die bei *Drosophila* vorkommt, auch eine inhibitorische Funktion.

Die nächsten Schritte zur weiteren Aufklärung der Funktion von RSK wären bei *Drosophila* die Lokalisation von ERK und RSK an der neuromuskulären Synapse mit entsprechenden spezifischen Antikörpern. Ist in der RSK-Mutante ERK an der neuromuskulären Synapse vermehrt vorhanden? Zusätzlich wäre von Interesse, bestimmte funktionelle Domänen von RSK zu mutieren und in den entsprechenden transgenen Fliegen zu prüfen, ob dann noch eine Rettung an der neuromuskulären Synapse erfolgen kann. Z. B. wäre zu erwarten, daß ein RSK-Protein ohne die C-terminale ERK Bindungs-Domäne den Bouton-Phänotyp nicht mehr retten könnte, da die Hemmung von ERK über die Bindung von RSK zu erfolgen scheint.

Da eine postsynaptische Komponente bei der Bestimmung der Bouton-Zahl durch die bisherigen Experimente nicht ausgeschlossen werden konnte wäre ein weiterführendes Experiment, mittels eines RSK RNAi-Konstrukts (Neuser 2008) nur präsynaptisch in Motoneuronen RSK zu supprimieren und den Effekt auf die Bouton-Zahl zu untersuchen. Zudem müßte eine elektrophysiologische Untersuchung der Neuro-Transmission sowie eine elektronenmikroskopische Analyse der Synapse (T-Balken, Transmitter-Vesikel, Größe der Synapsen) erfolgen.

Weiterhin wäre zu prüfen, ob auch ein überschießendes Neuritenwachstum im zentralen Nervensystem der Fliege vorliegt, was den Lern-Defekt erklären könnte. Eine parallele Hemmung des Synapsenwachstums im peripheren und zentralen Nervensystem wurde beim *Drosophila* Modell des fragilen X-Syndroms gezeigt, einer anderen Form der geistigen Behinderung (Pan 2004).

Auch im Mäuse-Gehirn könnte ein unreguliertes Neuriten-Wachstum zu Gedächtnisstörungen führen. Man könnte die Länge und Zahl der Verzweigungen von Neuriten im Hippocampus messen und zwischen RSK2-KO und WT vergleichen. Mittels eines Tier-MRTs könnte das Gehirn von RSK2-KO Mäusen morphologisch

untersucht werden. Vielleicht zeigen sich bei der Maus schon makroskopisch Veränderungen, welche bei CLS-Patienten sehr rar sind.

Bei PC12-Zellen sollte im WB untersucht werden, ob die ERK-Phosphorylierung durch die Anwesenheit der verschiedenen RSK2-Konstrukte in einer Weise beeinflusst wird, wie man es bei einer inhibitorischen Funktion von RSK2 erwarten würde.

Bei kultivierten Motoneuronen könnte ein Rettungs-Experiment durchgeführt werden, indem RSK2-KO Motoneurone mit WT-RSK2 Lentiviren infiziert werden, was zu einer Normalisierung des Axon-Länge führen sollte.

## **5. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit sollte die Funktion der Ribosomalen S6 Kinase 2 (RSK2) auf neuronaler Ebene untersucht werden. Dahingehend gab es, z.B. auf Grund der Phänotypen von Fliegen und Mäusen mit Mutationen im entsprechenden Gen oder von Patienten mit Coffin-Lowry-Syndrom (CLS) nur Vermutungen. Es bestand letztlich die Hoffnung, einen Beitrag zur Aufklärung der Pathophysiologie des CLS zu leisten. Es stellte sich auf Grund von Experimenten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in verschiedenen Modellsystemen in dieser Arbeit heraus, daß RSK2 einen negativen Einfluß auf das Neuriten- und Synapsenwachstum hat. In kultivierten Motoneuronen führte der KO von *RSK2* zu längeren Axonen und die Überexpression eines konstitutiv aktiven *RSK2*-Konstrukts zu kürzeren Axonen. In PC12-Zellen führte die Expression von konstitutiv aktiven RSK2 Konstrukten zur Verkürzung der Neuriten und die Expression eines Kinase-inaktiven RSK2 Konstrukts zu längeren Neuriten. *In vivo* war die neuromuskuläre Synapse bei RSK2-KO Mäusen vergrößert und hatte bei *Drosophila rsk* Mutanten mehr Boutons. Das RSK2-Protein ist in Motoneuronen der Maus und in überexprimierter Form in den Boutons der neuromuskulären Synapse bei *Drosophila* nachweisbar. Damit wurde zum ersten Mal die Funktion von RSK2 auf neuronaler Ebene beschrieben.

Bezüglich des Mechanismus, wie RSK2 das Nervenwachstum beeinflusst gab es deutliche Hinweise, die dafür sprechen, daß RSK2 dies über eine in der Literatur schon häufiger beschriebene Hemmung der MAPK ERK1/2 erreicht. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, daß die ERK-Phosphorylierung in murinen Motoneuronen und im Rückenmark embryonaler Mäuse der RSK2-Mutante erhöht ist und der Axonwachstumsdefekt durch eine Hemmung von MEK/ERK behoben werden kann. Auch ist die ERK-Phosphorylierung an der murinen Muskel-Endplatte in der Mutante erhöht. Zudem zeigen genetische Epistasis-Experimente in *Drosophila*, daß RSK die Bouton-Zahl über ERK/RL hemmt. RSK scheint also in *Drosophila* von der Funktion her der RSK2-Isoform in Wirbeltieren sehr ähnlich zu sein.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist die Beobachtung, daß RSK2 bei Motoneuronen keinen wesentlichen Einfluß auf das Überleben der Zellen in Gegenwart neurotropher Faktoren hat. Möglicherweise spielen hier redundante Funktionen der RSK Familienmitglieder eine Rolle. Ein bislang unerklärter Befund ist die reduzierte Frequenz spontaner Depolarisationen bzw. damit einhergehender  $Ca^{2+}$  Einströme bei RSK2-KO Motoneuronen in Zellkultur. Die Häufigkeit und Dichte von  $Ca^{2+}$ -Kanälen und aktive Zonen Proteinen war in Motoneuronen nicht von der Anwesenheit des RSK2-Proteins abhängig.

Im Hippocampus konnte außerdem das RSK2-Protein präsynaptisch in den Moosfaser-Boutons der CA3 Region nachgewiesen werden. Es befindet sich auch in den Pyramidenzellen, aber nicht in den Pyramidenzell-Dendriten in CA3. Bezüglich der Bedeutung dieser Befunde für die Aufklärung der Pathologie des CLS ist zu folgern, daß der neuro-psychologische Phänotyp bei CLS Patienten wahrscheinlich nicht durch reduziertes Überleben von Neuronen, sondern eher durch disinhibiertes Axonwachstum oder Synapsenwachstum bedingt ist. Dies kann grob sowohl für die peripheren als auch die zentralen Defekte gelten, denn die Synapsen im ZNS und am Muskel sind in ihrer molekularen Ausstattung z.B. im Bereich der Vesikel, der aktiven Zonen oder der Transmitterausschüttung sehr ähnlich. Weiterhin könnte eine veränderte synaptische Plastizität u.a. an der Moosfaser-Pyramidenzell-Synapse in der CA3 Region des Hippocampus eine Rolle bei den kognitiven und mnestischen Einschränkungen der Patienten spielen. Die Entdeckung, daß aktiviertes ERK bei

den beobachteten Effekten eine Rolle spielt kann für die Entwicklung von Therapiestrategien eine wertvolle Erkenntnis sein.

## **6. Summary**

In this thesis the function of the Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) on the neuronal level should be investigated. Due to the phenotypes of flies and mice with mutations in the respective gene or of Coffin-Lowry-Syndrome (CLS) patients there existed only rough speculations. An aim was to make a contribution to the elucidation of the pathophysiology of the CLS. In this thesis it could be shown by experiments *in vivo* as well as *in vitro* in different model systems, that RSK2 has a negative influence on neurite- and synapse growth. In cultivated motoneurons the KO of *RSK2* increased the length of axons and the overexpression of a constitutive active *RSK2*-construct reduced axon length. In PC12 cells expression of constitutive active *RSK2*-constructs reduced neurite-length and expression of a kinase-dead *RSK2*-construct increased neurite-length. *In vivo* the size of the neuromuscular synapse of RSK2-KO mice and the bouton number at the *Drosophila* neuromuscular junction was increased. The RSK2-Protein could be found in mouse motoneurons and, if overexpressed, in boutons at the *Drosophila* neuromuscular junction. These results show for the first time, which function RSK2 has on the neuronal level.

With respect to the mechanism, how RSK2 influences neurite growth, there was evidence, that RSK2 does this by inhibition of the MAPK ERK1/2. The latter has been described in literature before. Arguments for this are the findings, that ERK-phosphorylation in mouse motoneurons and in embryonal spinal cord of the RSK2 mouse mutant is increased and that the axon-growth defect can be rescued by inhibition of MEK/ERK. Besides this, ERK-phosphorylation at the neuromuscular endplate of RSK2-KO mice is increased. Moreover, genetic epistasis experiments in *Drosophila* show, that RSK inhibits bouton numbers via ERK/RL. So, *Drosophila* RSK seems to resemble, according to its function, the vertebrate RSK2-isoform.

A further important result is the observation, that RSK2 has no effect on survival of motoneurons in the presence of neurotrophic factors. Possibly redundant functions of RSK family members are responsible for this. A so far unexplained finding is the

reduced frequency of spontaneous depolarisations with concomitant  $\text{Ca}^{2+}$  Influx in cultured RSK2-KO Motoneurons. The amount and density of  $\text{Ca}^{2+}$  channels and active zone proteins was not dependent on the presence of the RSK2-Protein in motoneurons.

In the hippocampus the RSK2-Protein could be found presynaptically in mossy-fiber boutons in the CA3 region. Moreover, it is localized in pyramidal cells, but not in the pyramidal cell dendrites in the CA3 region. With respect to the impact of these findings on the understanding of the CLS pathology, it is, according to the results of this thesis, probably not caused by reduced survival of neurons, but by disinhibited axon and synapse growth. This may account roughly for peripheral as well as central defects, because synapses in the central nervous system and at the muscle are very similar with respect to the molecular organization for example of vesicles, the active zone or transmitter release. Furthermore, a change in synaptic plasticity for example at the mossy-fiber pyramidal cell synapse in the CA3 region of the hippocampus could lead to the cognitive and mnemonic deficits in CLS patients. The finding that activated ERK plays a role in the observed effects can guide the way for new therapeutic strategies.

## **7. Referenzen**

Akten B, Tangredi MM, Jauch E, Roberts MA, Ng F, Raabe T, Jackson FR. 2009. Ribosomal s6 kinase cooperates with casein kinase 2 to modulate the *Drosophila* circadian molecular oscillator. J Neurosci. 29:466-475.

Alcorta DA, Crews CM, Sweet LJ, Bankston L, Jones SW, Erikson RL. 1989. Sequence and expression of chicken and mouse rsk: homologs of *Xenopus laevis* ribosomal S6 kinase. Mol Cell Biol. 9:3850-3859.

Alessi, DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr. Biol. 7:261-269.

Amaral DG. 1993. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. Curr Opin Neurobiol. 3:225-229.

Angenstein F, Greenough WT, Weiler IJ. 1998. Metabotropic glutamate receptor-initiated translocation of protein kinase p90rsk to polyribosomes: a possible factor regulating synaptic protein synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:15078-15083.

Anjum R, Blenis J. 2008. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 9:747-758.

Anjum R, Roux PP, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. 2005. The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. Curr Biol. 15:1762-1767.

Antion MD, Merhav M, Hoeffler CA, Reis G, Kozma SC, Thomas G, Schuman EM, Rosenblum K, Klann E. 2008. Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. Learn Mem. 15:29-38.

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. 1998. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. Nat Neurosci 1:602-609.

Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ, Avruch J. 1990. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 87:8550-8554.

Banno Y, Nemoto S, Murakami M, Kimura M, Ueno Y, Ohguchi K, Hara A, Okano Y, Kitade Y, Onozuka M, Murate T, Nozawa Y. 2008. Depolarization-induced differentiation of PC12 cells is mediated by phospholipase D2 through the transcription factor CREB pathway. J. Neurochem. 104, 1372-1386.

Becker E, Soler RM, Yuste VJ, Giné E, Sanz-Rodríguez C, Egea J, Martín-Zanca D, Comella JX. 1998. Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. J Neurosci. 18:7903-7911.

Bender FL, Fischer M, Funk N, Orel N, Rethwilm A, Sendtner M. 2007. High-efficiency gene transfer into cultured embryonic motoneurons using recombinant lentiviruses. Histochem Cell Biol. 127:439-448.

Bertolucci F. 2008. Operant and classical learning in *Drosophila melanogaster*: the *ignorant* gene (*ign*). Dissertation. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Bignone PA, Lee KY, Liu Y, Emilion G, Finch J, Soosay AE, Charnock FM, Beck S, Dunham I, Mungall AJ, Ganesan TS. 2007. RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. Oncogene. 26:683-700.

Blenis J. 1993. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. Proc Natl Acad Sci USA 90:5889-5892.

Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. Science 286:1358-1362.

Brand AH, Perrimon N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.

Bramham CR, Messaoudi E. 2005. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 76:99-125.

Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. 1996. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *J Neurol Sci.* 136:17-23.

Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH, Zipursky SL, Hafen E. 1994. A gain-of-function mutation in the *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76:875-888.

Butcher G, Lee B, Cheng HM, Obrietan K. Neuroscience meeting 2006. Differential function of the mitogen activated protein kinase (MAPK) targets MSK and RSK contribute to photic entrainment. 156.17/U3

Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. 1992. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol.* 12:915-927.

Cheung US, Shayan AJ, Boulianne GL, Atwood HL. 1999. *Drosophila* larval neuromuscular junction's responses to reduction of cAMP in the nervous system. *J Neurobiol.* 1999 Jul;40(1):1-13.

Cho YY, He Z, Zhang Y, Choi HS, Zhu F, Choi BY, Kang BS, Ma WY, Bode AM, Dong Z. 2005. The p53 protein is a novel substrate of ribosomal S6 kinase 2 and a critical intermediary for ribosomal S6 kinase 2 and histone H3 interaction. *Cancer Res.* 65:3596-3603.

Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF JR, Weber MJ, Lannigan DA. 2005. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. *Cancer Res.* 65:3108-3116.

Clark CJ, McDade DM, O'Shaughnessy CT, Morris BJ. 2007. Contrasting roles of neuronal Msk1 and Rsk2 in Bad phosphorylation and feedback regulation of Erk signalling. *J Neurochem.* 102:1024-1034.

Coffin GS, Siris E, Wegenkia LC. 1966. Mental retardation with osteocartilaginous anomalies. *Am J Dis Child* 112:205-213.

Cohen P, Frame S. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:769-776.

Cohen MS, Zhang C, Shokat KM, Taunton J. 2005. Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science* 308:1318-1321.

Coffin GS. 2003. Postmortem findings in the Coffin-Lowry Syndrome. *Genet Med* 5: 187-193.

Collacott RA, Warrington JS, Young ID. 1987. Coffin-Lowry syndrome and schizophrenia: a family report. *J Ment Defic Res.* 31:199-207.

Collins CA, DiAntonio A. 2007. Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol.* 17:35-42.

Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Wiegand SJ, Rudge JS, Scharfman HE. 1999. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93:1491-1506.

Dalby KN, Morrice N, Caudewell FB, Avruch J, Cohen P. 1998. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 273:1496-1505.

David JP, Mehic D, Bakiri L, Schilling AF, Mandic V, Priemel M, Idarraga MH, Reschke MO, Hoffmann O, Amling M, Wagner EF. 2005. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J Clin Invest.* 115:664-672.

Davis GW, Schuster CM, Goodman CS. 1996. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* 17:669-679.

Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17:4426-4441.

Doehn U, Gammeltoft S, Shen SH, Jensen CJ. 2004. p90 ribosomal S6 kinase 2 is associated with and dephosphorylated by protein phosphatase 2Cdelta. *Biochem J* 382:425-431.

Douville E, Downward J. 1997. EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 Rsk-2. *Oncogene* 15:373-383.

Dufresne SD, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Zhao Y, Aschenbach WG, Moller DE, Goodyear LJ. 2001. Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. *Mol Cell Biol* 21:81-87.

Dumont J, Umbhauer M, Rassinier P, Hanauer A, Verlhac MH. 2005. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol* 169:227-231.

Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR. 2003. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269.

Eldar-Finkelman H, Seger R, Vandenheede JR, Krebs EG. 1995. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-

activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *J Biol Chem.* 270:987-990.

Erikson E, Maller JL. 1985. A protein kinase from *Xenopus* eggs specific for ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:742-746.

Feng J, Chi P, Blanpied TA, Xu Y, Magarinos AM, Ferreira A, Takahashi RH, Kao HT, McEwen BS, Ryan TA, Augustine GJ, Greengard P. 2002. Regulation of neurotransmitter release by synapsin III. *J Neurosci* 22:4372-4380.

Fischer M, Raabe T, Heisenberg M, Sendtner M. 2009(a). *Drosophila* RSK negatively regulates Bouton Number at the Neuromuscular Junction. *Dev. Neurobiol.* 69:212-220.

Fischer M, Pereira PM, Holtmann B, Simon CM, Hanauer A, Heisenberg M, Sendtner M. 2009(b). P90 Ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons. *Mol Cell Neurosci* 42:134-141.

Frödin M, Gammeltoft S. 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151:65-77.

Frödin M, Jensen CJ, Merienne K, Gammeltoft S. 2000. A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *EMBO J* 19: 2924-2934.

Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME. 1994. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77:713-725.

Godenschwege TA, Reisch D, Diegelmann S, Eberle K, Funk N, Heisenberg M, Hoppe V, Hoppe J, Klagges BR, Martin JR, Nikitina EA, Putz G, Reifegerste R, Reisch N, Rister J, Schaupp M, Scholz H, Schwärzel M, Werner U, Zars TD, Buchner S, Buchner E. 2004. Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. *Eur J Neurosci* 20:611-622.

Goold RG, Gordon-Weeks PR. 2005. The MAP kinase pathway is upstream of the activation of GSK3beta that enables it to phosphorylate MAP1B and contributes to the stimulation of axon growth. *Mol Cell Neurosci* 28:524-534.

Greene LA, Tischler AS. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424-2428.

Grove JR, Price DJ, Banerjee P, Balasubramanyam A, Ahmad MF, Avruch J. 1993. Regulation of an epitope-tagged recombinant Rsk-1 S6 kinase by phorbol ester and erk/MAP kinase. *Biochemistry* 32:7727-7738.

Guimiot F, Delezoide AL, Hanauer A, Simonneau M. 2004. Expression of the RSK2 gene during early human development. *Gene Expr Patterns* 4:111-114.

Guo A, Li L, Xia SZ, Feng CH, Wolf R, Heisenberg M. 1996. Conditioned visual flight orientation in *Drosophila*: dependence on age, practice, and diet. *Learn Mem* 3:49-59.

Hanauer A, Young ID. 2002. Coffin-Lowry syndrome: clinical and molecular features. *J Med Genet.* 39:705-713.

Harum KH, Alemi L, Johnston MV. 2001. Cognitive impairment in Coffin-Lowry syndrome correlates with reduced RSK2 activation. *Neurology* 56:207-214.

Hauge C, Frodin M. 2006. RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* 119:3021-3023.

Hsiao KM, Chou SY, Shih SJ, Ferrell JE Jr. 1994. Evidence that inactive p42 mitogen-activated protein kinase and inactive Rsk exist as a heterodimer *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5480-5484.

Holtmann B, Wiese S, Samsam M, Grohmann K, Pennica D, Martini R, Sendtner M. 2005. Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles

of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci* 25:1778-1787.

Hunter AG. 2002. Coffin-Lowry syndrome: a 20-year follow-up and review of long-term outcomes. *Am J Med Genet* 111:345-355.

Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M. 2007. Defective Ca<sup>2+</sup> channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 179:139-149.

Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, Greengard P. 1985. A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4137-4141.

Jármay G, Heinkelein M, Weissbrich B, Jassoy C, Rethwilm A. 2001. Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J Med Virol* 64:223-231.

Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* 16:3693-3704.

Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. 1982. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 6:3031-3038.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. 2000. Principles of neural science. McGraw-Hill companies, Inc.

Kim M, Lee JH, Koh H, Lee SY, Jang C, Chung CJ, Sung JH, Blenis J, Chung J. 2006. Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during *Drosophila* development. *EMBO J* 25:3056-3067.

Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ. 2006.

Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca<sup>2+</sup> channel clustering, and vesicle release. *Science* 312:1051-1054.

Klemenz R, Weber U, Gehring WJ. 1987. The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 15:3947-3959.

Koh YH, Gramates LS, Budnik V. 2000. *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microsc Res Tech* 49:14-25.

Koh YH, Ruiz-Canada C, Gorczyca M, Budnik V. The Ras1-mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway regulates synaptic plasticity through fasciclin II-mediated cell adhesion. 2002. *J Neurosci* 22:2496-2504.

Kohn M, Hameister H, Vogel M, Kehrer-Sawatzki H. 2003. Expression pattern of the Rsk2, Rsk4 and Pdk1 genes during murine embryogenesis. *Gene Expr Patterns* 3:173-177.

Kyhse-Andersen J. 1984. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203-209.

Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856-8860.

Lee E, Son H. 2009. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep* 42:239-244.

Levi-Montalcini R, Meyer H, Hamburger V. 1954. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia the chick embryo. *Cancer Res* 14:49-57.

Li X, Zhong J, Wu Y, Wang Y, Snider WD. 2005. RSK3 regulates NGF-induced axon growth downstream of Raf kinases. Program No. 710.9. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.

Liu RY, Snider WD. 2001. Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *J Neurosci* 21:RC164.

Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD. 2002. Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking CREB. *Neuron* 34:371-385.

Lowry B, Miller JR, Fraser FC. 1971. A new dominant gene mental retardation syndrome. *Am J Child Dis* 121:496-500.

Lu Y, Christian K, Lu B. 2008. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 89:312-323.

Magariños AM, Verdugo JM, McEwen BS. 1997. Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14002-14008.

Malakhova M, Tereshko V, Lee SY, Yao K, Cho YY, Bode A, Dong Z. 2008. Structural basis for activation of the autoinhibitory C-terminal kinase domain of p90 Rsk2. *Nat Struct Mol Biol* 15:112-113.

Markus A, Patel TD, Snider WD. 2002. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12:523-531.

Markus A, Zhong J, Snider WD. 2002. Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35:65-76.

Marqués G. 2005. Morphogens and synaptogenesis in *Drosophila*. *J Neurobiol*. 64:417-434.

Marques Pereira P, Gruss M, Braun K, Foos N, Pannetier S, Hanauer A. 2008. Dopaminergic system dysregulation in the *mrsk2\_KO* mouse, an animal model of the Coffin-Lowry syndrome. *J Neurochem* 107:1325-1334.

Mastrogiacomo A, Parsons SM, Zampighi GA, Jenden DJ, Umbach JA, Gundersen CB. 1994. Cysteine string proteins: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 263:981-982.

Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H. 1993. Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365:27-32.

Myers AP, Corson LB, Rossant J, Baker JC. 2004. Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling. *Mol Cell Biol* 24:4255-4266.

Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R. 2008. Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453:1244-1247.

Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS. 2004. A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432:580-587.

Pan L, Zhang YQ, Woodruff E, Broadie K. 2004. The *Drosophila* fragile X gene negatively regulates neuronal elaboration and synaptic differentiation. *Curr Biol* 14:1863-1870.

Pietschmann T, Heinkelein M, Heldmann M, Zentgraf H, Rethwilm A, Lindemann D. 1999. Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* 73:2613-2621.

Poirier R, Jacquot S, Vaillend C, Southiphong AA, Libbey M, Davis S, Laroche S, Hanauer A, Welzl H, Lipp HP, Wolfer DP. 2007. Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene Rsk2 in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behav Genet* 37:31-50.

Poo MM. 2001. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.

Porter BE, Weis J, Sanes JR. 1995. A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron* 14:549-559.

Poteet-Smith CE, Smith JA, Lannigan DA, Freed TA, Sturgill TW. 1999. Generation of constitutively active p90 ribosomal S6 kinase in vivo. Implications for the mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 274:22135-22138.

Proud CG. 2005. eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16:3-12.

Putz G, Bertolucci F, Raabe T, Zars T, Heisenberg M. 2004. The S6KII (rsk) gene of *Drosophila melanogaster* differentially affects an operant and a classical learning task. *J Neurosci* 24:9745-9751.

Rakhit S, Clark CJ, O'shaughnessy CT, Morris BJ. 2005. N-methyl-D-aspartate and brain-derived neurotrophic factor induce distinct profiles of extracellular signal-regulated kinase, mitogen- and stress-activated kinase, and ribosomal s6 kinase phosphorylation in cortical neurons. *Mol Pharmacol* 67:1158-1165.

Ranganathan A, Pearson GW, Chrestensen CA, Sturgill TW, Cobb MH. 2006. The Map kinase Erk5 binds to and phosphorylates p90 RSK. *Arch Biochem Biophys* 449:8-16.

Reichmuth C, Becker S, Benz M, Debel K, Reisch D, Heimbeck G, Hofbauer A, Klagges B, Pflugfelder GO, Buchner E. 1995. The sap47 gene of *Drosophila melanogaster* codes for a novel conserved neuronal protein associated with synaptic terminals. *Brain Res Mol Brain Res* 32:45-54.

Rintelen F, Stocker H, Thomas G, Hafen E. 2001. PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15020-15025.

Ronce N, Raynaud M, Toutain A, Moizard MP, Colleaux L, Gendrot C, Briault S, Moraine C. 1999. Evidence for a new X-linked mental retardation gene in Xp21-Xp22: clinical and molecular data in one family. *Am J Med Genet* 83:132-138.

Roos J, Hummel T, Ng N, Klambt C, Davis GW. 2000. *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26:371-382.

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. 2003. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163:801-812.

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13489-13494.

Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, Sonenberg N, Blenis J. 2007. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* 282:14056-14064.

Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

Sananbenesi F, Fischer A, Schrick C, Spiess J, Radulovic J. 2002. Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Mol Cell Neurosci* 21:463-476.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.

Sapkota GP, Cummings L, Newell FS, Armstrong C, Bain J, Frodin M, Grauert M, Hoffmann M, Schnapp G, Steegmaier M, Cohen P, Alessi DR. 2007. BI-D1870 is a

specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochem J* 401:29-38.

Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD. 1999. Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science* 285:886-891.

Schmid RS, Graff RD, Schaller MD, Chen S, Schachner M, Hemperly JJ, Maness PF. 1999. NCAM stimulates the Ras-MapK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol* 38:542-558.

Schnaar RI, Schaffner AE. 1981. Separation of cell types from embryonic chicken and rat spinal cord: characterization of motoneuron-enriched fractions. *J Neurosci* 1:204-217.

Scimeca JC, Nguyen TT, Filloux C, Van Obberghen E. 1992. Nerve growth factor-induced phosphorylation cascade in PC12 pheochromocytoma cells. Association of S6 kinase II with the microtubule-associated protein kinase, ERK1. *J Biol Chem* 267:17369-17374.

Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Escary JL, Masu Y, Carroll P, Wolf E, Brem G, Brület P, Thoenen H. 1996. Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol Jun* 6:686-694.

Sendtner M. 1998. Neurotrophic factors: effects in modulating properties of the neuromuscular endplate. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:1-7.

Sendtner M, Pei G, Beck M, Schweizer U, Wiese S. 2000. Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors. *Cell Tissue Res* 301:71-84.

Shayan AJ, Atwood HL. 2000. Synaptic ultrastructure in nerve terminals of *Drosophila* larvae overexpressing the learning gene *dunce*. *J Neurobiol* 43:89-97.

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JW, Blenis J, Pende M, Sonenberg N. 2006. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J* 25:2781-2791.

Sheffler DJ, Kroeze WK, Garcia BG, Deutch AY, Hufeisen SJ, Leahy P, Brüning JC, Roth BL. 2006. p90 ribosomal S6 kinase 2 exerts a tonic brake on G protein-coupled receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4717-4722.

Sigrist SJ, Reiff DF, Thiel PR, Steinert JR, Schuster CM. 2003. Experience-dependent strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* 23:6546-6556.

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. 1998. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127-148.

Silverman E, Frödin M, Gammeltoft S, Maller JL. 2004. Activation of p90 Rsk1 is sufficient for differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 24:10573-10583.

Simensen RJ, Abidi F, Collins JS, Schwartz CE, Stevenson RE. 2002. Cognitive function in Coffin-Lowry syndrome. *Clin Genet* 61:299-304.

Sivagamasundari U, Fernando H, Jardine P, Rao JM, Lunt P, Jayewardene SL. 1994. The association between Coffin-Lowry syndrome and psychosis: a family study. *J Intellect Disabil Res* 38:469-473.

Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. 2005. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer Res* 65:1027-1034.

Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC, Arthur JS. 2003. MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J* 22:2788-2797.

Spitzer NC, Kingston PA, Manning TJ, Conklin MW. 2002. Outside and in: development of neuronal excitability. *Curr Opin Neurobiol* 12:315-323.

Strachan RT, Sheffler DJ, Willard B, Kinter M, Kiselar JG, Roth BL. 2008. Ribosomal S6 kinase 2 directly phosphorylates the 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor thereby modulating 5-HT<sub>2A</sub> signaling. *J Biol Chem* 284:5557-5573.

Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 296:15-19.

Temtamy SA, Miller JD, Dorst JP, Hussels-Maumenee I, Salinas C, Lacassie Y, Kenyon KR. 1975. The Coffin-Lowry syndrome: a simply inherited trait comprising mental retardation, faciodigital anomalies and skeletal involvement. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11:133-152.

Thomas GM, Rumbaugh GR, Harrar DB, Hagan RL. 2005. Ribosomal S6 kinase 2 interacts with and phosphorylates PDZ domain-containing proteins and regulates AMPA receptor transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15006-15011.

Touraine RL, Zeniou M, Hanauer A. 2002. A syndromic form of X-linked mental retardation: the Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Pediatr* 161:179-187.

Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. 1996. Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384:567-570.

Vine DT, Gold JT, Grant AD. 1986. Etiology of the weakness in Coffin-Lowry syndrome. *Am J Hum Genet* 39:A85.

von Manteuffel SR, Dennis PB, Pullen N, Gingras AC, Sonenberg N, Thomas G. 1997. The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point immediately upstream of p70s6k. *Mol Cell Biol* 17:5426-5436.

Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E. 2006. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49:833-844.

Wassarman DA, Solomon NM, Rubin GM. 1994. The *Drosophila melanogaster* ribosomal S6 kinase II-encoding sequence. *Gene* 144:309-310.

Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA. 1992. Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9:1099-1115.

Wiese S, Metzger F, Holtmann B, Sendtner M. 1999. The role of p75<sup>NTR</sup> in modulating neurotrophin survival effects in developing motoneurons. *Eur J Neurosci* 11:1668-1676.

Wiese S, Pei G, Karch C, Troppmair J, Holtmann B, Rapp UR, Sendtner M. 2001. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat Neurosci* 4:137-142.

Wong EV, Schaefer AW, Landreth G, Lemmon V. 1996. Involvement of p90<sup>rsk</sup> in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 271:18217-18223.

Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. 1996. Coupling of the RAS-MapK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963.

Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME. 1998. Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18:1946-1955.

Yang X, Matsuda K, Bialek P, Jacquot S, Masuoka HC, Schinke T, Li L, Brancorsini S, Sassone-Corsi P, Townes TM, Hanauer A, Karsenty G. 2004. ATF4 is a substrate

of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell* 117:387-398.

Yeh E, Gustafson K, Boulianne GL. 1995. Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7036-7040.

Yntema HG, van den Helm B, Kissling J, van Duijnhoven G, Poppelaars F, Chelly J, Moraine C, Fryns JP, Hamel BC, Heilbronner H, Pander HJ, Brunner HG, Ropers HH, Cremers FP, van Bokhoven H. 1999. A novel ribosomal S6-kinase (RSK4; RPS6KA6) is commonly deleted in patients with complex X-linked mental retardation. *Genomics* 62:332-343.

Zalutsky RA, Nicoll RA. 1990. Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248:1619-1624.

Zaru R, Ronkina N, Gaestel M, Arthur JS, Watts C. 2007. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nat Immunol* 8:1227-1235.

Zeniou M, Ding T, Trivier E, Hanauer A. 2002. Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. *Hum Mol Genet* 11:2929-2940.

Zeniou-Meyer M, Liu Y, Béglé A, Olanish M, Hanauer A, Becherer U, Rettig J, Bader MF, Vitale N. 2008. The Coffin-Lowry syndrome-associated protein Rsk2 is implicated in calcium-regulated exocytosis through the regulation of PLD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8434-8439.

Zhao Y, Bjørbaek C, Weremowicz S, Morton CC, Moller DE. 1995. RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. *Mol Cell Biol* 15:4353-4363.

Zhong J, Li X, McNamee C, Chen AP, Baccarini M, Snider WD. 2007. Raf kinase signaling functions in sensory neuron differentiation and axon growth in vivo. *Nat Neurosci* 10:598-607.

Zhong Y, Budnik V, Wu CF. 1992. Synaptic plasticity in *Drosophila* memory and hyperexcitable mutants: role of cAMP cascade. *J Neurosci* 12:644-651.

Zhou, FQ, Snider WD. 2005. Cell biology. Gsk-3beta and microtubule assembly in axons. *Science* 308:211-214.

## **8. Anhang**

### **Abkürzungsverzeichnis**

Ak	Antikörper
BAD	bcl2 associated death protein
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CaMK1	Calcium/Calmodulin abhängige Protein Kinase 1
cAMP	cyclic andenosin monophosphate
cDNA	copy DNA
CLS	Coffin-Lowry-Syndrom
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DAPK	Death-associated protein kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FCS	Fetal calf serum
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEK	Human embryonic kidney cells
5-HT	5-Hydroxytryptamin
kb	Kilo-Basen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
kDa	Kilo-Dalton
KO	Knockout
LTP	Long-term potentiation
M	Molar
MAP1b	Mikrotubulus assoziiertes Protein 1b
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

mEPSC	miniature evoked postsynaptic current
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
NB	Neurobasal
NGS	Normales Pferdeserum
NGF	Nerve growth factor
NFκB	Nuclear factor κB
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
ns	nicht signifikant
p.A.	pro Analysis
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline + Triton X
PC12	Phäochromozytomzellen 12
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PDK1	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1
PDZ	[postsynaptic density fraction (PSD)95/discs large/ZO-1]
PI3K	(phosphatidylinositol 3-kinase)
PORN	Poly-D,L-Ornithin
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacryl-Amid-Gel-Electrophorese
SEM	Standard error of the mean
SOS	son of sevenless
SRF	Serum response factor
Taq	Thermophilus aquaticus
TEMED	N-N-N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
WB	Western blot

Wt	Wildtyp
Y	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Der Einfluß der Ribosomale S6 Kinase 2 (RSK2) auf das Neuriten- und Synapsenwachstum *in vivo* und in Zellkultur“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, daß diese Dissertation weder in gleicher Weise noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre zudem, vom Fachbereich Humanmedizin der Julius-Maximilians-Universität Würzburg den Grad eines Doktors der Medizin (Dr. med.) verliehen bekommen zu haben.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 01.02.2010



## **Danksagung**

Ich bedanke mich insbesondere bei den Betreuern der Doktorarbeit, Prof. M. Heisenberg und Prof. M. Sendtner. Mein Dank gilt außerdem dem IZKF der Universität Würzburg, allen voran Prof. Walter und Prof. Rethwilm.

Ich danke für die Bereitstellung der RSK2-KO Maus-Linie durch A. Hanauer und der RSK2-Plasmide durch Jeffrey A. Smith.

Ich bedanke mich außerdem bei zahlreichen Kollegen für wertvolle Hinweise, Diskussionen und Unterstützung: Bei Stefan Wiese, Sibylle Jablonka, Natalia Funk, Nadja Orel, Stefan Sigrist, Manfred Heckmann, Christian Porsche, Florian Bender, Christian Simon, Vanessa Nieratschker, Dan Bucher, Erich Buchner, Bettina Holtmann, Katrin Kübert, Dirk Pühringer, Thomas Herrmann, Catia Andreassi, Helga Brunner, Wilfried Rossoll.

## Publikationen

Zars T, Fischer M, Schulz R, Heisenberg M. 2000. Localization of a short-term memory in Drosophila. Science. 288:672-675.

Bender FL, Fischer M, Funk N, Orel N, Rethwilm A, Sendtner M. 2007. High-efficiency gene transfer into cultured embryonic motoneurons using recombinant lentiviruses. Histochem Cell Biol. 127:439-448.

Fischer M, Kress W, Reiners K, Rieckmann P. 2007. Orthostatic tremor in three brothers. J Neurol. 254:1759-1760.

Fischer M, Raabe T, Heisenberg M, Sendtner M. 2009. Drosophila RSK negatively regulates bouton number at the neuromuscular junction. Dev Neurobiol. 69:212-220.

Fischer M, Pereira PM, Holtmann B, Simon CM, Hanauer A, Heisenberg M, Sendtner M. 2009. P90 Ribosomal s6 kinase 2 negatively regulates axon growth in motoneurons. Mol Cell Neurosci. 42:134-141.