

Charakterisierung der Rolle des β -Aktin mRNA bindenden
Proteins *heterogenous nuclear ribonucleoprotein-R* für das
Axonenwachstum von Motoneuronen

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

vorgelegt von
Michael Glinka
geboren in Ansbach

Würzburg, Januar 2011

Eingereicht am:

1. Februar 2011

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Erstgutachter : Prof. Dr. Michael Sendtner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

30. Juni 2011

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1.1. Zusammenfassung | 9 |
| 2.2. Summary | 11 |
| 3.3. Einleitung | 13 |
| 3.13.1 Motoneuronerkrankungen | 13 |
| 3.1.1 Amyotrophe Lateralsklerose | 13 |
| 3.1.2 Spinale Muskelatrophien | 15 |
| 3.2 Ribonukleoproteine | 22 |
| 3.3 Heterogenous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP-R) | 24 |
| 3.4 Insuline-like growth factor II mRNA-binding proteins | 25 |
| 3.5 Zielsetzung der Arbeit | 27 |
| 4. Material und Methoden | 28 |
| 4.1 Material | 28 |
| 4.1.1 Bakterienstämme | 28 |
| 4.1.2 Versuchstiere | 28 |
| 4.1.3 Vektoren | 28 |
| 4.1.4 Oligonukleotide | 28 |
| 4.1.5 Medien und Platten | 31 |
| 4.1.6 Chemikalien und Enzyme | 32 |
| 4.1.7 Puffer und Lösungen | 32 |
| 4.1.7.1 Puffer für Alkalische Plasmid-DNA-Minipräparation | 32 |
| 4.1.7.2 Puffer für das QIAfilter Plasmid Maxi Kit Protocol | 32 |
| 4.1.7.3 Puffer und Lösungen für Southern Blots | 33 |
| 4.1.7.4 Lösungen und Medien für die Präparation primärer Maus Neurone | 34 |
| 4.1.7.5 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blots | 35 |
| 4.1.7.6 Lösungen für die Immunhistochemie von Zebrafisch Embryonen | 37 |
| 4.1.7.7 Lösungen für die whole mount <i>in-situ</i> Hybridisierung von Zebrafisch Embryonen | 38 |

| | |
|---|----|
| 4.1.7.8 Sonstige Lösungen und Puffer | 39 |
| 4.1.8 Antikörper und Detektionssysteme | 41 |
| 4.1.9 Kits | 42 |
| 4.1.10 Software | 43 |
| 4.1.11 Geräte | 43 |
| 4.2 Methoden | 44 |
| 4.2.1 Mikrobiologie | 44 |
| 4.2.1.1 Bakterienplattenkulturen | 44 |
| 4.2.1.2 Bakterienflüssigkulturen | 44 |
| 4.2.1.3 Herstellung eines hnRNP-R Knockout Konstruktes | 44 |
| 4.2.2 Molekularbiologische Methoden | 47 |
| 4.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien | 47 |
| 4.2.2.1.1 Alkalische Plasmid-DNA-Minipräparation | 47 |
| 4.2.2.1.2 Minipräparation nach dem NucleoSpin Standard Protokoll (Macherey-Nagel) | 48 |
| 4.2.2.1.3 QIAfilter Plasmid Maxi Kit Protocol (Qiagen) | 48 |
| 4.2.2.1.4 Plasmidreinigung im Cäsium-Chlorid Gradienten (BAC) | 49 |
| 4.2.2.2 DNA Präzipitation | 50 |
| 4.2.2.3 Chloroform-Phenol Extraktion | 51 |
| 4.2.2.4 RNA Präparation nach dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) | 51 |
| 4.2.2.5 RNA Präparation nach dem PicoPure RNA isolation Kit (Arcturus) | 51 |
| 4.2.2.6 Konzentrationsbestimmungen von DNA im Agarosegel | 52 |
| 4.2.2.7 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren am Spektralphotometer | 53 |
| 4.2.2.8 Southern Blot und Hybridisierung | 53 |
| 4.2.2.9 Elektrophorese | 56 |
| 4.2.2.9.1 Agarose-Gelelektrophorese | 56 |
| 4.2.2.9.2 Puls-Feld-Gelelektrophorese | 57 |
| 4.2.2.10 QIAquick Gel Extraction Protokoll (Qiagen) | 58 |
| 4.2.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR) | 58 |
| 4.2.2.11.1 Linker-PCR | 60 |
| 4.2.2.11.2 Touchdown-PCR | 60 |
| 4.2.2.11.3 SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen) | 61 |

| | | |
|------------|--|----|
| 4.2.2.11.4 | Quantitative Echtzeit-PCR im LightCycler | 62 |
| 4.2.2.11.5 | Sequenzierung | 63 |
| 4.2.2.12 | DyeEx 2.0 Spin Protocol for Dye-Terminator Removal (Qiagen) | 64 |
| 4.2.2.13 | QIAquick PCR Purification Protocol (Qiagen) | 64 |
| | | |
| 4.2.3 | Proteinchemische Methoden | 64 |
| 4.2.3.1 | SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese) | 64 |
| 4.2.3.2 | Western Blot | 65 |
| 4.2.3.3 | ECL-Nachweis (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>) | 66 |
| | | |
| 4.2.4 | Methoden in der Zellkultur | 67 |
| 4.2.4.1 | Polyornithin-Beschichtung | 67 |
| 4.2.4.2 | Primäre Motoneuronkulturen | 67 |
| 4.2.4.3 | Kulturen primärer Neuronen aus den Dorsalen Wurzelganglien | 69 |
| 4.2.4.4 | Kompartimentierte Kulturen primärer Neurone (Xona) | 69 |
| 4.2.4.5 | Virale Infektion von Zellen | 71 |
| 4.2.4.6 | Paraformaldehyd Fixierung von kultivierten Zellen | 71 |
| 4.2.4.7 | HOPE Fixierung | 72 |
| 4.2.4.8 | Immundetektion | 72 |
| 4.2.4.9 | Zellkernfärbung mit DAPI | 72 |
| 4.2.4.10 | Zellkernfärbung lebender Zellen mit Hoechst 33342 | 73 |
| | | |
| 4.2.5 | Zebrafisch Methoden | 73 |
| 4.2.5.1 | Immunhistochemie von Zebrafisch Embryonen | 73 |
| 4.2.5.2 | Fluoreszenz Immunhistochemie von Zebrafisch Embryonen | 74 |
| 4.2.5.3 | Whole mount <i>in-situ</i> Hybridisierung von Zebrafisch Embryonen | 74 |
| 4.2.5.4 | Eindecken von Zebrafisch Embryonen für die Mikroskopie | 76 |
| 4.2.5.5 | Längenmessung von Axonen embryonaler Zebrafisch Motoneuronen | 76 |
| | | |
| 4.2.6 | Mikroskopie | 77 |

| | |
|---|-----|
| 5. Ergebnisse | 79 |
| 5.1 HnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen | 79 |
| 5.1.1 Primäre Motoneurone in der embryonalen Entwicklung des Zebrafisches | 79 |
| 5.1.2 Identifizierung und Charakterisierung der <i>Danio rerio</i> hnRNP-R cDNA | 80 |
| 5.1.3 Sequenzierung der Zebrafisch hnRNP-R cDNA | 82 |
| 5.1.4 HnRNP-R Morpholino Injektionen in Zebrafisch Embryonen | 83 |
| 5.1.5 Charakterisierung eines murinen hnRNP-R Antiserums für Versuche mit Zebrafisch Homogenaten | 86 |
| 5.1.6 Western Blot Analysen von hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Homogenaten | 88 |
| 5.1.7 HnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen führt zu einem Morpholino-Dosisabhängigen axonalen Phänotyp | 89 |
| 5.1.8 hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen führt nicht zum Verlust primärer Motoneurone | 93 |
| 5.1.9 Andere neuronale Zelltypen sind durch hnRNP-R Knockdown nicht beeinträchtigt | 95 |
| 5.1.10 Murine hnRNP-R mRNA kann den durch hnRNP-R Knockdown verursachten axonalen Phänotyp von Zebrafisch Embryonen weitestgehend aufheben | 98 |
| 5.2 Herstellung eines hnRNP-R Knockout Konstruktes durch Rekombination in <i>E. coli</i> | 100 |
| 5.2.1 Gerichtete <i>in vivo</i> Modifizierung eines hnRNP-R BAC Klons durch λ - vermittelte homologe Rekombination | 100 |
| 5.2.2 Southern Blot Charakterisierung von Δ hnRNP-R BAC Klonen | 103 |
| 5.2.3 Southern Blot Charakterisierung von elektroporierten Stammzellklonen | 104 |
| 5.3 Präparation axonaler RNA von Kulturen primärer Maus Motoneuronen | 106 |
| 5.3.1 Primäre Maus Motoneuron Kulturen auf PEN Membranen für die Laser Mikrodissektion (LMD) von Wachstumskegeln | 106 |
| 5.3.2 Kultivierung von primären Maus Motoneuronen Deckgläschen für die Laser Mikrodissektion von Wachstumskegeln | 108 |
| 5.4 Kompartimentierte Kulturen von Neuronen | 110 |
| 5.4.1 Kompartimentierte Kulturen von Neuronen dorsaler Wurzelganglien | 111 |
| 5.4.2 Kompartimentierte Kulturen primärer embryonaler Maus Motoneuronen | 114 |
| 5.4.3 Axonale RNA Präparationen von kompartimentierten Maus Motoneuron Kulturen | 118 |

| | |
|---|------------|
| 5.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR Analysen von RNA Präparationen | 121 |
| Kompartimentierter primärer Motoneuron Kulturen | |
| 6. Diskussion | 125 |
| 6.1 HnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen | 125 |
| 6.1.1 hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen führt zu einem | |
| Morpholino-Dosis abhängigen axonalen Phänotyp | 126 |
| 6.1.2 Der beobachtete axonale Phänotyp nach hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch | |
| Embryonen ist Motoneuron spezifisch | 127 |
| 6.1.3 Nukleäre Funktionen von hnRNP-R könnten zu dem beobachteten | |
| axonalen Phänotyp Beitragen | 128 |
| 6.1.4 hnRNP-R könnte an der Kontrolle der Translation der | |
| β-Aktin mRNA beteiligt sein | 128 |
| 6.1.5 Die Rolle anderer Mitglieder der hnRNP-Familie bei dendritischen Transport | |
| und der subzellularen Sortierung von mRNAs | 129 |
| 6.1.6 hnRNP-R ist wahrscheinlich am axonalen Transport von mRNAs beteiligt | 130 |
| 6.1.7 <i>In vivo</i> Untersuchungen von Proteinen der hnRNP-Proteinfamilie | 131 |
| 6.2 Laser-Mikrodissektion von Wachstumskegeln primärer Motoneurone zur | |
| Isolierung axonaler RNA | 132 |
| 6.3 Kompartimentierte Kulturen primärer Motoneurone zur Isolierung axonaler RNA | 133 |
| 6.4 Herstellung einer hnRNP-R Knockout Maus durch homologe Rekombination | |
| in <i>E. coli</i> | 136 |
| 6.5 Axonale RNA Populationen: Warum und wie werden mRNAs differentiell | |
| in Axonen und Wachstumskegeln lokalisiert? | 140 |
| 6.5.1 Das Zusammenspiel cis- wirkender Lokalisierungs-Elemente | |
| von RNAs und trans- wirkender RNA Bindungsproteine | 140 |
| 6.5.2 Warum werden bestimmte mRNAs spezifisch lokalisiert? | 142 |
| 6.5.3 Externe Signale und lokale Proteinsynthese von spezifisch lokalisierten mRNAs | 142 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| 7. Literaturverzeichnis | 144 |
| 8. Anhang | 156 |
| 9. Erklärung | 162 |
| 10. Publikationen | 164 |
| 11. Danksagung | 165 |

1. Zusammenfassung

Bei Yeast Two-Hybrid Untersuchungen wurde in unserer Arbeitsgruppe das RNA-Bindungsprotein hnRNP-R als Interaktionspartner von SMN gefunden und es konnte gezeigt werden, dass hnRNP-R mit SMN in Axonen von primären Motoneuronen kolokalisiert (Rossoll et al., 2002). hnRNP-R assoziiert mit der β -Aktin mRNA und nach Überexpression kommt es zu einer Akkumulation von β -Aktin in den Wachstumskegeln von neuronalen Zellen, sowie zu verstärktem Neuritenwachstum bei PC12 Zellen. Wird die SMN-Bindungsdomäne von hnRNP-R deletiert, ist dieser Effekt stark reduziert (Rossoll et al., 2003). Auf diesen *in vitro* Befunden ist die Hypothese begründet, dass hnRNP-R an der Translokation der β -Aktin mRNA in die Wachstumskegel von neuronalen Zellen beteiligt ist. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von hnRNP-R bei der Entwicklung in Neuronen des Nervensystems näher untersucht. Dazu wurden Zebrafisch Embryonen als *in vivo* Modellsystem für Morpholino vermittelte Knockdown Untersuchungen gewählt.

Zunächst wurde ein gegen murines Protein hergestelltes hnRNP-R Antiserum charakterisiert und gezeigt, dass es das Zebrafisch Protein spezifisch erkennt. Dieses Antiserum wurde in Western Blot Analysen verwendet um den hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen zu verifizieren. Bei den hnRNP-R Morpholino injizierten Embryonen konnten dosisabhängig axonale Veränderungen beobachtet werden. Diese Veränderungen stimmen mit einem Krankheitsmodell für SMA im Zebrafisch überein. Es konnte gezeigt werden, dass das Überleben primärer Motoneurone in Zebrafisch Embryonen nicht beeinträchtigt ist und dass andere neuronale Zellen keine signifikante Beeinflussung durch einen hnRNP-R Knockdown erfahren. Um die Spezifität des axonalen Phänotyps, der durch hnRNP-R Knockdown hervorgerufen wurde zu belegen, wurde mit muriner hnRNP-R mRNA ein Rescue-Experiment durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass dabei der axonale Phänotyp weitestgehend wieder aufgehoben wurde.

Parallel zu den Zebrafisch Experimenten wurde ein hnRNP-R Knockout Konstrukt mittels homologer Rekombination in *Escherichia coli* hergestellt und in murine embryonale Stammzellen elektroporiert. Die Charakterisierung einer hnRNP-R Knockout Maus könnte weitere bedeutende Einsichten in die *in vivo* Funktionen von hnRNP-R bei der Embryonalentwicklung und speziell der Entwicklung von Motoneuronen gewähren.

Um der Frage nach zu gehen, welche mRNAs in Wachstumskegeln von Axonen primärer Maus Motoneuronen zu finden sind oder durch Transportprozesse lokal akkumuliert sind,

wurden Versuche unternommen, um mittels Laser-Mikrodissektion einzelne Wachstumskegel von Motoneuronen für Untersuchungen der enthaltenen mRNAs zu gewinnen. Erstmals ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, kompartimentalisierte Kulturen von primären Motoneuronen der Maus zu etablieren. Damit wurde die Grundlage geschaffen, um RNA-Profile von distalen Zellkompartimenten wie den Axonen und Wachstumskegeln zu bestimmen.

2. Summary

In previous yeast two-hybrid studies, we have shown that hnRNP-R is an interaction partner of SMN and that it co-localises with SMN in axons of primary motor neurons (Rossoll et al., 2002). hnRNP-R associates with the β -actin mRNA and after overexpression, an accumulation of β -actin in growth cones of neuronal cells and elongated neurite growth of pc12 cells could be observed. If the SMN binding domain of hnRNP-R was deleted, this effect was strongly reduced (Rossoll et al., 2003). On this *in vitro* observations the hypothesis is based, that hnRNP-R plays an important role in the translocation of β -actin mRNA to the growth cones of neuronal cells.

For that reason, the role of hnRNP-R in the development of neuronal cells of the nervous system was investigated in more detail, in line with this thesis. We have chosen embryonic zebrafish as an *in vivo* model system for morpholino mediated knockdown analysis of hnRNP-R.

First of all an antiserum that has been generated against murine hnRNP-R protein was characterised and it could be shown that it specifically recognises the zebrafish protein. This antiserum was used in western blot analysis to verify the hnRNP-R knockdown in embryonic Zebrafish. Dose dependent axonal phenotypes could be described in hnRNP-R morpholino injected embryos, that resembled the alterations, observed in a disease model for SMA in zebrafish. We could show that the survival of motor neurons in zebrafish embryos was not impaired and that other populations of neuronal cells, were not significantly affected by the hnRNP-R knockdown. To prove the specificity of the axonal phenotype after hnRNP-R knockdown, a rescue experiment with co-injected mouse hnRNP-R mRNA has been performed, that nearly abolished the axonal phenotype.

In parallel to the zebrafish experiments an hnRNP-R knockout construct was made by homologues recombination in *Escherichia coli*. This construct has been electroporated into embryonic stem cells of mice, and obtained clones have been screened. The characterisation of an hnRNP-R knockout mouse could reveal important insights of *in vivo* functions of hnRNP-R in embryonic development and especially the development of motor neurons.

To answer the question, which mRNAs are located in growth cones of primary mouse motor neurons, or are locally accumulated due to mRNA transport processes, growth cones of primary mouse motor neurons have been cut by laser micro dissection.

For the first time, compartmentalised cell cultures of primary motor neurons could be established during this thesis, providing the background to generate detailed RNA profiles of distal cell compartments like axons and growth cones.

3. Einleitung

3.1 Motoneuronerkrankungen

Die beiden Hauptformen von Motoneuronerkrankungen des Menschen, die Amyotrophe Lateralsklerose des Erwachsenenalters und die proximale spinale Muskelatrophie des Kindesalters sind schwere Erkrankungen, die in der Regel innerhalb weniger Monate bis Jahre zum Tod führen, und die nach wie vor nicht behandelbar sind. Im Gegensatz zur Amyotrophen Lateralsklerose, die in mehr als 90 % der Fälle sporadisch auftritt, ist die spinale Muskelatrophie des Kindesalters in über 95 % der Fälle autosomal rezessiv durch homologe Deletion des SMN Gens auf dem Chromosom 5 des Menschen verursacht. Dieser Befund vereinfacht es, für diese Form von Motoneuronerkrankung Tiermodelle in der Maus, Fliege und dem Zebrafisch zu generieren und an diesen Modellen Krankheitsprozesse zu untersuchen, um molekulare und zelluläre Targets für eine Therapie zu identifizieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der SMN Interaktion mit hnRNP R bei axonalen Wachstumsprozessen in Motoneuronen aufzuklären und so zum grundlegenden Verständnis der spinalen Muskelatrophie beizutragen, um somit langfristig die Entwicklung von Therapien zu ermöglichen.

3.1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist mit einer Inzidenz von 1-2 pro 100000 Einwohner/Jahr, die am weitesten verbreitete degenerative Motoneuronerkrankung. Das Erkrankungsalter liegt normalerweise zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, allerdings sind viel seltener auch früher beginnende juvenile Formen bekannt. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (1,6 zu 1). Nur etwa 10 % der ALS Patienten haben eine positive Familienanamnese (fALS), während 90 % von einer sporadischen Form der ALS (sALS) betroffen sind. Bei der ALS sind sowohl die oberen als auch die unteren Motoneurone betroffen. Die im Rückenmark gelegenen (spinalen oder unteren) Motorneurone zählen zu den multipolaren Neuronen. Sie innervieren die Skelettmuskelfasern und leiten somit Reize vom motorischen Kortex an die Muskulatur weiter. Die ersten (kortikalen oder oberen) Motoneurone projizieren vom Motorkortex über den Hirnstamm in das Rückenmark. Dort erfolgt eine Verschaltung mit den zweiten (unteren) motorischen Neuronen. Die Dysfunktion dieser Nervenzellen ist für die spezifischen Krankheitssymptome wie Lähmung (Paralyse) und Spastik verantwortlich. Erkrankte leiden an einer fortschreitenden Muskelschwäche (Parese). Durch die Degeneration der ersten Motoneurone kommt es zu schmerzhaften Spastiken und durch die Degeneration der zweiten Motoneurone zur Lähmung mit

anschließendem Muskelschwund (Atrophie). Meist kommt es zu Sprech-, Schluck-, und Gangproblemen, schlechter Koordination und Schwäche der Arm- und Handmuskulatur und schließlich zur Schwäche der Atemmuskulatur, die zum Tod durch Ersticken führt. Die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnose wird mit etwa 5 Jahren angegeben. Haupttodesursache ist eine respiratorische Insuffizienz (Winkler und Ludolph, 2004). Circa 5-10 % der ALS Fälle sind monogenetisch familiär, und auch hier unterscheidet man mehr als 10 unterschiedliche Fälle. Bei der häufigsten familiären Form der ALS ist eine autosomal dominante Mutation im Gen für die Superoxid Dismutase-1 (SOD-1), als Krankheitsauslöser ausgemacht worden (Rosen et al., 1993). Bei fast allen Formen der ALS findet man histologisch Ubiquitin-positive Ablagerungen, die TDP-43 und Hitzeschock-Proteine enthalten (Bossy-Wetzel et al., 2004; Forman et al., 2004). Der pathogene Mechanismus hinter der Erkrankung ist noch nicht aufgeklärt und weiterhin Gegenstand intensiver Forschung. Man nimmt an das es durch Mutationen im SOD-1 Gen zu einem toxischen Funktionsgewinn kommt, der zu Fehlfaltungen und Proteinaggregaten führt.

Des Weiteren kommt es zu Defekten im axonalen Transport, zu Fehlfunktionen in den Mitochondrien und durch eine reduzierte Glutamat Aufnahme von Gliazellen zu einer Exzitotoxizität (Bossy-Wetzel et al., 2004). Neurone, die mutiertes pathogenes SOD-1 exprimieren, können durch umliegende wildtypische Gliazellen gerettet werden. Dies lässt darauf schließen, dass Gliazellen die Toxizität von SOD-1 vermitteln bzw. modulieren (Clement et al., 2003). Bei Analysen einer Tunesischen Großfamilie mit einer langsam fortschreitenden Form der ALS, wurden Mutationen im Alsin-Gen gefunden (Yang et al., 2001; Hadano et al., 2001). Da Alsin mit kleinen Membranvesikeln assoziiert ist und als *guanin-nucleotide-exchange factor* für Rab5 und Rac1 wirkt, könnte es an der Endocytose bei Neuronen beteiligt sein. Da in den Proteinaggregaten bei diesen ALS Patienten auch Neurofilament gefunden wird, wurden auch Neurofilament-Gene genauer untersucht. Auch hier wurden mehrere Mutationen gefunden, die als Risikofaktoren für sporadisch auftretende ALS diskutiert werden (Cleveland und Rothstein, 2001).

Es scheint bei ALS also keinen eindeutigen Pathomechanismus zu geben, sondern Störungen des axonalen Transports und des intrazellulären Vesikeltransports. Diese treten zusammen mit Proteinaggregationen auf und eine der wichtigsten Fragen der aktuellen Forschung fokussiert darauf, ob die Proteinaggregate Ursache der Transportstörungen sind, oder umgekehrt, die Transportstörungen Auslöser der axonalen Aggregate darstellen.

3.1.2 Spinale Muskelatrophien

Spinale Muskelatrophien sind ein Überbegriff für eine genetisch heterogene Gruppe von Krankheiten, die einen fortwährenden Untergang ausschließlich der unteren spinalen Motoneurone zur Ursache haben. So ist das Leitsymptom dieser Gruppe von Erkrankungen auch nicht die Spastik, sondern ausschließlich die Lähmung der Muskulatur. Durch die fortschreitende Degeneration der unteren motorischen Neurone kommt es zur Denervation, was zunehmenden Muskelschwund (Muskelatrophie), Lähmungen (Paresen) und reduzierte Muskelspannung (Muskelhypotonie) der Gliedmaßen- und Rumpfmuskulatur zur Folge hat (Korinthenberg et al., 1997). Bei Muskelatrophien ist im Gegensatz zu Dystrophien die Muskulatur nicht selbst erkrankt. Sind auch Nervenzellen im Hirnstamm betroffen, deren Entwicklung den Vorderhornzellen des Rückenmarks gleich zu setzen ist, kann es zu Lähmungen der Atem-, Sprech-, Kau- und Schluckmuskulatur kommen. Andere Organe sind normalerweise nicht beeinträchtigt, wodurch es zu keinen Störungen der Sinneswahrnehmungen (z.B. Sehen und Hören) oder Funktionen der inneren Organe (z.B. Blase oder Darm) kommt. Die kognitiven Leistungen sind bei Erkrankten ebenfalls als normal einzustufen. Neben den Erwachsenenformen, sind die kindlichen proximalen spinalen Muskelatrophien mit Deletion des SMN Gens auf Chromosom 5 mit Abstand die häufigste Form dieser Erkrankung. Klinisch werden bei der SMA verschiedene Untergruppen nach Schweregrad, Erkrankungsbeginn und Erbgang klassifiziert (siehe Tabelle 3.1).

| SMA Typ | Erbgang | Gen/Genlocus | Phänotyp/Krankheitssymptome | Erkrankungsbeginn |
|-----------------------------|--------------------|------------------------------|--|-------------------|
| Proximale SMAs | | | | |
| 1. Typ I SMA | Autosomal rezessiv | SMN1; 5q11.2-13.3 | Proximale Muskelschwäche, freies sitzen nie möglich, Tod < 2 Jahre | < 6 Monate |
| 2. Typ II SMA | Autosomal rezessiv | SMN1; 5q11.2-13.3 | Proximale Muskelschwäche, freies sitzen möglich, laufen nie. Entwickeln eine Skoliose der Wirbelsäule | 6-18 Monate |
| 3. Typ III SMA | Autosomal rezessiv | SMN1; 5q11.2-13.3 | Proximale Muskelschwäche, freier Gang und Stand, normale Lebenserwartung | > 18 Monate |
| Distale SMAs | | | | |
| Distale SMA | Autosomal rezessiv | 11q13 | Distale Muskelschwäche Zwerchfellmuskulatur betroffen | 2 Monate–20 Jahre |
| SMARD | Autosomal rezessiv | IGHMBP2; 11q13.2 | Distale untere Extremitäten, Zwerchfellschwäche, sensorische und autonome Nerven ebenfalls betroffen | 1–6 Monate |
| X-chromosomal infantile SMA | X-chromosomal | Xp11.3-q11.2 | Arthrogryposis, Ateminsuffizienz, Skoliose, Deformation des Brustkorbes, Verlust von Vorderhornzellen | Bei Geburt |
| SBMA | X-chromosomal | Androgen Rezeptor; Xq11.2-12 | Proximale Muskelschwäche, Verlust der unteren Motoneurone, DRG Verlust, Bulbärscheinungen | 30-50 Jahre |
| Distale SMA Typ IV | Autosomal dominant | 7p15 | Distale Muskeln betroffen, beidseitige Schwäche der Handmuskulatur, Atrophie des Handballens und der Wadenmuskulatur | 12-36 Jahre |

Tab. 3.1: Verschiedene Formen humaner spinaler Muskelatrophie.

Die proximalen spinalen Muskelatrophien umfassen etwa 90 % der spinalen Muskelatrophien, die durch eine beginnende Muskelschwäche in Rumpfnahen Muskelgruppen (Oberschenkel-, Hüft-, später Arm-, und Schultergürtel) charakterisiert sind. Hierzu gehören laut internationalem SMA Konsortium die Typen I-III (1992). Proximale Formen von SMA werden, autosomal rezessiv vererbt, beide Eltern müssen also den gleichen Gendefekt an einen Nachkommen vererben. Nach Monani, 2005.

Nicht-proximale spinale Muskelatrophien sind wesentlich seltener und durch ein erstes, nicht rumpfnahes Auftreten der Symptome definiert. Sie beginnen z.B. an der Schulter und Unterschenkelmuskulatur (skapulooperoneale SMA) oder die Atemmuskulatur ist

beeinträchtigt (*SMA with respiratory distress*, SMARD). Eine aufgrund des Erbganges und ihrer Genetik gesonderte spinale Muskelatrophie, ist der Typ Kennedy (Kennedy et al., 1968), der auch *X-linked spinal* (SMA_{X1}) oder *bulbar muscular atrophy* (SBMA) genannt wird. Die Kennedy Erkrankung wird X-Chromosomal rezessiv vererbt. Sie tritt ausschließlich bei adulten männlichen Individuen, zumeist ab dem 30. Lebensjahr auf. Sie ähnelt im klinischen Verlauf den klassischen Formen der spinalen Muskelatrophie. Zunächst sind proximale, danach auch distale Muskelgruppen betroffen. Zusätzlich sind Hirnstammnerven beteiligt, wodurch es zu einem Muskelabbau im Kehlkopf, der Kaumuskulatur, der Zunge und der Gesichtsmuskulatur kommt. Hervorgerufen wird die Kennedy Erkrankung durch eine Ausdehnung einer CAG Trinukleotid-Wiederholung in Exon 1 des Androgen Rezeptorgens.

Der Gendefekt, welcher der proximalen SMA beim Menschen zugrunde liegt, ist durch eine Deletion oder homozygote Mutation des ubiquitär exprimierten SMN (*survival motor neuron*) Gens auf Chromosom 5q13 charakterisiert (Lefebvre et al., 1995). Beim Menschen existieren zwei Kopien des Gens auf Chromosom 5, eine Telomerische (SMN1) und eine Centromere (SMN2). Sie unterscheiden sich in nur 5 Nukelotiden im 3'-Bereich des Gens. Eine reduzierte Expression des SMN1 Proteins führt zum Verlust spinaler Motoneurone (Melki, 1997) und damit zum Krankheitsbild von SMA, während der Verlust des SMN2 Genes keinen Phänotyp zeigt (Monani et al., 2000). Im Gegensatz zu SMN1, das vorwiegend als vollständiges Transkript exprimiert wird, findet bei SMN2 in 90 % der Fälle, ein alternatives Spleißen von Exon 7 statt, was zu einer C-terminal trunkierten Variante des SMN Proteins führt (Monani et al., 1999; Monani, 2005; Abbildung 3.1). Dieser verkürzten Spleißvariante fehlen die letzten 16 C-terminalen Aminosäuren und sie ist offensichtlich nicht in der Lage die Pathogenität einer reduzierten SMN1 Expression vollständig zu kompensieren.

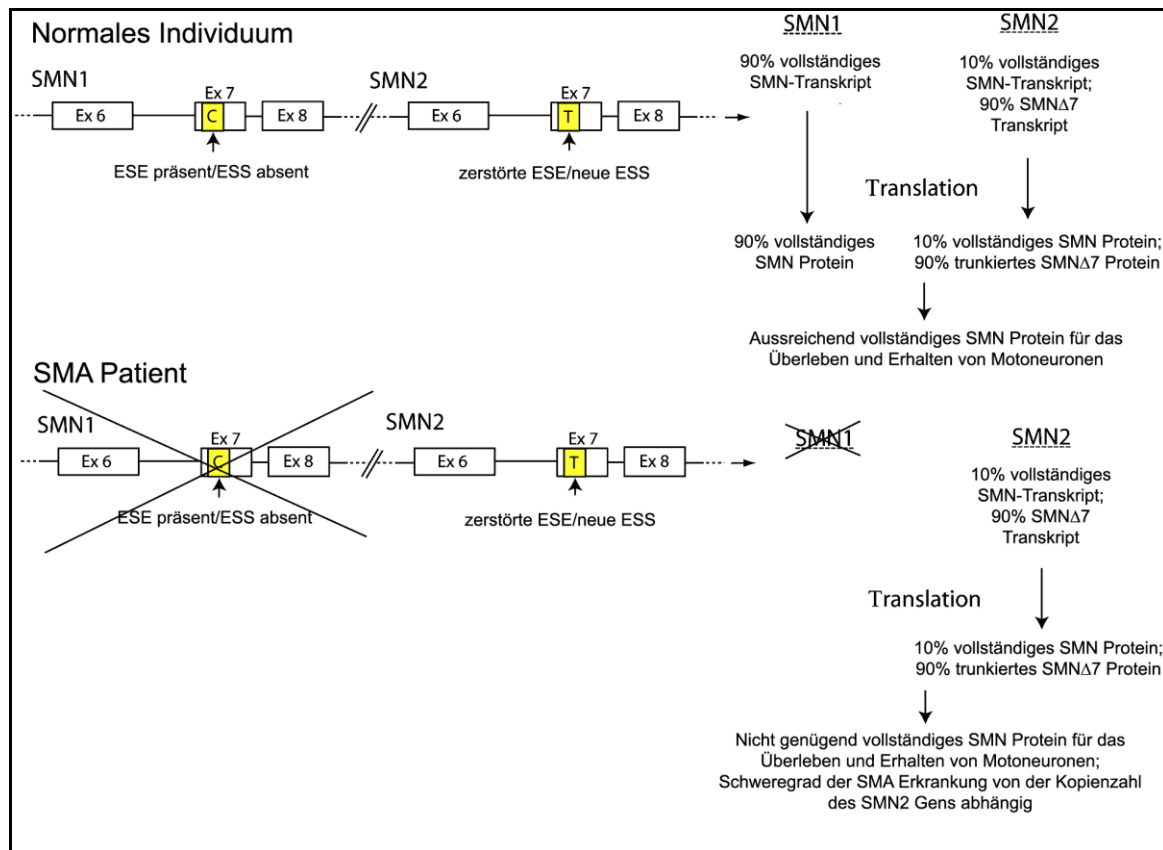


Abb. 3.1: Die genetische Grundlage der proximalen spinalen Muskelatrophie.

Die beiden SMN Gene (SMN1 und SMN2) auf dem humanen Chromosom 5 sind dargestellt, die jeweils in einer invertiert duplizierten Chromosomenregion lokalisiert sind. Bei SMA Patienten sind die SMN1 Gene homozygot deletiert, oder in selteneren Fällen, besitzen sie Punktmutationen. Bei diesen Patienten findet man immer zumindest eine Kopie des SMN2 Gens. ESE, Exon splicing enhancer. ESS, Exon splicing silencer. Nach Monani, 2005.

Es gibt einen Zusammenhang zwischen der Kopienzahl des SMN2 Gens und des Krankheitsverlaufs von SMA. So konnte mittels quantitativer Real-Time PCR gezeigt werden das mehr SMN2 Kopien, zumeist mit einer schwächeren SMA Variante einhergehen (Tabelle 3.2; Feldkotter et al., 2002). Dies belegt, dass das SMN2 Gen dosisabhängig den Krankheitsschweregrad positiv modulieren kann.

| Test und Patienten Status | SMN Kopienzahl | | | | Total |
|------------------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| SMN1: | | | | | |
| Träger | 119 (96,0 %) | 5 (4,0 %) | 0 (0,0 %) | 0 (0,0 %) | 124 |
| Nicht Träger | 0 (0,0 %) | 61 (93,8 %) | 4 (6,2 %) | 0 (0,0 %) | 65 |
| Kontrollen | 4 (2,9 %) | 132 (94,3 %) | 3 (2,1 %) | 1 (1,0 %) | 140 |
| | | | | Gesamt | 329 |
| SMN2: | | | | | |
| Typ I SMA | 13 (6,9 %) | 138 (73,4 %) | 37 (19,7 %) | 0 (0,0 %) | 188 |
| Typ II SMA | 0 (0,0 %) | 12 (10,9 %) | 90 (81,8 %) | 8 (7,3 %) | 110 |
| Typ III SMA | 0 (0,0 %) | 3 (3,9 %) | 39 (50,6 %) | 35 (45,5 %) | 77 |
| | | | | Gesamt | 375 |

Tab. 3.2: Die Verteilung von SMN1 Kopien in Trägern, nicht Trägern und Kontroll-Personen, sowie die Verteilung von SMN2 Kopien bei SMA-Patienten.

80 % der Patienten mit Typ I SMA, besitzen eine oder zwei Kopien des SMN2 Gens, 82 % der Typ II Patienten, tragen drei SMN2 Kopien und 96 % der am mildesten verlaufenden Typ III SMA Erkrankten, haben drei oder vier SMN2 Kopien. Nach Feldkötter et al., 2002.

Mäuse besitzen nur eine Kopie des *Smn* Gens, die als Äquivalent zum humanen SMN1 Gen angesehen wird (Monani et al., 2000). Eine homozygote Deletion des *Smn* Gens führt zu erhöhter Apoptose im frühen Blastozystenstadium der Embryonalentwicklung und ist embryonal Letal (Schrank et al., 1997). Für ein SMA Krankheitsmodell, wurden eine, bzw. zwei humane SMN2 Kopien in das Mausgenom auf einem *Smn* Knockout Hintergrund integriert. Durch die im Vergleich zu den Knockout Mäusen erhöhte SMN Proteinmenge, überleben diese Mäuse bis nach der Geburt und weisen einen mäßig erhöhten (17 %) Verlust der Motoneuronzellkörper im Rückenmark und Hirnstamm auf, der mit dem Phänotyp der schwersten Form der menschlichen SMA, der SMA Typ I vergleichbar ist. Wurden 8 Kopien von SMN2 integriert, fand man keinen SMA Phänotyp mehr (Monani et al., 2000; Monani et al., 2003). Dies deutet auch im Mausmodell auf einen Zusammenhang der Schwere des Phänotyps mit der Kopienzahl des SMN2 Gens hin. Es kann also sowohl bei Patienten als auch im Mausmodell vom SMN2 Gen soviel SMN Protein gebildet werden, dass sich diese

Individuen bis zur Geburt relativ normal entwickeln. Postnatal kommt es dann aufgrund der reduzierten SMN Produktion zur Erkrankung.

In immunhistologischen Untersuchungen ist SMN sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus der Zelle zu finden. Im Zellkern liegt SMN in Gems (*gemini of coiled bodies*) vor, die oft mit coiled bodies (auch *Cajal bodies*) assoziiert sind (Liu et al., 1996). In coiled bodies finden sich viele Proteine die an der Prozessierung nukleärer RNAs, insbesondere dem Recycling von Spleißosomen beteiligt sind. Daher wurde angenommen, dass auch SMN am RNA Metabolismus beteiligt ist. SMN assoziierte Proteine, die aufgrund ihrer Kolokalisation mit SMN in Gems als Gemin 2-8 (*Gemins*) bezeichnet werden, bilden zusammen mit SMN einen makromolekularen Komplex (*Assemblysome*), der bei der zytoplasmatischen snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particles*) Assemblierung, sowie deren Funktion im Spleißosom eine Rolle spielt (Fischer et al., 1997; Meister et al., 2002; Review in Gubitza et al., 2004). Da alle Zellen Spleißosomen benötigen, um ihre Vorläufer mRNAs zu prozessieren, ist SMN und die Funktion dieses Komplexes für das zelluläre Überleben unerlässlich.

Eine ungeklärte Frage ist hingegen, warum eine reduzierte SMN Expression im gesamten Organismus, zu einem spezifischen Absterben von Motoneuronen im Rückenmark und Hirnstamm und somit zum Krankheits-Phänotyp von SMA führt. Eine interessante Parallele zur ubiquitär exprimierten Superoxid Dismutase-1 (SOD-1) und der Amyotrophen Lateralsklerose, bei der ebenfalls nur die Motoneurone betroffen sind. Bislang konnte kein Zusammenhang zwischen gestörten snRNP Metabolismus und mRNA splicing Defekten in Motoneuronen von SMA Mausmodellen (Jablonka et al., 2000) oder SMA Patienten (Sendtner, 2001) festgestellt werden. Eine neuere Studie untersuchte mit Exon spezifischen Mikroarrays das Ausmaß alternativer Spleiß-Vorgänge im Rückenmark in einem SMA Maus-Modell ($Smn^{-/-}$; SMN2; SMN Δ 7; Baumer et al., 2009). Dabei wurden die meisten alternativen Spleiß-Varianten erst bei älteren Mäusen gefunden, nicht jedoch bei Jungen. Daher ist anzunehmen, dass es sich hierbei um eine sekundäre Veränderung der Expression handelt, wenn die Zellen bereits durch die Erkrankung geschädigt sind, und nicht um einen generellen, primären Spleiß-Defekt. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass verändertes Spleißen von wenigen oder nur in bestimmten Zellpopulationen exprimierten Transkripten, die für das Überleben der Motoneurone benötigt werden, eine Rolle spielen.

Aufgrund der Zellgröße und dem damit erhöhten Energiebedarf von Motoneuronen wurde die Hypothese aufgestellt, dass sie empfindlicher auf geringe SMN Proteinmengen reagieren, da SMN für die Regeneration von Komplexbestandteilen benötigt wird, die während des

Spleißens in einen inaktiven Zustand versetzt wurden (Pellizzoni et al., 1998). Dem widerspricht die Beobachtung, dass andere große Neuronen mit langen Axonen, wie z.B. kortikale Motoneurone oder sensorische Neurone bei der SMA nicht, oder nur sehr leicht betroffen sind. Eine weitere Vermutung ist, dass durch wenig SMN Protein spezifische von Motoneuronen benötigte mRNAs, fehlerhaft oder in nicht ausreichenden Mengen gespleißt werden. Bislang wurden aber noch keine solchen spezifischen mRNAs beschrieben (Monani, 2005).

Eine wichtige Beobachtung zur Aufklärung der spezifischen Rolle von SMN bei Motoneurone ist das Verhalten von isolierten Motoneuronen aus $Smn^{-/-};SMN2$ transgenen Mäusen in Zellkultur. Diese Motoneurone könne in Zellkultur uneingeschränkt überleben, zeigen aber ein Reduktion im Axonwachstum, jedoch nicht im Dendritenwachstum. Auch die axonalen Wachstumskegel sind bei solchen Smn defizienten Motoneuronen deutlich kleiner (Rossoll et al., 2003). Auf Basis dieser Beobachtung wird neben der zentralen Rolle von SMN bei der snRNP Assemblierung in allen Zelltypen eine Motoneuron spezifische Funktion beim Axonwachstum und bei der Aufrechterhaltung von Axonen bzw. Axonterminalen diskutiert. Das SMN Protein ist nicht nur im Zellkörper, dem Ort der snRNP-Assemblierung, sondern auch in Axonen und Wachstumskegeln von Neuronen hoch akkumuliert, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Fan and Simard, 2002; Rossoll et al., 2002; Bechade et al., 1999; Pagliardini et al., 2000; Zhang et al., 2006). SMN enthaltende granuläre Strukturen wurden in Dendriten kortikaler Hühnchen Neuronen und spinaler Neurone bei der Ratte gefunden. Diese SMN Partikel sind mit Mikrotubuli assoziiert und wandern zwischen Zytosol und Wachstumskegel (Zhang et al., 2003). SMN könnte also Bestandteil eines ribonucleoprotein Komplexes sein, der sich vom Assemblysome unterscheidet und in Motoneuronen spezifische RNAs entlang des Axons zu den Wachstumskegeln transportiert. Ein wichtiger Mechanismus bei polarisierten Zellen, wie Neuronen, ist die lokale Translation von Proteinen in Zellkompartimenten wie z.B. dem Axon (Ross et al., 1997). Axonale Zielsuche, speziell von Motoneuronen, wird durch eine Vielzahl von Signalen und Botenstoffen wie Semaphorinen, neurotrophen Faktoren und Netrinen gesteuert (Dickson, 2002). Retinale Wachstumskegel reagieren auf Botenmoleküle durch lokale Protein Synthese und rasche Degradierung (Campbell und Holt, 2001). Lokale Synthese von RhoA, bewirkt beispielsweise den Kollaps des Wachstumskegels als Reaktion auf ein Semaphorin 3A Signal (Wu et al., 2005). Neurotrophine können Richtungsänderungen durch asymmetrische Proteinsynthese in den axonalen Terminalen auslösen (Willis et al., 2007; Mai et al., 2009).

Durch die lokale Translation von β -Aktin in Neuronen wird die axonale Wachstumsrichtung in Reaktion auf eine Netrin-1 Quelle gesteuert (Leung et al., 2006). Speziell in Neuronen, spielt lokale β -Aktin Synthese für die Motilität als Reaktion auf chemotrophe Reize eine entscheidende Rolle (Yao et al., 2006).

3.2 Ribonukleoproteine

Bei der Suche nach der Funktion des Smn Proteins in Axonen wurde in unserem Labor zunächst nach Proteinen gesucht, die mit Smn in Axonen interagieren. Durch Yeast Two-Hybrid Analysen wurde das hnRNP-R (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R*) Protein als Interaktionspartner gefunden, und die Spezifität der Interaktion durch Ko-Immunpräzipitations Experimente verifiziert (Rossoll et al., 2002; Rossoll et al., 2003). Smn und hnRNP-R sind in Axonen von Motoneuronen kolokalisiert, die Deletion der Smn Interaktionsdomäne in hnRNP R verhindert die stimulierende Wirkung der hnRNP-R Überexpression in neuronalen Zellen (Rossoll et al., 2003). Dies ist ein wichtiger Hinweis, dass die Interaktion dieser beiden Proteine für Axone von Motoneurone und deren Aufrechterhaltung eine bedeutende Rolle spielen könnte.

RNAs liegen in Säuger Zellen normalerweise nicht in freier Form vor, sondern sind an Proteine gebunden und bilden dadurch eine Vielzahl verschiedener Komplexe im Zellkern und im Zytosol. Diese so genannten Ribonucleoprotein (RNP) Partikel werden im Allgemeinen durch die Art der RNAs, die sie enthalten, unterschieden (Dreyfuss et al., 1989). Aufgrund ihrer Lokalisation im Zellkern und der Heterogenität ihrer Größe werden die Transkripte der RNA Polymerase II „*heterogenous nuclear RNAs*“ oder hnRNAs genannt (Dreyfuss et al., 1993). Die Gruppe der hnRNAs besteht zum überwiegenden Teil aus Vorläufer mRNAs. Heterogene nucleäre RNA bindende Proteine (hnRNP) sind mit diesen Transkripten bereits während deren Entstehung assoziiert. Auch snRNPs gehören zu den RNPs und sind die wohl am besten untersuchten Mitglieder dieser Proteinfamilie (Dreyfuss et al., 1988; Kolb et al., 2007; Meister et al., 2002; Will und Luhrmann, 2001). Eine andere Gruppe von RNPs enthält fertig prozessierte mRNAs, und wird daher *messenger ribonucleoprotein* (mRNP) Komplexe genannt (Dreyfuss et al., 2002; Hieronymus und Silver, 2004; Merz et al., 2007; Moore, 2005). HnRNP Proteine können nicht nur an mRNAs im Zellkern binden, sondern die fertig prozessierten mRNAs auch auf ihrem Weg in das Zytosol begleiten. In dieser Beziehung sind hnRNP Proteine von zentraler Bedeutung bei der Prozessierung von Prä-mRNAs im Zellkern und beim mRNA Transport in das Zytosol (Kim und Dreyfuss, 2001; Shyu und Wilkinson, 2000).

Bisher wurden mindestens 30 Mitglieder der hnRNP Protein Familie beschrieben (Krecic und Swanson, 1999). Im Allgemeinen sind sie sehr verbreitet und werden in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Den hnRNP Proteinen liegt eine gemeinsame Struktur zugrunde. Sie besitzen RNA Bindungsmotive, sowie eine glycinreiche Domäne (RGG Domäne) im C-Terminus, die wichtig für Interaktionen mit anderen Proteinen ist (Kiledjian und Dreyfuss, 1992). hnRNP Proteine können mit sich selbst, anderen hnRNP Proteinen und Familien fremden Proteinen wie z.B. SMN interagieren (Mourelatos et al., 2001; Rossoll et al., 2003). Neben ihrer Rolle bei der Prä-mRNA Prozessierung, sind sie auch bei der Regulation der Transkription beteiligt. hnRNP-K kann Promotor Elemente verschiedener Gene, wie z.B. an das des Angiotensinogene Gen in Ratten Nierenzellen binden, wo es die mRNA Transkription unterbindet (Wei et al., 2006). Des Weiteren kann hnRNP-K an das Promotor Element des Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binden, dadurch die Transkription stimulieren und somit entscheidend in die Zell Proliferation eingreifen (Lynch et al., 2005). Ähnliches wurde für hnRNP-U und -D gezeigt, die an den Promotor des Kruppel like factor 2 Gens binden und somit dessen transkriptionelle Regulation mitgestalten. (Ahmad und Lingrel, 2005). In Drosophila wird die Gurken mRNA durch Squid (Hrp40) reguliert, einem Protein der hnRNP A/B Proteinfamilie.

Neben diesen nukleären Funktionen, hat man hnRNP Proteine auch außerhalb des Zellkerns gefunden. Hierbei sind vor allem das Shuttling und der Transport von mRNAs in das Zytosol als wichtigste Funktion zu nennen (Kessler et al., 1997; Lee et al., 1996; Lee and Silver, 1997; Pinol-Roma und Dreyfuss, 1993; Shen et al., 1998; Visa et al., 1996). Zumindest einige hnRNP Proteine sind in signifikanten Mengen in zytoplasmatischen Zellkompartimenten, wie z.B. Neuriten von Neuronen zu finden (Rossoll et al., 2003). Die Funktion dieser Proteine in diesen weit vom Zellkörper entfernten Kompartimenten ist bisher nicht ausreichend untersucht. Studien legen nahe, dass hnRNPs auch bei der Translokation von mRNAs zu spezifischen Zellkompartimenten eine Rolle spielen. Diese Funktion ist gerade bei den hoch kompartimentalisierten Zellen des Nervensystems von entscheidender Bedeutung. HnRNP-A2 etwa, ist für die Translokation der Myelin mRNA in Oligodendrozyten wichtig (Brumwell et al., 2002) und sein Drosophila Homolog, Squid, ist an der subzellulären Lokalisation und der Translation der Gurken mRNA beteiligt (Norvell et al., 1999).

3.3 Heterogenous nuclear ribonucleoprotein-R (hnRNP-R)

Im Blut von Patienten mit Autoimmun-Erkrankungen wurden Antikörper gegen ein neues Protein der Ribonukleoproteinfamilie beschrieben (Hassfeld et al., 1998), das durch Sequenzanalysen der hnRNP Familie zugeschrieben werden konnte. hnRNP-R besteht aus 632 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 70 kDa sowie einen Isoelektrischen Punkt von 8,54. Der N-terminus von hnRNP-R ist etwa 150 Aminosäuren lang und enthält zwei RNA Bindungsmotive (RRM1, RRM2), mit denen es in der Lage ist einzelsträngige poly(U)-RNAs zu binden. Des Weiteren gibt es eine im C-terminus gelegene Arginin und Glycin reiche Domäne (RGG). RGG Domänen sind allen hnRNPs gemeinsam und ermöglichen es, verschiedene RNA Sequenzen zu erkennen (Kiledjian und Dreyfuss, 1992). Sehr nahe an der RGG Domäne gelegen findet sich ein Motiv, welches die Interaktion mit SMN vermittelt und die denen von anderen SMN bindenden Proteinen ähnelt (Rossoll et al., 2002). Mittels Ko-Immunopräzipitation wurde gezeigt, dass hnRNP-R in der Lage ist, wildtypisches SMN zu binden. HnRNP-R wird wie auch SMN ubiquitär exprimiert, wobei die höchsten Konzentrationen bei Mäusen im Rückenmark in der späten Embryonalentwicklung zu finden sind. Besonderes Augenmerk verdient neben der Interaktion mit Snn die Tatsache, dass hnRNP-R und Snn in Axonen von Motoneuronen kolokalisiert sind. Ein deutlicher Hinweis auf eine zusätzliche Funktion von SMN in diesen Zellen (Rossoll et al., 2002).

Das zytosolisch lokalisierte Synaptotagmin bindende Protein SYNCRIP (*synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interacting protein*) besitzt 81 % Sequenzidentität mit humanen hnRNP-R und wurde später zu hnRNP-Q umbenannt (Mizutani et al., 2000). C-terminal fehlt ein putatives Kernlokalisierungssignal, weshalb hnRNP-Q manchmal als zytosolische Variante von hnRNP-R bezeichnet wird, jedoch konnte das Kernlokalisierungssignal nie experimentell nachgewiesen werden. Auf Proteinsequenz Ebene sind murines und humanes hnRNP-R/-Q hoch homolog. Auch hnRNP-Q besitzt eine SMN Bindungsdomäne, die denen von SMN bindenden spleißosomalen Sm-Proteinen sehr ähnlich ist. Wird diese Domäne mutiert, verliert hnRNP-Q die Fähigkeit SMN zu binden (Mourelatos et al., 2001).

Aufgrund der Tatsache, dass hnRNP-R und SMN im Zellkern kolokalisieren, ging man von einer Beteiligung von hnRNP-R am Prozess des Spleißens aus. Allerdings wurde kein hnRNP-R zusammen mit SMN in Gems oder aufgereinigten Spleißosomen gefunden, was diese Hypothese zunehmend unwahrscheinlich erscheinen lässt (Neubauer et al., 1998; Pellizzoni et al., 1999). Sowohl hnRNP-R als auch SMN wurden in Neuriten von neuronalen Zellen gefunden (Rossoll et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass hnRNP-R mit der 3'-UTR der

β -Aktin mRNA interagiert (Rossoll et al., 2003), welche für die Translokalisierung der β -Aktin mRNA in Axone notwendig ist (Zhang et al., 2001).

Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass hnRNP-R zusammen mit SMN in einem neuronalen Transportkomplex vorliegt und mRNAs in Neuriten befördert. Tatsächlich konnte gezeigt werden das hnRNP-R und sein Bindungspartner SMN an der Translokalisierung von β -Aktin mRNA zu den Wachstumskegeln von PC-12 Zellen beteiligt ist (Rossoll et al., 2003). Überexpression von hnRNP-R und/oder SMN führt bei PC12 Zellen zu erhöhtem Neuritenwachstum. Überexpression einer hnRNP-R Δ Smn Variante, der die SMN Bindungsdomäne fehlt, führten zu weniger β -Aktin mRNA in den distalen Fortsätzen und parallel dazu, zu kürzeren Neuriten (Rossoll et al., 2003). In primären Motoneuron Kulturen von SMN^{-/-};SMN2 Mäusen waren die Wachstumskegel kleiner und die β -Aktin mRNA in den Wachstumskegeln deutlich reduziert (Rossoll et al., 2002). Diese Befunde korrelieren mit Defekten bei der präsynaptischen Differenzierung, bei der spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle nicht richtig in den Axonterminalen akkumulieren und somit zu reduzierter Erregbarkeit der präsynaptischen Kompartimente bei Motoneuronen führen (Jablonka et al., 2007; Kong et al., 2009). Zunächst war unklar, ob die Interaktion von hnRNP-R und der β -Aktin mRNA direkt ist oder über andere Proteine vermittelt wird. Ein Kandidat für die Vermittlung der Interaktion war ZBP-1 (*zipcode binding protein*; Ross et al., 1997), bzw. sein Säugerhomolog IMP-1 (Nielsen et al., 1999), welches an eine so genannte zipcode Domäne innerhalb der 3'-UTR bindet. Kürzlich konnte in unserem Labor jedoch gezeigt werden, dass hnRNP-R die 3'-UTR der β -Aktin mRNA direkt binden kann (Glinka et al., 2010), wahrscheinlich an einem Sequenzmotiv unmittelbar neben dem zipcode.

3.4 Insuline-like growth factor II mRNA-binding proteins

Insuline-like growth factor II mRNA-binding proteins (IMPs) gehören zu einer hoch konservierten Gruppe von mRNA bindenden Proteinen. Sie besitzen zwei N-terminale RNA Erkennungsmotive (RRMs), sowie vier C-terminale hnRNP-K-Homologie Domänen (KH).

Sie sind am Umsatz (*turnover*), der Lokalisation und der translationalen Kontrolle von mRNAs beteiligt (Hansen et al., 2004). Zu den mRNAs die von IMPs gebunden werden zählen unter Anderem Igf2 leader 3, H19, c-myc, Vg1 und die von β -Aktin (Havin et al., 1998; Leeds et al., 1997; Nielsen et al., 1999; Ross et al., 1997; Runge et al., 2000).

Die IMP Proteinfamilie besteht aus drei Homologen (IMP1-3) die in der frühen embryonalen Entwicklung exprimiert werden, wobei ein starker Anstieg der Expression um den Embryonalen Tag 12,5 herum zu beobachten ist. Während der frühen Neurogenese werden

die Xenopus und die Zebrafisch Vg1-RBP mRNA (IMP3 Orthologe), sowie die Drosophila IMP mRNAs im gesamten Zentralen Nervensystem exprimiert (Hansen et al., 2004).

IMP-1 ist das Mausortholog des Hühnchen ZBP-1 und wurde ursprünglich aus einem Proteinkomplex der mit der β -Aktin mRNA assoziiert war, isoliert (Ross et al., 1997). Die β -Aktin mRNA ist, wie auch ZBP-1 in Wachstumskegeln von Neuronen kolokalisiert (Zhang et al., 2001; Gu et al., 2002). Eine Interaktion von ZBP-1 mit der β -Aktin mRNA wird über die KH-Domänen vermittelt (Farina et al., 2003). Dabei spielt die 54 Nukleotide lange zipcode Sequenz die in der 3'-UTR der β -Aktin mRNA gelegen ist eine bedeutende Rolle. Wird sie deletiert, ist ein Binden von ZBP-1 an die RNA nicht mehr möglich (Gu et al., 2002). Es wurde ein sequentielles Binden von ZBP-1 und ZBP-2 an die β -Aktin mRNA vorgeschlagen, wobei ZBP-2 an der nukleären Koordination des subzellulären Transports beteiligt sein soll. ZBP-1 hingegen nimmt an der Lokalisation der RNA in zytosolische Kompartimente teil, da es ein Kernexport Signal besitzt (Gu et al., 2002).

In primären Neuronen wird die lokale Translation der β -Aktin mRNA in Wachstumskegeln durch ZBP-1 unter der Kontrolle von Kinasen der Src-Familie reguliert. Dabei verhindert an die mRNA gebundenes ZBP-1 die Bildung des 80S ribosomalen Komplexes und unterdrückt somit die Einleitung der Translation im Karyoplasma und im Zytosol. Erst nach Transport dieses RNP-Komplexes zum Wachstumskegel, wird ZBP-1 durch die Src-Kinase phosphoryliert und dadurch die Bindungsaffinität an die β -Aktin mRNA stark reduziert. Da die Src-Kinase besonders in peripheren Zellkompartimenten aktiv ist, erfolgt hier hauptsächlich die Translation (Huttelmaier et al., 2005). Passend dazu sind in Wachstumskegeln primärer Motoneurone hohe Proteinmengen β -Aktin und freie Ribosomen gefunden worden (Jablonka und Sendtner, 2003). Da hnRNP-R die β -Aktin mRNA direkt bindet, ist davon auszugehen, dass IMP1 nicht etwa als Adaptermolekül agiert, sondern vielmehr eine unerwünschte Translation während des Transports in den Axonen unterbindet. Translationale Kontrolle durch IMPs wurde auch für die Insuline-like growth factor (IGF)-II mRNA beschrieben (Nielsen et al., 1999; Liao et al., 2004). Neben der Lokalisation von mRNAs und deren translationalen Kontrolle, kann ZBP-1 auch die Stabilität von mRNAs wie c-Myc, CD44 und β TrCP1 regulieren (Leeds et al., 1997; Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006). Im Kontext der integrierten Stress Antwort (*integrated stress response*, ISR) von Zellen stabilisiert ZBP-1 assoziierte mRNAs in so genannten Stress Partikeln (*stress granules*). Es verhindert auch einen Transit in Prozessierungskörper (*processing bodies*), in denen andere mRNAs degradiert werden. ZBP-1 hilft der Zelle zu selektieren welche mRNAs

zwischenlagert werden und nach Rückgang der Stressfaktoren sofort wieder zur Verfügung stehen (Stohr et al., 2006).

3.5 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von Befunden, dass SMN in Axonen und Axonterminalen kolokalisiert, dort mit hnRNP-R interagiert und dass SMN Defizienz zu einer Störung der axonalen β -Aktin mRNA Translokation führt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Rolle das hnRNP-R Protein bei diesen Veränderungen spielt. Es konnte gezeigt werden, dass hnRNP-R maßgeblich zur Funktion von SMN bei der axonalen Translokation der β -Aktin mRNA beiträgt. So erscheint hnRNP-R als ein weiteres wichtiges Ziel, das bei der Therapieentwicklung für die SMA eine Rolle spielen könnte. Besondere Bedeutung bekommen unsere Ergebnisse dadurch, dass Mutationen in TDP-43 und FUS, bei Patienten mit sporadischer und familiärer ALS gefunden wurden und dass zumindest TDP-43, das strukturell mit hnRNP-R verwandt ist, als Hauptbestandteil axonaler Einschlüsse bei der ALS identifiziert (Neumann et al., 2006) wurde. Diese Befunde weisen auf eine zentrale Bedeutung von hnRNP-R und verwandten Proteinen bei der Aufrechterhaltung von Axonen hin und Störungen dieser zellulären Wirkung erscheinen nicht nur von zentraler Bedeutung für die Pathogenese der spinalen Muskelatrophie, sondern auch der Amyotrophen Lateralsklerose.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme

- *E. coli* HB101
- *E. coli* JM109
- *E. coli* SURE2
- *E. coli* HD5 α
- *E. coli* DH10B

4.1.2 Versuchstiere

Alle Versuchsmäuse wurden gemäß den geltenden Richtlinien in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus, mit freiem Zugang zu Futter und Wasser, gehalten.

Die Haltung und die Bestimmung der Entwicklungsstadien der Zebrafische wurden nach Protokollen Kimmel et al., (1995) und Westerfield (1995) in Übereinstimmung mit geltenden Richtlinien durchgeführt. Wildtypische Zebrafische des AB/TU Stammes wurden als geschlossene Kolonie über mehrere Generationen gehalten, Zebrafischembryonen wurden bei 28° C herangezogen.

- *Mus musculus Black/6*
- *Mus musculus sv129*
- *Mus musculus CD1*
- *Danio rerio*

4.1.3 Vektoren

- pTARBAC2.1 (BAC Vektor, <http://bacpac.chori.org>)
- pCR4-TOPO (Invitrogen)

4.1.4 Oligonukleotide

Primer für die Amplifikation der Zebrafisch hnRNP-R cDNA (Touch-down PCR, vgl. 5.1.3):

Sense2 5'-CCC GGT CCA CAT TGT CAC GT-3'

Anti1 5'-GGA TGC CGG TCG TCA CCT TCA TC-3'

Verwendete Primer für die Sequenzierung der Zebrafisch hnRNP-R cDNA (vgl. 5.1.3):

| | |
|------------|-----------------------------------|
| SEQ_sense1 | 5'-GGT CTG CCC CAG AAG GTG-3' |
| SEQ_sense2 | 5'-GTT CTG CTG AAG GAG GAA GAG-3' |
| SEQ_sense3 | 5'-CCG AGA GCC TGG ATA ACA T-3' |
| SEQ_anti1 | 5'-CCC GTG CTC CTT TGG CA-3' |
| SEQ_anti2 | 5'-CCT TAG GAC ACT GTC ACC TCA-3' |
| SEQ_anti3 | 5'-GTA TTT AGA CGT CGA GTC CG-3' |

Primer für die Herstellung des Tn5-neo PCR-Produkts (vgl. 5.2.1):

BacMod1 (Sense):

5'-GGCTAATCAGGTGAATGGTAATGCGGTACAGTTAAAAGAAGAGGAAGAAC
TGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGC-3'

BacMod2 (Anti):

5'-CTTGGTTGTCATTATTGTAACCATAGTTACCAGAATAGTCACCACCTTGC
TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG-3'

Sequenzen zur Amplifikation der T5-neo Kasette sind *kursiv* dargestellt.

PCR Screen der modifizierten BAC Klone (vgl. 5.2.1):

Sense in genomischer hnRNP-R Sequenz, upstream von BacMod1:

Primer1: 5'-GCT CCC CAG AAC ACA ACG GCT-3'

Anti in Neokasette:

Neo_anti: 5'-GCC GAT TGT CTG TTG TGC CCA-3'

Sense in Neokasette :

Neo_sense: 5'-TGG GCA CAA CAG ACA ATC GGC-3'

Anti in genomischer hnRNP-R Sequenz, downstream von BacMod2:

Primer2: 5'-TGA CAG AAT CGT TTT CAA GCC CTC A-3'

Primer für die RTq-PCR Analysen von RNA Präparationen kompartimentierter primärer Motoneuron Kulturen (vgl. 5.4.4):

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| LC_bact 2a: | 5'-GCC ACC CGT GAA AAG ATG AC-3' |
| LC_bact 2b: | 5'-GGC GTG AGG GAG AGC ATA G-3' |
| LC_cytb 1a: | 5'-TTT CCT TCA TAC CTC AAA GCA-3' |

LC_cytb 1b: 5'-AAA TGG GTG TTC TAC TGG TTG-3'
LC_cytb 2a: 5'-ACA AAC CTC CTA TCA GCC ATC-3'
LC_cytb 2b: 5'-ATG AAG TGG AAA GCG AAG AAT-3'
LC_S18 1a: 5'-GAC TCA ACA CCG GAA ACC TC-3'
LC_S18 1b: 5'-TAA CCA GAC AAA TCG CTC-3'
LC_S18 2a: 5'-CGA TTG GAT GGT TTA GTG AG-3'
LC_S18 2b: 5'-ACC TTG TTA CGA CTT TTA CTT CC-3'

Primer für die Amplifikation der in den Southern Blot Analysen verwendeten Sonden:

Southern Blot Charakterisierung von Δ hnRNP-R BAC Klonen (vgl. 5.2.2):

Sonde1 (vor Deletion):

SS1: 5'-GCG AAG GGT TTC AGG CGT TTC-3'
SA1: 5'-TGA GAA TGA CCT GAC AGC TGC ATG-3'

Amplikon: 1403 Nukleotide

Sonde2 (nach Deletion):

SS2: 5'- TCT ACA TTC TTC AAA CAA AAT TGG CG-3'
SA2: 5'- TGA AAG AAC ACC AAT CAA TGA AAT GG-3'

Amplikon: 810 Nukleotide

Southern Blot Charakterisierung von elektroporierten Stammzell-klonen (vgl. 5.2.3):

hnRNP-R, HindIII-Fragment von 2819 bp:

Hn2819bh3-sense: 5'-TCT TGA CTC CTG TAA GGC ACC CAA T-3'
Hn2819bh3-anti: 5'-CAC TGA GCA AAA TAC AAG TTT GAT CAC ATT-3'

Amplikon: 576 Nukleotide

IMP1, HindIII-Fragment von 4436 bp:

I1c4436h3-sense: 5'-GGG GGC TAG TTC TTG AAA AGT GCA-3'
I1c4436h3-anti: 5'-GGA TTC CAC TCA TTT TCT GGG GCT-3'

Amplikon: 760 Nukleotide

Morpholino Oligos für die Injektionen der Zebrafisch Embryonen:

Die in dieser Arbeit verwendeten Morpholinos wurden von Gene Tools (Philomath, OR) bezogen.

Standard Kontrollen 5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA ATT TAT A-3'

hnRNP-R 5'-CAC CTC TGC GGC CAT TAC GTG ACA A-3'

hnRNP-R-MM* 5'-CAC **GTC** TCC GGC **GAT** TAC **CTG** AGA A-3'

*Ausgetauschte Basen wurden bei den Mismatch-Kontroll Morpholinos (MM) in Fettschrift markiert.

4.1.5 Medien und Platten

| | |
|--------------------|---|
| LB-Plattenmedium | 10 g Bactotryptone 5 g Bacto-Yeast (Hefe-Extrakt) 10 g NaCl 15 g Agar ad 1 l dH ₂ O, pH auf 7,5 einstellen Autoklavieren, auf 50° C abkühlen lassen, nach Bedarf Antibiotikum zugeben und gießen. |
| LB-Flüssigmedium | analog zum LB-Plattenmedium, jedoch ohne Agar. |
| LB/Amp-Medium | LB-Medium nach dem Autoklavieren auf mindestens 50° C abkühlen lassen und mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzen. |
| LB/Kan-Medium | LB-Medium nach dem Autoklavieren auf mindestens 50° C abkühlen lassen und mit Kanamycin in einer Endkonzentration von 10 µg/ml versetzen. |
| LB/Chloramp-Medium | LB-Medium nach dem Autoklavieren auf mindestens 50° C abkühlen lassen und mit Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 12,5 µg/ml versetzen. |

4.1.6 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen, soweit nicht anders vermerkt: Amersham, Applichem, BD, Calbiochem, Chemicon, Fluka, Gibco, Invitrogen, Merck, R&D, Roche, Roth, Sigma-Aldrich und Qiagen. Weiterhin wurden Enzyme von folgenden Firmen verwendet: Biotherm, Fermentas, Invitrogen, Roche und Sigma.

4.1.7 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen wurden dem Laborhandbuch Sambrook et al. (1989) entnommen oder entsprechend bei kommerziellen Kits den Angaben in den jeweiligen Herstellerprotokollen bzw. den angegebenen Referenzen. Lösungen, die dort nicht angegeben sind oder zur Optimierung verändert wurden sind unter den entsprechenden Protokollen angegeben.

4.1.7.1 Puffer für Alkalische Plasmid-DNA-Minipräparation

GTE-Puffer: 50 mM Glukose
 25 mM Tris/HCl pH 8,0
 10 mM EDTA
 steril filtrieren

Alkalischer Lyse-Puffer: 0,2 M NaOH
 1 % SDS
 vor Gebrauch immer frisch ansetzen.

Acetatlösung: 5 M KAc mit 5 M Eisessig auf pH 4,8 einstellen

4.1.7.2 Puffer für das QIAfilter Plasmid Maxi Kit Protocol

Puffer P1: 50 mM Tris/HCl
 10 mM EDTA
 einstellen auf pH 8,0 und kurz vor Gebrauch
 RNase zugeben (Endkonzentration 100 µg/ml);
 Lagerung bei 4° C

| | |
|------------|---|
| Puffer P2: | 200 mM NaOH 1 % SDS |
| Puffer P3: | 3 M KAc pH 5,5 |
| Puffer QC: | 1 M NaCl 15 % Ethanol 50 mM MOPS 0,15 % TritonX-100 pH auf 7,0 einstellen |
| Puffer QF: | 1,25 M NaCl 15 % Ethanol 50 mM Tris/HCl pH auf 8,5 einstellen |

4.1.7.3 Puffer und Lösungen für Southern Blots

| | |
|--|--|
| Hybridisierungslösung (high stringency): | 50 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{x H}_2\text{O}$ 1 M NaCl 1 % SDS 10x Denhardt 50 % Formamid (deionisiert) 10 % Dextransulfat 100 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige Heringsperma DNA |
| PerfectHyb Plus-Hybridization Buffer | (Sigma, H7033-11) |
| Depurinisierungslösung: | 0,25 N HCl |
| Denaturierungslösung: | 0,5 M NaOH 1,5 M NaCl |

Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris/HCl pH 8,0
1,5 M NaCl

Transferlösung: 20x SSC

Waschpuffer „kalt“: 2x SSC
0,1 % SDS

Waschpuffer „heiß“: 0,2x SSC
0,1 % SDS

Lösungen zur Überprüfung der Einbaurate: 1 M HCl/10 mM NaPPi
3,5 % PCA/100 mM NaPPi

Stripp-Lösung: 0,02x SSC
0,1 % SDS

4.1.7.4 Lösungen und Medien für die Präparation primärer Maus Neurone

| | |
|--|--|
| Poly-DL-Ornithin Hydrobromid (PORN), 100x mit 0,15 M Boratpuffer (pH 8,35) auf 1x verdünnen | Sigma |
| Laminin | Sigma |
| HBSS Medium | PAA |
| Trypsin TRL3 (1% in HBSS) | Worthington |
| Trypsin Inhibitor (1% in HBSS) | Sigma |
| MLR2 (p75 mAB; 1:3000 in 10 mM TrisHCl, pH 9,5) | Robert Rush, Flinders University, Australia |
| Neurobasal Medium | Gibco |
| GlutaMAX I | Gibco |
| B27 Supplement, 50x | Gibco |
| β -Mercaptoethanol, 100 μ M | Sigma |
| Pferdeserum | Linaris |
| BDNF, 10 μ g/ml | Institut für klinische Neurobiologie |
| CNTF, 10 μ g/ml | Institut für klinische Neurobiologie |

| | |
|------------------------|---|
| Depolarisationslösung: | 30 mM KCl 0,8 % NaCl 2 mM CaCl ₂ |
| NB: | Neurobasal Medium 1x GlutaMAX I |
| NB _X : | Neurobasal Medium 1x GlutaMAX I 1x B27 Supplement 2-10 % Pferdeserum 10 nM β-Mercaptoethanol |
| NB _{Full} : | Neurobasal Medium 1x GlutaMAX I 1x B27 Supplement 2-10 % Pferdeserum 10 nM β-Mercaptoethanol 5-20 ng/ml BDNF 5-10 ng/ml CNTF 5-20 ng/ml NGF (nur bei DRGs) |

4.1.7.5 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blots

Trenngellösung (2 kleine Gele):

| Acrylamidkonzentration | 10 % | 12,5 % |
|-------------------------------|-------------|---------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) | 5,0 ml | 6,25 ml |
| 1,88 M Tris pH 8,8 | 3,0 ml | 3,0 ml |
| 0,5 % SDS | 3,0 ml | 3,0 ml |
| dH ₂ O | 4,0 ml | 2,75 ml |
| 10%iges APS | 75 µl | 75 µl |
| TEMED | 12,5 µl | 12,5 µl |

Sammelgellösung (2 kleine Gele):

| | |
|-------------------------------|--------------|
| Acrylamidkonzentration | 2,5 % |
| Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) | 2,0 ml |
| 0,625 M Tris pH 6,8 | 2,4 ml |
| 0,5 % SDS | 2,4 ml |
| dH ₂ O | 5,2 ml |
| 10%iges APS | 70 µl |
| TEMED | 12 µl |

SDS-Laufpuffer (5x):

30 g Tris
144 g Glycin
5 g SDS
ad 1 l dH₂O, pH auf 8,3 einstellen

Lämmli-Probenpuffer (2x):

125 mM Tris pH 6,8
6 % Glycerin
2 % SDS
0,025 % Bromphenolblau
5 % β-Mercaptoethanol
dH₂O

WB-Transferpuffer:

25 mM Tris
150 mM Glycin
10 % Methanol
ad 1 l dH₂O

Blocklösung:

5 % Milchpulver (fettfrei) in 1x TBST lösen
Auf ca. 60° C erwärmen; durch Faltenfilter
filtrieren

TBST (10x):

100 mM Tris
1,5 M NaCl
0,2 % Tween 20
ad 1 l dH₂O, pH 7,6 einstellen

ECL Puffer A: 0,5 ml p-Lumarsäure (40 mM)
0,5 ml Luminol (250 mM)
50 ml Tris/HCl, pH 8,3 (100 mM)

ECL Puffer B: 50 ml Tris/HCl, pH 8,3 (100 mM)
30 µl H₂O₂ (30 %)

4.1.7.6 Lösungen für die Immunhistochemie von Zebrafisch Embryonen

PBDT: 85 ml dH₂O
1 g BSA
0,5 ml Triton X-100
2,5 ml Ziegenserum
10 ml 10x PBS
Ansatz unter rühren lösen lassen und anschließend steril filtrieren. Dann erst DMSO zugeben:
1 ml DMSO
Gesamtansatz 100 ml, Lagerung bei 4° C

1x PBST: 100 ml 10x PBS
5 ml Tween 20 (20 %)
ad 1 l dH₂O, steril filtrieren.

1x PBST + Triton X-100: 100 ml 10x PBS
5 ml Tween 20 (20 %)
2 ml Triton X-100
ad 1 l dH₂O, steril filtrieren.

4.1.7.7 Lösungen für die whole mount *in-situ* Hybridisierung von Zebrafisch Embryonen

| | |
|------------------------|---|
| Färbe-Puffer (SB): | 1 ml NaCl (5M) 2,5 ml MgCl ₂ (1M) 5 ml Tris-Cl (1M), pH 9.5 250 µl Tween 20 (20 %) ad 50 ml dH ₂ O |
| Färbe-Lösung (SS): | 200 µl NBT/BCIP Stock Solution 10 ml Färbe-Puffer (SB) <i>Alternativ:</i> 1 Tablette NBT/BCIP 10 ml Färbe-Puffer (SB) |
| Hybridisierungspuffer: | 250 mg Torula RNA 12,5 ml 20x SSC ad 25 ml dH ₂ O 250 µl Tween 20 (20 %) 150 µl Heparin (50mg/ml) ad 50 ml Formamid |
| 20x SSC (RNase frei): | 175,3 g NaCl 88,2 g NaCitrat ad 1 l dH ₂ O; autoklavieren |
| 2x SSCT: | 5 ml 20x SSC (RNase frei) 250 µl Tween 20 (20 %) ad 50 ml dH ₂ O |
| 2x SSCT/50 % Formamid: | 5 ml 20x SSC (RNase frei) 25 ml Formamid 250 µl Tween 20 (20 %) ad 50 ml dH ₂ O |

0,2x SSCT: 500 µl 20x SSC (RNase frei)
250 µl Tween 20 (20 %)
ad 50 ml dH₂O

10x PBS (RNase frei): 58,44 g NaCl
1,45 g KCl
10,5 g Na₂HPO₃*2 H₂O
1,5 g KH₂PO₄
ad 1 l dH₂O

4.1.7.8 Sonstige Lösungen und Puffer

50x TAE: 242 g Tris
571 ml Essigsäure
100 ml EDTA (0,5 M)
ad 1 l dH₂O

TBE (10x): 108 g Tris Base
55 g Borat
40 ml EDTA (0,5 M)
ad 1 l dH₂O, pH 8,0

2x HEBS: 274 mM NaCl
10 mM KCl
1,4 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O
15 mM Glukose
42 mM HEPES
pH 7,1

6x Stoppuffer: 15 % Ficoll
5 % SDS
0,1 % Bromphenolblau
0,1 % Xylencyanol

| | |
|---------------------------------|---|
| 20x SSC: | 175,3 g NaCl 88,2 g NaCitrat ad 1l dH ₂ O; autoklavieren |
| 4 % PFA-Fixierlösung: | 17,5 ml dH ₂ O 2,0 g Paraformaldehyd auf 60° C erwärmen und unter dem Abzug rühren, mit NaOH (1 M) klären. 20 ml NaHPO ₄ ·H ₂ O mit KHPO ₄ auf pH 7,4 einstellen |
| Blocklösung für Immundetektion: | 1x PBST 1,5 % Pferdeserum 3,0 % Ziegenserum |

4.1.8 Antikörper und Detektionssysteme

Primärantikörper:

| Antikörper | Referenz | Wirtsorganismus | Anwendung | Verdünnung |
|-------------------------|---|---------------------|-----------|------------|
| GFAP | Sigma #G3893, Klon G-A-5, Ascites | Maus, monoklonal | ICC | 1:1000 |
| hnRNP-R 83F | Inst. f. klin. Neurobiologie | Kanninchen | WB | 1:500 |
| hnRNP-R 83 6th | Inst. f. klin. Neurobiologie | Kanninchen | WB | 1:500 |
| hnRNP-R 83 7th | Inst. f. klin. Neurobiologie | Kanninchen | WB | 1:500 |
| hnRNP-R 95 5th | Inst. f. klin. Neurobiologie | Kanninchen | WB | 1:500 |
| hnRNP-R 95 7th | Inst. f. klin. Neurobiologie | Kanninchen | WB | 1:500 |
| Islet1/2 | DSHB, University of Iowa, Klon 39.4D5, Ascites | Maus, monoklonal | IHC | 1:1 |
| P75 | Moses Chao, New York University School of Medicine | Kanninchen | ICC | 1:1000 |
| P75 MLR2 | Robert Rush, Flinders University, Australia. Biosensis #M- 009-100 | Maus, monoklonal | Panning | 1:3000 |
| S-100 | Sigma #S2532, Klon SH-B1 | Maus, monoklonal | ICC | 1:1000 |
| Tau | Zymed/Invitrogen #13-6400 | Maus, monoklonal | ICC | 1:1000 |
| Tau | Sigma #T6402 | Kanninchen | ICC | 1:1000 |
| acetyliertes Tubulin | Sigma #T-6793, Klon 6-11B-1 | Maus, monoklonal | IHC | 1:300 |
| Znp-1 | Trevarrow et al., 1990 | Maus, monoklonal | IHC | 1:100 |

Sekundärantikörper:

| Antikörper | Referenz | Wirts-organismus | Anwendung | Verdünnung |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|------------------|-------------------|
| Cy2-anti-Maus | JacksonImmunoResearch | Ziege | ICC | 1:300 |
| Cy2-anti-Kaninchen | JacksonImmunoResearch | Ziege | ICC | 1:300 |
| Cy3-anti-Maus | JacksonImmunoResearch | Ziege | ICC/IHC | 1:300 |
| Cy3-anti-Kaninchen | JacksonImmunoResearch | Ziege | ICC | 1:300 |
| HRP-anti-Kaninchen | JacksonImmunoResearch | Ziege | WB | 1:5000 |

Kernfarbstoff, Hoechst 33342

Invitrogen, #1399

4.1.9 Kits

Bei den verwendeten kommerziell erhältlichen Kits, wurde immer nach Protokollen des Herstellers verfahren, wenn im Text nicht anders vermerkt.

| | |
|--|--------------------|
| Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit | Applied Biosystems |
| Big Dye Terminator Mix | Applied Biosystems |
| Dye Ex 2.0 Spin Kit | Qiagen |
| LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I | Roche |
| NucleoSpin Plasmid | Machery-Nagel |
| QIAGEN Plasmid Kit | Qiagen |
| QIAquick Gelextraction Kit | Qiagen |
| QIAGEN PCR Purification Kit | Qiagen |
| Quick and Easy BAC Modification Kit | GeneBridges |
| RNase-free DNase Set | Qiagen |
| SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR | Invitrogen |
| TOPO TA Cloning | Invitrogen |
| Vectastain Elite ABC Kit, Mouse IgG | Linaris |

4.1.10 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Computerprogramme eingesetzt:

Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, Aida Image Analyzer, GraphPadPrism, ImageJ, Leica Confocal Software, Leica Microsystems LMD Software und Zeiss AxioVision.

4.1.11 Geräte

| | |
|---|--------------------|
| Binokular, MZ75 mit Kamera DC300 | Leica |
| Bioimaging-Analyzer, BAS-2500 | FujiFilm |
| CCD-Imaging System, LAS-3000 | Fujifilm |
| CHEF-DR III Pulsed Field Electrophoresis System | Bio-Rad |
| Crosslinker, BLX-E254 | Bio-Link |
| DNA Sequenzer, 3130 Genetic Analyzer | Applied Biosystems |
| Eclipse TS100 Zellkulturmikroskop mit DS-L1 System | Nikon |
| Elektroporator 2510 | Eppendorf |
| Fluoreszenz Mikroskop, Axiovert 100 mit AxioCam HRc | Zeiss |
| Konfokales Mikroskop, TCS SP2 | Leica |
| Lightcycler 1.5 | Roche |
| Laser-Mikrodissektions System, LMD 6500 | Leica |
| Nanodrop, ND-1000 | Peqlab |
| Ultrazentrifuge, Optima-L70 | Beckman Coulter |
| Zentrifugen 5424, 5417R, 5810R | Eppendorf |

4.2 Methoden

Teilweise wurden die Methoden aus Glinka (2005) übernommen.

4.2.1 Mikrobiologie

Allgemeine mikrobiologische Methoden, wie die Herstellung transformationskompetenter Zellen oder die Transformation in *E. coli* wurden aus dem Laborhandbuch Sambrook et al. (1989) entnommen, bzw. nach den Vorgaben der verwendeten kommerziellen Kits ausgeführt. Modifizierungen einzelner Protokolle wurden bei der entsprechenden Methode beschrieben.

4.2.1.1 Bakterienplattenkulturen

Mit dieser Methode erhält man vereinzelte Bakterienkolonien. Dazu wird eine Bakteriensuspension mit einem Glasspatel auf einer LB-Platte mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und anschließend bei 37° C inkubiert.

4.2.1.2 Bakterienflüssigkulturen

Minikulturen (2-10 ml Volumen mit Antibiotika, sterile Reagenzröhrchen) wurden angeimpft, indem eine Einzelkolonie von einer Plattenkultur mit einer Pipetten-Spitze übertragen wird. Die Flüssigkulturen wurden auf einem Horizontalschüttler über Nacht bei 37° C inkubiert.

Maxikulturen (>100 ml Volumen mit geeignetem Antibiotika, sterile Erlenmeyerkolben) wurden einigen Tropfen einer Bakterien-Minikultur (Vorkultur) angeimpft und auf einem Horizontalschüttler über Nacht bei 37° C inkubiert.

4.2.1.3 Herstellung eines hnRNP-R Knockout Konstruktes

Für die Generierung eines hnRNP-R Knockout Konstruktes wurde die Strategie der homologen Rekombination in *E. coli* verwendet. Dazu wurde das „*Quick and Easy BAC Modification Kit*“ der Firma Gene Bridges verwendet, welches auf der Red/ET Rekombination (λ -vermittelte Rekombination) basiert.

Zunächst wurde ein BAC Klon, der den genomischen Abschnitt des hnRNP-R Gens enthält mit Hilfe von Datenbank Abfragen identifiziert (RP24-363E15) und beim „BACPAC Resources Center“ ([http:// bacpac.chori.org/](http://bacpac.chori.org/)) bestellt.

Herstellung eines T5n-neo PCR-Produkts

Ein T5n-neo PCR-Produkt welches rechts und links von Homologiearmen flankiert ist und für die Rekombination in *E. coli* benötigt wird, wurde mit Hilfe der PCR hergestellt. Dazu wurden 2 Oligos (BacMod1, BacMod2) entworfen, die jeweils einen homologen Bereich 50 Basenpaare links, bzw. rechts von der gewünschten Deletion (Start-/Stop-Codon des hnRNP-R Gens) enthalten (vgl. Abb. 5.21, A, A'). Am 3'-Ende der Oligos wurden Sequenzen für die Amplifikation der Neo-Kassette angefügt (vgl. Abb. 5.21, B, B'), die durch das Gene Bridges Protokoll vorgegeben waren.

BacMod PCR Ansatz:

- 1,0 µl Tn5-neo PCR-template (tube 2)
- 1,0 µl dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid)
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂
- 2,5 µl Primer, forward (20 mM)
- 2,5 µl Primer, reverse (20 mM)
- 0,2 µl Taq-Polymerase
- ad 50 µl dH₂O

BacMod PCR-Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung des Ansatzes bei 98° C für 1 Minute, gefolgt von:

| | Denaturierung | Annealing | Elongation |
|------------|---------------|-----------|------------|
| Dauer | 10 sek | 30 sek | 90 sek |
| Temperatur | 98° C | 55° C | 72° C |

Zyklen: 30

Finaler Elongationsschritt von 10 Minuten bei 72° C.

Das lineare PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel verifiziert und mittels Gel Extraktion gereinigt. Von einem Glycerol-Stock des hnRNP-R BAC Klons wurde eine LB Platte (15 mg/ml Chloramphenicol) über Nacht bei 37° C inkubiert und mit einer einzelnen Kolonie eine 1,0 ml LB (15 mg/ml Chloramphenicol) Übernachtkultur angeimpft.

Herstellung elektrokompetenter Bakterien (BAC)

Mit 30 μl der Übernachtskultur wurden 1,4 ml frisches LB-Medium (15 mg/ml Chloramphenicol) in einem Mikrozentrifugen Röhrchen angeimpft und für 2,5 h bei 37° C / 1000 Upm inkubiert. Die Zellen wurden für 30 s bei 11000 Upm pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet sofort auf Eis gestellt. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem ddH₂O (alternativ: 10% Glycerol) resuspendiert und erneut zentrifugiert, pelletiert, nach dem Abnehmen des Überstandes im verbliebenen Volumen (20-30 μl) ddH₂O resuspendiert und auf Eis gelagert. 1 μl des Red/ET Expressionsplasmids wurde hinzu pipettiert, gut gemischt und in eine vorgekühlte 1mm Elektroporations-Küvette überführt.

Elektroporieren des Red/ET Expressionsplasmids

Die elektrokompetenten Bakterien wurden bei 1350 V, 10 μF und 600 Ohm (Eppendorf Elektroporator 2510) elektroporiert und mit 1 ml LB Medium, ohne Antibiotika resuspendiert. Anschließend wurden sie für 70 min bei 30° C / 1000 Upm inkubiert.

Ca. 100 μl der elektroporierten Zellen wurden auf einer LB-Platte (3 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin, 15 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol) ausgestrichen und über Nacht bei 30° C im Dunkeln inkubiert.

Mit der auf dieser Platte gewachsenen BAC Klone (Chloramphenicol-Resistenz), die auch das Red/ET Expressionsplasmid (Tetracyclin-Resistenz) tragen wurden erneut LB-Übernachtskulturen (3 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin, 15 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol) angeimpft und elektrokompetente Bakterien gewonnen. Dabei wurden die Bakterien immer bei 30° C inkubiert, da das Red/ET Expressionsplasmid bei höheren Temperaturen verloren geht.

Mit den Übernachtskulturen, der BAC Klone die zusätzlich das Red/ET Expressionsplasmid tragen, wurden am folgenden Tag wiederum 1,4 ml LB Flüssigkulturen (3 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin, 15 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol) angeimpft und für 2 h bei 30° C und 1000 Upm bis OD 600 ~0,3 inkubiert. Dann wurden 50 μl 10 % L-Arabinose zugegeben (0,3 % -0,4 % Endkonzentration) und für 1 h bei 37° C inkubiert. Dadurch wurde die Expression induziert.

Homologe Rekombination in Bakterien

Die induzierten Zellen wurden nun, wiederum elektrokompetent gemacht und mit 1-2 μl (100-200 ng) des linearen T5n-neo PCR Produkt elektroporiert (1350 V, 10 μF , 600 Ohm). Dann wurde 1 ml LB ohne Antibiotika zugegeben und die Zellen für 70 min bei 37° C ohne Schütteln inkubiert. Während diesem Schritt erfolgte die homologe Rekombination in den Bakterien. 100 μl der Kulturen wurden auf einer LB-Platte (15 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin; 15 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol) ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert. Während diesem Schritt

ging das Red/ET-Expressionsplasmid verloren. Von 20 der gewachsenen Kolonien wurden Mini-DNA Präparationen durchgeführt und mittels zwei PCRs auf die richtige Rekombination der Tn5-neo Kasette in den hnRNP-R Lokus getestet (vgl. Abb. 5.22). 6 Klone, die für beide PCRs positiv waren, wurden darüber hinaus mit einem Southern Blot verifiziert (Abb. 5.23).

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Arbeitsprinzipien und Methoden, wie DNA-Gelelektrophorese, -Restriktionsverdau, Ligationen etc., wurden aus dem Laborhandbuch Sambrook et al. (1989) übernommen. Modifizierungen einzelner Protokolle wurden bei der entsprechenden Methode beschrieben.

4.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Plasmide sind in Mikroorganismen natürlich vorkommende extrachromosomale, oft zirkuläre DNA, mit einer Größe von 2 bis 200 kb. Als Standard Plasmide werden Plasmidvektoren bezeichnet, die aus verschiedenen genetischen Elementen wie z.B. Replikationsursprung, Resistenzgen und Polylinker zusammengesetzt sind. Man unterscheidet zwischen *low-copy*-Plasmiden (< 20 Kopien) und *high-copy*-Plasmiden (> 20 Kopien). Die Kopienzahl ist wiederum für die Menge der aus einer Bakterienkultur isolierbaren Plasmide entscheidend.

4.2.2.1.1 Alkalische Plasmid-DNA-Minipräparation

Diese Methode nach Birnbiom und Doly (1979), kann für die analytische Charakterisierung der Plasmid-DNA verwendet werden.

2ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in 100 µl GTE-Puffer durch vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Alkali-SDS-Lösung, wurde durch Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es wurden 150 µl Acetat-Lösung zugegeben und kurz gevortext. Dadurch wurden hochmolekulare Zellbestandteile präzipitiert (genomische DNA, Proteine). Anschließend wurde 5 min auf Eis inkubiert, das Präzipitat 2 x 2 min zentrifugiert und der Überstand in frische Mikrozentrifugen Röhren übertragen. Im Überstand befindet sich die Plasmid-DNA. Zum Fällen der Plasmid-DNA wurden 0,9 ml 100 % Ethanol zugegeben, durch invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die DNA wurde 15 min in der Zentrifuge pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 0,9 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach weiteren 5 min zentrifugieren, wurde der Überstand mit ausgezogener Pipette abgenommen, noch mal

kurz zentrifugiert und der restliche Überstand vollständig abgenommen. Das DNA-Pellet wurde bei RT getrocknet und anschließend in 50 µl TE pH 8,0 bzw. dH₂O gelöst.

4.2.2.1.2 Minipräparation nach dem NucleoSpin Standard Protokoll (Macherey-Nagel)

Diese Methode eignet sich für die anschließende Sequenzierung der Plasmid-DNA.

2 ml einer Übernachtskultur wurden für 30 s bei 11000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, 250 µl Puffer A1 zugegeben und das Pellet durch vortexen resuspendiert. Es sollten keine Zellklumpen übrig bleiben. Nach der Zugabe von 250 µl Puffer A2, wurde vorsichtig 6-8 x invertiert, 300 µl Puffer A3 zugegeben, wiederum durch invertieren gemischt und 5 – 10 min bei 11,000 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin Plasmid Säule geladen, für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 500 µl vorgewärmten Puffer AW (50° C) gewaschen, anschließend mit 600 µl Puffer A4 (mit EtOH) gewaschen und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Zum vollständigen trocknen der Säule wurde 2 min bei 11000 x g zentrifugiert. Die NucleoSpin Plasmid Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Mikrozentrifugen Röhrchen überführt, 50 µl Puffer AE zugeben, 1 min bei RT inkubiert und schließlich 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das Eluat enthält hochreine DNA.

4.2.2.1.3 QIAfilter Plasmid Maxi Kit Protocol (Qiagen)

Dieses Protokoll ermöglicht es bis zu 500µg high- oder low-copy Plasmid-DNA zu gewinnen. Diese Methode ist für Plasmide bis ca. 80 kb geeignet.

Eine über Nacht in Selektionsmedium gewachsene Bakterien Maxi-Kultur (200 ml) wurde auf vier 50 ml Falcon-Röhrchen verteilt und die Bakterien durch zentrifugieren für 15 min bei 6000 x g und 4° C pelletiert. Die Pellets wurden in insgesamt 10 ml Puffer P1 mit RNase A resuspendiert. Es wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben, vorsichtig durch umstürzen gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nun wurden 10 ml gekühlter Puffer P3 zu dem Zell-Lysat gegeben und sofort durch invertieren gemischt. Es sollte sich ein weißlicher Niederschlag bilden, der die genomische DNA, Proteine, Zelldebris und SDS enthält. Das Lysat wurde in den QIAfilter Zylinder gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Danach sollte das Präzipitat oben auf schwimmen. In den Zylinder wurde dann der Kolben eingeführt und das Lysat durch leichten Druck in eine vorbereitete QIAGEN-tip 500 (Säule) filtriert. Dem geklärten Lysat wurde nun erlaubt in die Säule zu fließen, anschließend wurde die Säule mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde in 15 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol sowie anschließendem zentrifugieren für 40 min bei ~8000 x g und 4° C, gefällt.

Das DNA-Pellet wurde in 70% EtOH gewaschen und an der Luft vollständig getrocknet. Schließlich wurde die DNA im gewünschten Volumen dH₂O gelöst.

4.2.2.1.4 Plasmidreinigung im Cäsium-Chlorid Gradienten (BAC)

Zur Reinigung der modifizierten BAC Plasmid DNAs (>80 kb) wurde ein Cäsium-Chlorid (CsCl) Gradient gewählt, da somit hochreine DNA gewonnen werden kann. Die mit dieser Methode gereinigte *supercoiled* DNA wurde mit einem entsprechenden enzymatischen Verdau linearisiert, durch Chloroform-Phenol Extraktion gereinigt und schließlich mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese analysiert. Es wurde ein hochskaliertes Protokoll zur DNA-Mini Präparation des „*BACPAC Resources Center*“ (<http://bacpac.chori.org/home.htm>) durchgeführt und dabei wie folgt vorgegangen:

Von Glycerinstocks der gewünschten BAC-Klone wurde eine LB-Platte (25 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und Übernacht bei 30° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie gepickt und eine 2 ml LB-Vorkultur (25 µg/ml Kanamycin) angeimpft, die wiederum Übernacht bei 30° C inkubiert wurde. Von der Vorkultur wurde eine 200 ml LB-Kultur (25 µg/ml Kanamycin) angeimpft und für 24h bei 30° C inkubiert. Von der Bakterienkultur wurden 2x 50 ml in einem 50 ml Falcon bei 4° C pelletiert (F-34-6-38 Rotor, Eppendorf), und anschließend die DNA-Präparation durchgeführt.

Plasmid-Präparation für den Cäsium-Chlorid Gradienten

Die Bakterienpellets wurden mit jeweils 15 ml Puffer P1 (+ 100µg/ml RNase A) resuspendiert, mit 15 ml Puffer P2 für ca. 5 min bei RT lysiert und mit 15 ml Puffer P3 neutralisiert, wobei sich ein weißes Präzipitat bildet. Das Präzipitat wurde bei 12500 x g für 15 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und auf 2x 50 ml Falcons verteilt. Die DNA wurde mit jeweils 0,8 Volumen Isopropanol gefällt, das Pellet 2x mit 70% EtOH gewaschen, Luftgetrocknet und in 2 ml TE gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mittels Spektralphotometer (Nanodrop, Peqlab) bestimmt.

Ultrazentrifugation im CsCl-Gradienten

Für die folgende Ultrazentrifugation wurden 8,8 g CsCl in insgesamt 8 ml TE/DNA gelöst (50 ml Falcon). Dabei wird das CsCl zunächst in 6 ml TE gelöst und erst im Anschluss bis zu 2 mg DNA/TE-Lösung hinzugeben um auf 8 ml zugegebenes Volumen TE zu kommen. So wurden Scheerkräfte vermieden, die sonst beim lösen des CsCl auf die BAC

Plasmide einwirken. Falls die DNA höher als 1mg/ml konzentriert war, wurde mit TE auf 8 ml aufgefüllt. Es wurden 800 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, vorsichtig vermischt und für 10 min bei 37° C inkubiert. Die Lösung wird für 10 min im *Swingout* Rotor (A-4-81, Eppendorf) bei 3200 x *g* zentrifugiert. Dabei bildete sich ein feines Präzipitat an der Oberfläche. Die Ethidiumbromid/CsCl/DNA-Lösung wurde in Optiseal Polyalomer Röhrrchen (Beckmann) überführt, ohne das Präzipitat zu verschleppen. Die Optiseal Röhrrchen wurden auf 0,00 g tariert und verschlossen. Danach wurde bei 65000 Upm, für mind. 5,5 Stunden bei 20° C in einem *Near-Vertical* Rotor (VTi65.1, Beckmann) ultrazentrifugiert. Dabei ist zu beachten, dass die Bremse der Ultrazentrifuge (Beckmann) auf langsam (*slow*) gestellt wird, um den ausgebildeten Gradienten nicht zu stören. Die Optiseal Röhrrchen wurden sofort nach Beenden des Zentrifugenlaufs an der oberen Schulter mit einer Kanüle zum Belüften eingestochen. Unter Verwendung einer UV-Lampe und einer 2 ml Spritze (22G (0,70x30mm Kanüle) wurde die untere (*supercoiled*) Bande in ein 15 ml Falcon überführt.

Organische Extraktion des Ethidiumbromids

Zur organischen Extraktion des Ethidiumbromids wurde TE gesättigtes n-Butanol von gleichem Volumen wie die *supercoiled* DNA Lösung zugegeben, durch Invertieren gemischt und anschließend für etwa 30 s abgestellt. Das Ethidiumbromid sammelt sich in der oberen Butanol-Phase. Diese wurde abgenommen und der Vorgang 5-6x wiederholt, bis beide Phasen keinerlei Rosafärbung mehr besaßen und vollständig klar waren. Zum entfernen restlichen Butanols wurde gleiches Volumen Diethylether zur wässrigen Phase gegeben, durch invertieren vorsichtig gemischt und die Phasentrennung abgewartet. Nach abnehmen der Diethylether-Phase wurde die wässrige Phase noch etwa 15 min unter einem Abzug offen stehen gelassen, damit Reste des Ethers verdampfen konnten. Die DNA wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert und in sterilem Tris-HCl (pH 8,0) gelöst. Mit diesem Protokoll sind aus einer 200 ml Kultur von *low-copy* BAC Klonen zwischen 150-400 µg reine Plasmid DNA zu erwarten.

4.2.2.2 DNA Präzipitation

Um eine DNA-Lösung von Salzen zu reinigen und um die Konzentration der DNA-Lösung zu erhöhen wurde die DNA selektiv mit 2,5 Volumen EtOH/0,3 M Natriumacetat (pH 5,3) oder 0,8 Volumen Isopropanol gefällt, die DNA durch Zentrifugation pelletiert, 2x mit 70% EtOH gewaschen und nach trocknen des DNA-Pellets im gewünschten Volumen dH₂O bzw. TE gelöst.

4.2.2.3 Chloroform-Phenol Extraktion

Zur Extraktion von DNA aus einem Gemisch von Nukleinsäuren und Protein wurde eine zweiphasige Chloroform-Phenol Extraktion angewendet. Zur DNA-Lösung wurde gleiches Volumen einer 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Mischung (Roti-P/C/I; Roth) gegeben und durch mehrmaliges Invertieren vermischt. Anschließend wurde für 10 min bei 4° C und 10000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNA enthielt, wurde abgenommen ohne die Interphase zu stören. Der Vorgang wurde anschließend 2x mit Chloroform statt Roti-P/C/I auf dieselbe Weise wiederholt und die DNA aus der zuletzt abgenommenen wässrigen Phase mit Ethanol- bzw. Isopropanol präzipitiert.

4.2.2.4 RNA Präparation nach dem RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Es wurde nach dem Protokoll „Animal Cells spin“ des Qiagen Handbuchs verfahren. Die aus den kompartimentierten Neuronkulturen gewonnenen Zellextrakte (RLT-Puffer), wurden bei -80° C eingefroren oder direkt auf QIAshredder Zentrifugen Säulen gegeben und für 1 min bei max. Upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit gleichem Volumen 70% EtOH (RNasefrei) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch auf die RNeasy Spin Säulen gegeben und abzentrifugiert. Die Säulen wurden 1x mit 700µl RW1 Puffer und 2x mit 500 µl RPE Puffer gewaschen. Die Säulen wurden in ein frisches 2ml Mikrozentrifugen Röhrchen überführt und zum trocknen nochmals abzentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wurden 30 µl auf 60° C erwärmtes RNase freies H₂O direkt auf die Säule pipettiert und nach dem Zentrifugieren sofort auf Eis gestellt.

4.2.2.5 RNA Präparation nach dem PicoPure RNA isolation Kit (Arcturus)

Zur Gewinnung von RNA aus den Kompartimenten der Neuronkulturen wurden 100µl Extraktionspuffer (XB) eingesetzt. Das Lysat wurde aufgenommen und für 30 min bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde der Zellextrakt für 2 min bei 3000 x g zentrifugiert und entweder bei -80° C eingefroren oder direkt mit der Isolierung der RNA begonnen.

Die Säulen wurden mit 250µl Konditionierungspuffer (CB) für 5 min bei RT inkubiert und anschließend 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Zu dem Zellextrakt wurden 100µl 70% EtOH gegeben und durch pipettieren gemischt. Die Mischung wurde auf die Säulen gegeben und für 2 min bei 100 x g zentrifugiert gefolgt von 16000 x g für 30 s um den Durchfluss zu entfernen. Es wurde mit 100 µl Waschpuffer 1 (W1) gewaschen (8000 x g). Optional wurde nun ein DNase Verdau direkt auf der Säule vorgenommen. Es wurde 2x mit 100 µl

Waschpuffer 2 (W2) gewaschen (8000 x g, 1 min; 16000 x g, 2 min) und die Säule in ein neues 0,5 ml Mikrozentrifugen Röhrchen überführt. Auf die Säule wurden 10 µl vorgewärmter Elutionspuffer (EB, 65° C) pipettiert, für 1 min bei RT inkubiert und anschließend bei 1000 x g für 1 min zentrifugiert um den Puffer in der Säule zu verteilen. Die RNA wurde dann für 1 min bei 16000 x g eluiert und sofort bei -80° C gelagert.

Der DNase Verdau an die Säulen gebundener RNA wurde ebenfalls nach dem Protokoll von Arcturus durchgeführt. Dazu wurde das „RNase-free DNase Set“ (Qiagen, #79254) verwendet. 5 µl DNase I wurden zu 35 µl RDD Puffer gegeben und durch invertieren gemischt. Diese Mischung wurde auf die Membran der Säulen gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit 40 µl Waschpuffer 1 (W1, PicoPure RNA Kit) gewaschen (15 s; 8000 x g) und das Protokoll für die RNA Isolierung fortgesetzt.

4.2.2.6 Konzentrationsbestimmungen von DNA im Agarosegel

Diese Methode kann zur Abschätzung geringer Mengen DNA (20-200 ng) verwendet werden. Die DNA-Proben wurden auf einem 0,8 %igen Agarosegel neben einer Standardkonzentrationsreihe (z.B. 25, 50 und 100 ng) aufgetragen. Die Bromphenolblau-Bande des Stopp-Puffers sollte bei der anschließenden Elektrophorese (~ 5 min bei 100V) nur ca. 0,5 bis 1 cm ins Gel gelaufen sein. Nach der Ethidiumbromidfärbung wurde die DNA-Konzentration durch Vergleich der Proben-Bandenstärke mit den Bandenstärken der Verdünnungsreihe unter UV-Licht abgeschätzt.

4.2.2.7 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren am Spektralphotometer

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung von größeren Mengen Nukleinsäuren (> 0,25 µg/ml) wird das Absorptionsspektrum zwischen den Wellenlängen 220 und 360 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm und der bei dieser Wellenlänge ermittelte Wert wird deshalb zur rechnerischen Ermittlung der Konzentration herangezogen. Allgemein lässt sich die Konzentration über folgende OD-Werte (Optische Dichte) bestimmen:

| | |
|--------------------------------|----------------|
| 1 OD ₂₆₀ entspricht | 50 µg/ml dsDNA |
| | 40 µg/ml ssDNA |
| | 33 µg/ml ssRNA |

Die Konzentration wird über die Multiplikation der gemessenen OD mit dem Verdünnungsfaktor der Nukleinsäurelösung und den Angaben für 1 OD₂₆₀ berechnet:

$$C = OD_{\text{gemessen}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1 \text{ OD}_{260}$$

Die Konzentration der Messlösung sollte so eingestellt sein, dass die OD₂₆₀-Werte unter 1 liegen. Über den Quotienten OD₂₆₀ / OD₂₈₀ lässt sich die DNA-Reinheit bestimmen. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der Aromatischen Aminosäurereste, bei 280 nm. Der Quotient für reine Lösungen sollte dazu 1,8 für DNA oder 2,0 für RNA sein. Bei mit Proteinen oder Phenol kontaminierten Nukleinsäurelösungen ist der Quotient signifikant kleiner.

4.2.2.8 Southern Blot und Hybridisierung

Mit Hilfe dieser von Edwin Southern entwickelten DNA-Transfer-Methode lassen sich spezifische Basensequenzen in einem Gemisch aus DNA-Sequenzen nachweisen, das Molekulargewicht oder die relative Kopienzahl eines Restriktionsfragments bestimmen. Dabei nutzt man sich die Eigenschaft von positiv geladenen Nylonmembranen einzelsträngige, aber nicht doppelsträngige DNA fest zu binden. Das DNA-Ausgangsmaterial (Genomische oder BAC-DNA) wurde zunächst enzymatisch gespalten und anschließend durch Elektrophorese in einem 1%igen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Um später die Fragmentgrößen leichter bestimmen zu können, wurde das Gel mit einem Lineal als Größenstandard photographiert.

Um den Transfer der DNA-Fragmente aus dem Gel zu ermöglichen wurde das Agarosegel für 20 min in Depurinierungs-Lösung und anschließend für 20 min in Denaturierungs-Lösung inkubiert. Durch die alkalische Denaturierung werden DNA-Einzelstränge erzeugt. Zum Schluss wurde das Gel für 20 min in Neutralisierungs-Lösung inkubiert.

DNA-Transfer durch Kapillar-Blotting

Nun wurden die einzelsträngigen DNA-Fragmente über Nacht auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde ein Flüssigkeitsstrom von Transferlösung (20x SSC) genutzt, der von unten durch das Gel und durch die Nylonmembran (Amersham Hybond-N⁺, GE Healthcare)

in einen Stapel saugfähiges Chromatographiepapier (Hartenstein, GB58) gerichtet war. Dabei ist zu beachten dass keine Luftblasen den Transfer stören.

Am nächsten Tag wurde die Membran bei 37° C getrocknet und anschließend durch UV-Licht fest an die Membran gebunden (BLX-E254 Crosslinker, Bio-Link).

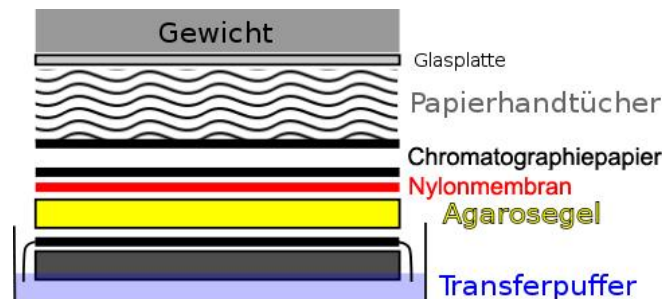


Abb. 4.1: Aufbau eines Kapillar-Blots für den DNA-Transfer auf eine Nylonmembran.

Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

Um die Sonde später nachweisen zu können wurde diese zunächst radioaktiv markiert. Dazu wurde das Amersham *Random Prime Labelling System* (GE Healthcare) mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Hartmann Analytic, SCP205) verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Dabei binden Oligonukleotide als Primer zufällig an die DNA-Sonde (*Random Prime*) und werden in Gegenwart radioaktiver Nukleotide verlängert.

DNA-Hybridisierung

Mit Hilfe der radioaktiv markierten Sonde lassen sich durch Hybridisierung, DNA-Fragmente auf dem Southern Blot detektieren. Dabei finden sich komplementäre Einzelstränge zu Doppelsträngen zusammen. Der Southern Blot wurde zunächst unter leichtem schwenken bei 42° C für mehrere Stunden hybridisiert um unspezifisches Binden der Sonden zu reduzieren. Die markierte Sonde wurde 5 min bei 96° C denaturiert, für 5 min auf Eis rasch abgekühlt und über Nacht in den Hybridisierungsansatz gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 62° C.

Waschen und Exposition des Blots

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran kurz mit Waschpuffer „kalt“ gespült. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 15 min mit Waschpuffer „kalt“ bei RT und zweimal für 15 min mit Waschpuffer „heiß“ bei 68° C gewaschen. Zwischen jedem Waschschrift wurde mit einem Geigerzähler die Rest-Radioaktivität überprüft und evtl. ein weiterer Waschschrift vorgenommen.

Die Membran wurde in Klarsichtfolie eingepackt und mit der DNA-Seite nach unten, entweder auf einen Röntgenfilm oder auf *Imaging plates* (IP) eines *Bioimaging-Analyzer* (BAS-2500, FujiFilm) gelegt. Die Exposition erfolgte in geschlossenen Expositionskassetten bei -80° C, je nach zu erwartender Stärke der Signale für einige Stunden oder über Nacht. Röntgenfilme wurden in einer Dunkelkammer entwickelt, IPs am BASreader ausgelesen.

Quantifizierung der mit dem hnRNP-R Knockout Konstrukt elektroporierten murinen Stammzellen

Die exponierten IPs wurden am BASreader ausgelesen und die Bilder mit der Aida Image Analyzer Software quantifiziert. Dazu wurden ROIs (*region of interest*) mit derselben Fläche um die Banden des hnRNP-R Signals und der genomischen Kontrolle (IMP-1) definiert, sodass die Banden vollständig enthalten waren. In jeder Spur des Blots wurde darüber hinaus eine weitere ROI zwischen die Banden gelegt und als Hintergrund definiert. Es wurden die Pixelintensitäten der ROIs gemessen und das Hintergrund Signal jeweils von den hnRNP-R und IMP-1 Signalen subtrahiert. Anschließend wurde ein Quotient aus den beiden Signalen gebildet:

$$(A/B)^{KO} = (A/B)^{Wt} * 0.5 \quad A = \text{Intensität Zielgen}, B = \text{Intensität genomische Kontrolle}$$

Bei erfolgreicher homologer Rekombination, muss ein Allel des Zielgens (hnRNP-R) deletiert worden sein und somit eine auf die Hälfte reduzierte Intensität im Vergleich zur genomischen Kontrolle (IMP-1) besitzen.

Strippen des Southern Blots

Eine Membran kann mit mehreren Sonden hintereinander hybridisiert werden. Dazu muss die Membran nach jeder Hybridisierung „gestrippt“ werden, wodurch gebundene Sonden wieder abgewaschen werden. Dazu wurde die Membran für 5 min bei 94° C unter leichten Schwenken, mit Stripp-Lösung gewaschen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis keine Radioaktivität mehr messbar war. Anschließend wurde die Membran mit einer neuen Sonde hybridisiert.

4.2.2.9 Elektrophorese

Die Elektrophorese ist die bedeutsamste Methode zur Analyse von Nukleinsäuren.

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgt in einem elektrischen Feld innerhalb eines festen Trägermaterials. Wie auch bei der Proteinauftrennung sind Agarose und Polyacrylamid die am besten geeigneten Materialien. Da Nukleinsäuren im Gegensatz zu Proteinen in einem sehr breiten pH Bereich immer negativ geladen sind, erfolgt die Wanderung in Richtung Anode relativ pH-unabhängig. Ladungsträger sind die negativ geladenen Phosphat-Gruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats. Eine SDS-Behandlung zur Erzeugung einheitlicher Ladungsoberflächen ist bei der Elektrophorese von Nukleinsäuren nicht nötig, da deren Ladungsdichte (Verhältnis Molekulargewicht zu Ladung) immer konstant ist.

Die Elektrophorese erfolgte in Flachbettkammern, die je nach Probenzahl und Trennschärfe ausgewählt wurden. Je länger die Trennstrecke, desto besser wird die Trennschärfe der Fragmentbanden.

4.2.2.9.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein Polymer aus verschiedenen verknüpften Galaktose-Einheiten. Die Effektive Größe der DNA-Fragmente hängt nicht nur von ihrer absoluten Masse ab, sondern im wesentlichen von ihrer Form, dabei unterscheidet man zirkuläre (superhelikale, offene), doppelsträngige lineare und einzelsträngige (denaturierte) DNA. Die Gelelektrophorese linearer DNA-Fragmente führt zu relativ genauen und reproduzierbaren Größenbestimmungen. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearen DNA-Fragmenten ist im Allgemeinen proportional zur angelegten Spannung und von der Agarosekonzentration, der Art des Laufpuffers sowie der Anwesenheit von interkalierenden Farbstoffen abhängig. Durch Variation der Agarosekonzentration zwischen 0,3 bis 3 % kann die Trennung je nach Größe der Fragmente optimiert werden:

| Agarose-Konzentration [%] | Optimaler Auftrennungsbereich linearer, doppelsträngiger DNA-Fragmente (in kb) |
|----------------------------------|---|
| 0,3 | 5-60 |
| 0,6 | 1-20 |
| 0,7 | 0,8-10 |
| 0,9 | 0,5-7 |
| 1,2 | 0,4-6 |
| 1,5 | 0,2-3 |
| 2,0 | 0,1-2 |

Zur Herstellung eines 1 %igen Gels wurden 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE Puffer durch aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60° C wurden 3 µl Ethidiumbromid (10

mg/ml) zugeben werden. Die Lösung wurde zum Aushärten in einen Gelschlitten mit Taschenkamm gegossen, etwaige Luftblasen wurden entfernt. Nach dem Auspolymerisieren des Gels (ca. 20-30 min), wurde es in einer Elektrophorese-Kammer mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm vorsichtig entfernt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Stop-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung betrug 5-10 V pro cm Elektrodenabstand.

4.2.2.9.2 Puls-Feld-Gelelektrophorese

Die Puls-Feld-Gelelektrophorese ist eine Technik um auch große DNA Fragmente trennen zu können. Hochmolekulare Nukleinsäuren besitzen alle dieselbe limitierende Mobilität und können daher mit herkömmlicher Gelelektrophorese nicht mehr aufgetrennt werden. Im Gegensatz zur normalen Agarose-Gelelektrophorese ist das elektrische Feld bei der Puls-Feld-Gelelektrophorese nicht zeitlich homogen, sondern wird kurzzeitig umgepolt. Dadurch reorientieren sich DNA-Fragmente je nach Größe unterschiedlich und wandern verschieden schnell durch die Poren des Agarose-Gels. Zusätzlich kann das elektrische Feld zwischen mehreren Elektrodenpaaren umgeschaltet werden, wodurch ein Feldvektor erzeugt wird, der bewirkt, dass die DNA-Moleküle insgesamt einen längeren Weg im Gel zurücklegen müssen und somit die Auflösung deutlich erhöht wird. Das Agarose-Gel wurde mit PFGE zertifizierter Agarose in 0,5x TBE Puffer ohne Zugabe von Ethidiumbromid gegossen. Nach dem Aushärten wurden die jeweiligen PFGE-Marker (low range PFG Marker #N0350S, mid range PFG Marker #N3551S; New England Biolabs) in die Geltaschen eingegossen und anschließend das Gel in die Elektrophorese-Kammer gelegt. Als Laufpuffer findet 0,5x TBE Puffer Verwendung. Der Puffer wird über einen Kühlkreislauf auf 14° C abgekühlt und nach Beladen des Gels mit den Proben (6x Stop-Ladepuffer) wurde das PFGE-Programm gestartet. Zur Analyse der BAC Klone dieser Arbeit wurde immer ein 1%iges Gel mit folgendem PFGE-Programm benutzt:

| | |
|----------------------|------|
| Block: | 1 |
| Initial Switch Time: | 5 s |
| Final Switch Time: | 21 s |
| Run Time: | 23 h |
| Volts/cm: | 6,0 |
| Included Angle: | 120° |

Nach Beenden des Programms wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert.

4.2.2.10 QIAquick Gel Extraction Protokoll (Qiagen)

Per Elektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente von 70 bp bis 10 kb können mit diesem Protokoll aus dem Gel eluiert werden.

Die gewünschte DNA-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, das Gewicht bestimmt und die dreifache Menge (100 µg ~ 100µl) Puffer QG zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 50° C inkubiert und zwischendurch immer wieder kurz gevortext bis das Gelstück vollständig gelöst war. Es wurden 10 µl 3M NaAc zugeben, die Lösung sollte eine gelbliche Färbung annehmen. Nun wurde ein Gel-Volumen Isopropanol zugegeben und durch umkippen gemischt. Alles wurde auf eine QIAquick Säule übertragen und 1 min (max. Upm) zentrifugiert, wobei die DNA-Fragmente an die Säule gebunden haben. Diese wurde mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und 1 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die Säule erneut 1 min zentrifugiert um das restliche EtOH vollständig zu entfernen. Zum eluieren der DNA wurde 50µl Puffer EB oder dH₂O in die Mitte der Säule pipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 min zentrifugiert, der Durchfluss enthält die gereinigte DNA.

4.2.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Grundsätzlich ermöglicht die PCR eine zyklische Neusynthese von beliebigen Nukleinsäuresequenzen zwischen zwei definierten Oligonukleotiden (Primer) durch exponentielle Amplifikation. Ein typischer PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten, verdeutlicht in der folgenden Temperatur-Zeit-Darstellung aus Lottspeich und Zorbas (1998):

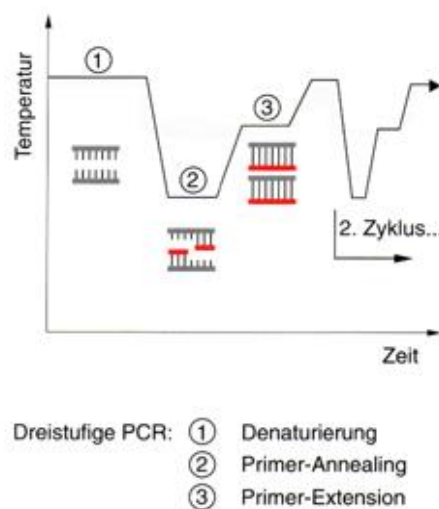


Abb. 4.2: Zyklen einer dreistufigen PCR.

Im ersten Schritt erfolgt die Einzelstrangtrennung durch Temperaturerhöhung. Anschließend muss der Reaktionsansatz auf eine durch den Primer festgelegte Temperatur abgekühlt werden um die Anlagerung (Annealing) des Primers an das Template zu ermöglichen. Der letzte Schritt stellt eine Erneute Temperaturerhöhung auf das Aktivitätsoptimum der verwendeten Polymerase dar, um eine optimale Verlängerung (Extension) des Primers zu ermöglichen. Im Allgemeinen verwendet man die Taq-Polymerase des Mikroorganismus *Thermophilus aquaticus*. Diese ist Hitzestabil und damit besonders gut geeignet. Der für die PCR entscheidende Schritt ist das Annealing, welcher von der Temperatur und der Magnesiumkonzentration beeinflusst wird und die Spezifität der Primeranlagerung bestimmt.

Standardansatz:

- 100-300 ng Template-DNA
- 1,0 µl dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid)
- 5,0 µl 10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl₂
- 2,5 µl Primer, sense (20 mM)
- 2,5 µl Primer, anti (20 mM)
- 0,2 µl Taq-Polymerase
- ad 50 µl dH₂O

Standardtemperaturprofil:

| | Denaturierung | Annealing | Elongation |
|------------|---------------|-----------|------------|
| Dauer | 30 sek | 1 min | 2 min |
| Temperatur | 94° C | 55° C | 72° C |

Zyklenzahl: 30-35

Wobei die Elongationszeit der jeweiligen PCR-Reaktion an die zu erwartende Länge des PCR Produkts mit 1000 Basen pro Minute angepasst und die Annealing Temperatur Primer spezifisch gewählt wurde. Folgende Kriterien wurden beim Primerdesign berücksichtigt, damit diese möglichst sequenzspezifisch binden:

1. mindestens 17 Nukleotide lang
2. ausgeglichener C/G- zu A/T-Gehalt
3. Schmelzpunkt zwischen 57° C bis 63° C
4. Schmelzpunkt für beide Primer differiert maximal um 1° C
5. ΔG sollte einen Wert zwischen -2 bis +2 kcal/mol besitzen
6. keine Haarnadelbildung
7. keine Dimer-Bildung: weder mit sich selbst, noch mit dem 2. Primer

Zum Design der in dieser Arbeit verwendeten Primer wurde das Computer Programm „Oligo“ in der Version 3.4 bzw. 6.0 verwendet. Primer die zum Amplifizieren genomischer Sequenzen oder von mRNAs (cDNA) benutzt wurden sind zudem mittels BLAST auf eventuelle unerwünschte Homologien geprüft worden, die zu unerwünschten Amplifikaten führen würden.

4.2.2.11.1 Linker-PCR

Ein Spezialfall der PCR ist die Linker-PCR. Sie dient zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen an ein DNA-Fragment. Die Methode ist mit der *In-vitro*-Mutagenese verwandt. Es wurde eine Nukleotid-Sequenz an das 5'-Ende der Primer gehängt, die eine Restriktionsschnittstelle für eine spätere Klonierung bietet. Ein besonderes Merkmal dieser Technik ist, dass das Programm häufig aus zwei Phasen besteht. In der ersten Phase erfolgt das Annealing mit der Schmelztemperatur des Primerabschnitts, der komplementär zum Fragmentende ist, in der zweiten Phase dann mit der Schmelztemperatur des ganzen Primers inklusive der angehängten Schnittstelle.

Temperaturprogramm „Linker“:

| | Denaturierung | Annealing | Elongation |
|------------|---------------|-----------|------------|
| Dauer | 30 sec | 1 min | 2 min |
| Temperatur | 94° C | 50° C | 72° C |

Zyklen: 1-5

| | | | |
|------------|--------|-------|-------|
| Dauer | 30 sec | 1 min | 2 min |
| Temperatur | 94° C | 70° C | 72° C |

Zyklen: 6-30

4.2.2.11.2 Touchdown-PCR

Die Touchdown-PCR ist eine Methode um die Amplifizierung unspezifischer Sequenzen zu vermeiden. Dabei wird der erste Zyklus einer PCR mit einer höheren als der optimalen Annealingtemperatur der Primer durchgeführt und Schrittweise in folgenden Zyklen bis zum Optimum gesenkt. Die Annealingtemperatur bestimmt die Spezifität der Bindung. Daher werden in den ersten Zyklen keine/kaum unspezifische Sequenzen gebunden und amplifiziert, während die gewünschte Zielsequenz nach den ersten Zyklen in größerer Kopienzahl zur Verfügung steht. Es folgen weitere Zyklen bei der optimalen Annealingtemperatur.

Temperaturprogramm „Touchdown“:

| | Denaturierung | Annealing | Elongation |
|--------------|---------------|------------------|------------|
| Dauer | 30 sec | 1 min | 2 min |
| Temperatur | 94° C | (67° C – Zyklus) | 72° C |
| Zyklen 1-6 | | | |
| Dauer | 30 sec | 1 min | 2 min |
| Temperatur | 94° C | 60° C | 72° C |
| Zyklen: 7-36 | | | |

4.2.2.11.3 SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System (Invitrogen)

Eine weitere Modifikation der PCR ist die RT-PCR, die aus zwei aufeinander folgenden Schritten besteht, der Reversen Transkription und der DNA Amplifikation durch eine PCR.

Als Ausgangsmaterial findet RNA Verwendung. Die RNA kann von der Polymerase jedoch nicht direkt amplifiziert werden und muss daher durch das Enzym Reverse Transkriptase zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dafür benötigt die Reverse Transkriptase Oligo-dT-Primer die zum PolyA-Schwanz der eukaryotischen mRNA komplementär sind. Es können auch zufällige Hexamere (N6) als Primer benutzt werden, oder spezifische Primer um ein bestimmtes Transkript zu isolieren. Diese Primer dienen der Reversen Transkriptase als Ansatzpunkt zum synthetisieren eines zur RNA-Matrize komplementären DNA-Strangs.

Zunächst wird der RNA-Ansatz zusammen pipettiert:

<5µg RNA
1 µl dNTP-Mix (10mM)
1 µl Oligo(dT) (0,5 µg/µl)
ad 10 µl DEPC behandeltes dH₂O

Der Ansatz wurde für 5 min bei 65° C denaturiert und anschließend für mindestens 1 min auf Eis gestellt. Dann wurde ein Mastermix pipettiert (Menge pro RNA-Ansatz):

2 µl 10x RT-Puffer
4 µl MgCl₂ (25mM)
2 µl DTT (0,1 M)
1 µl RNaseOUT *Recombinant RNase Inhibitor*

Der Mastermix wurde zum Mischen kurz gevortext und zentrifugiert. Anschließend wurden 9 µl des Mastermix zum RNA-Ansatz gegeben, kurz gemischt und dann für 2 min bei 42° C inkubiert. In dieser Phase erfolgt das Annealing der Oligo-dT-/N6-Primer an die (m)RNA.

Für die cDNA-Synthese wurde nun zu jedem Reaktionsansatz 1 µl (50 Units) der *SuperScript III RT* hinzu pipettiert, vorsichtig gemischt und für 2 h bei 37° C inkubiert. Durch Erhitzen auf 70° C für 15 min wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt. Der verbleibende RNA-Strang des RNA:DNA Hybrids wurde mit 1 µl *SuperScript II RNase H* für 20 min bei 37° C verdaut.

4.2.2.11.4 Quantitative Echtzeit-PCR im LightCycler

Die quantitative Echtzeit-PCR (RTq-PCR) basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht aber eine Quantifizierung der synthetisierten Nucleinsäuren in Echtzeit. Hierzu werden Fluoreszenz-Messungen in jedem PCR-Zyklus vorgenommen. Da die Fluoreszenz proportional zur Menge der Amplifikate zunimmt, lässt sich somit die Menge der neu synthetisierten PCR-Produkte direkt bestimmen. Die Reaktionen laufen in Glaskapillaren ab, die neben der Fluoreszenz-Messung auch schnellere Heiz- und Abkühlzyklen erlauben. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten SYBR Green I (Roche) handelt es sich um einen Cyanin-Farbstoff, der in doppelsträngige DNA Moleküle interkaliert. Bei den RTq-PCR Analysen von RNA Präparationen kompartimentierter Motoneuron Kulturen (vgl. 5.4.4) wurde nach dem Protokoll des „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I“ Kits verfahren.

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| RTq-PCR Ansatz (1x): | 14-15 µl H ₂ O |
| | 1,6 µl (3mM) MgCl ₂ |
| | 3 µl Primer A (0,2 mM) |
| | 3 µl Primer B (0,2 mM) |
| | 2 µl FastStart Mix |
| | 1-2 µl Template cDNA (RT-Reaktion) |

RTq-PCR 4-Zyklen Program:

| Segment | Temperatur[° C] | Dauer[s] | Slope[° C/s] | Aufnahmemodus | Zyklen |
|----------------|-----------------|----------|--------------|---------------|--------|
| Denaturierung: | | | | | 1 |
| 1 | 95 | 600 | 20 | | |
| Amplifikation: | | | | | 50 |
| 1 | 95 | 10 | 20 | | |
| 2 | 55 | 10 | 20 | | |
| 3 | 72 | 5 | 20 | | |
| 4 | 86 | 5 | 20 | single | |
| Schmelzkurve: | | | | | 1 |
| 1 | 95 | 0 | 20 | | |
| 2 | 60 | 15 | 20 | | |
| 3 | 95 | 0 | 0,1 | continous | |
| Abkühlen: | | | | | 1 |
| 1 | 40 | 0 | 20 | | |

4.2.2.11.5 Sequenzierung

Das für die Sequenzierungen in diese Arbeit verwendete Prinzip des „*Cycle Sequencing*“ beruht auf der Didesoxynukleotid-Strangabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Als Terminatoren werden hierbei unterschiedlich fluoreszierende Didesoxynukleotide verwendet, wodurch es möglich ist nur einen Ansatz für die Sequenzierungsreaktion zu verwenden. Die Analyse erfolgt nicht mittels Autoradiogramm, sondern in einem Sequenzer (ABI 3130 oder ABI 373, beide Applied Biosystems) der die Fluoreszenz misst. Das *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) enthält fluoreszenz markierte Terminatoren, Desoxyribonukleotidtriphosphate, Enzym und Magnesiumchlorid.

Sequenzierungsansatz:

- 1,0 µg DNA
- 2,0 µl BD Mix
- 2,0 µl Half BD (Sigma)
- 0,5 µl Primer (10 pmol)

Temperaturprofil SEQ 50:

| Zyklusschritt | Denaturierung | Annealing | Elongation |
|---------------|---------------|-----------|------------|
| Dauer | 30 sec | 15 sec | 4 min |
| Temperatur | 96° C | 50° C | 60° C |

Zahl der Zyklen: 30

Wobei die Annealingzeit den verwendeten Sequenzierungsprimern angepasst wurde.

4.2.2.12 DyeEx 2.0 Spin Protocol for Dye-Terminator Removal (Qiagen)

Das Sequenzierungsprodukt wurde zum reinigen auf eine DyeEx 2.0 Spin column gegeben und gevortext, der Schraubverschluss eine viertel Umdrehung gelöst, der Bodenverschluss entfernt und nach einsetzen der Säule in ein Sammelgefäß zentrifugiert. Die Säule wird dann in ein neues Mikrozentrifugen Gefäß überführt und 10-20 µl des Sequenzierungsansatzes vorsichtig in die Mitte der Säule pipettiert. Nach erneutem zentrifugieren wird der Durchfluss in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und schließlich nach den Angaben des DNA-Sequenzier-Protokolls weiterbehandelt.

4.2.2.13 QIAquick PCR Purification Protocol (Qiagen)

Dieses Protokoll ist für die Reinigung von einzel- und doppelstrang DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen optimiert.

Zunächst wurde das 5-fache Volumen Puffer PB zur PCR-Probe gegeben und gemischt. Dann wurde der Ansatz auf eine QIAquick Säule geladen und abzentrifugiert. Die Säule wurde im Anschluss mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde noch einmal zentrifugiert, um das restliche EtOH zu entfernen. Die Säule wurde in ein frisches Mikrozentrifugen Röhrchen übertragen und die gereinigte DNA mit 50 µl Puffer EB (10mM Tris·Cl, pH 8,5) oder dH₂O eluiert.

4.2.3 Proteinchemische Methoden

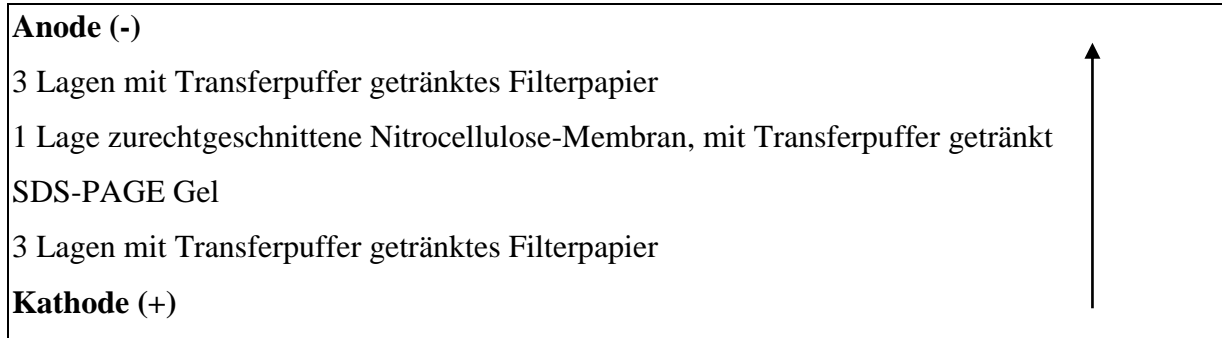
4.2.3.1 SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur denaturierenden, diskontinuierlichen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dabei werden die zu trennenden Proteine mit dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) und reduzierenden Agentien wie β-Mercaptoethanol (im Probenpuffer) denaturiert. Im idealen Trennbereich der Elektrophorese besteht eine indirekte Proportionalität zwischen der Laufweite und dem Logarithmus des Molekulargewichtes. Die diskontinuierliche PAGE besteht aus zwei Phasen, dem niedrig konzentrierten Sammelgel und dem höher konzentrierten Trenngel. Die Länge und der Vernetzungsgrad der Acrylamidmoleküle bestimmen den Grad der Molekülauftrennung. Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen werden Lösungen der Monomere Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (Quervernetzer) im Verhältnis 29:1 in Gegenwart des Katalysators TEMED und mit Ammoniumpersulfat (APS) als Starter polymerisiert.

Zwei mit Ethanol gesäuberte Glasplatten wurden mit Spacern und Metallklammern zu einer Gelkammer zusammengesetzt. Die frisch angesetzte Trenngellösung wurde zwischen die beiden Glasplatten, bis ca. 1,5 cm unter den Rand gegossen und vorsichtig mit Butanol überschichtet. Die Polymerisationszeit beträgt etwa 15 min. Nach entfernen des Butanols wurde vorsichtig mit H₂O gespült, die Sammelgellösung bis zum Rand gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Diese wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Die Proben wurden jeweils mit 2x Lämmli-Laufpuffer versetzt und für 5 min bei 99° C erhitzt. Aufgrund des SDS Überschuss im Puffer werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der H-Brücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch das ebenfalls im Puffer befindliche reduzierende β -Mercaptoethanol gespalten. Die Geltaschen wurden beladen und die Apparatur bei 35 mA/Gel laufen gelassen. Die Elektrophorese ist beendet, wenn die Bromphenolblaufront das Gel verlässt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde entweder direkt für einen Western Blot weiter verwendet, oder mit Coomassie-Blau gefärbt, wobei es für circa 30 min unter leichtem Schwenken in der Färbelösung inkubiert wurde. Danach wurde es für mehrere Stunden oder über Nacht in Entfärberlösung gelegt, die mehrfach gewechselt wurde. Zur Aufbewahrung wurde das Gel für mindestens 30 min in 30%igem Methanol dehydriert, in Cellophan-Folie eingespannt und Luftgetrocknet.

4.2.3.2 Western Blot

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus der Polyacrylamidmatrix (Trenngel, SDS-PAGE) auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren und zu immobilisieren, wurde das Western-Blotting angewendet. Der elektrophoretische Transfer erfolgte durch das *Semidry-Verfahren* in einer Fastblotkammer. Das Gel, die Nitrocellulosemembran und einige Lagen Whatman-Filterpapier wurden zwischen zwei Plattenelektroden geschichtet wobei das Whatmanpapier und die Membran mit Transferpuffer getränkt waren. Es ist auf die richtige Reihenfolge zu Achten:



Es empfiehlt sich den Stapel auf der Kathode von unten nach oben zu schichten. Eventuell entstehende Luftblasen lassen sich durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab o.ä. entfernen. Für ein kleines Gel wurden 75 mA eingestellt bei einer Laufzeit von 1,5-2 h.

4.2.3.3 ECL-Nachweis (*Enhanced Chemiluminescence*)

Um an eine Nitrocellulosemembran gebundene Antigene durch Chemilumineszenz sichtbar zu machen, wurde diese hochempfindliche Methode verwendet.

Es wurden zunächst 2,5 g Milchpulver in 50 ml 1x TBST gelöst. Die Lösung wurde kurz erhitzt und warm abfiltriert. Die Membran wurde in der 5 %-Milchpulverlösung bei 4° C über Nacht geblockt wodurch unspezifische Bindungsstellen der Membran gesättigt und somit das Signal/Hintergrund Verhältnis optimiert wurde. Der primäre Antikörper wurde in der Blocklösung entsprechend verdünnt und für 1,5 h unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3 x mit TBST gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper (HRP-konjugiert, 1:5000 in TBST) ebenfalls unter leichtem Schwenken für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wurden die zwei ECL-Detektionsreagenzien (A + B) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Nitrocellulosemembran damit für 1 min überschichtet. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase katalysiert hierbei eine Chemilumineszenz erzeugende Reaktion. Energiereiches cyclisches Luminol wird unter alkalischen Bedingungen oxidiert, wobei Energie in Form von Licht frei wird. Die maximale Lichtemission wird nach 5-10 min produziert und nimmt dann mit einer Halbwertszeit von 60 min wieder ab. Die Wellenlänge des emittierten Lichts liegt bei 428 nm welches mit einem LAS-3000 System (Fujifilm) detektiert wurde. Je nach Signalstärke variiert die Expositionsdauer von wenigen Sekunden bis zu 30 Minuten. Die Signalstärke ist von der Proteinmenge, der Qualität des primären Antikörpers und der Frische der ECL-Reagenzien abhängig.

4.2.4 Methoden in der Zellkultur

4.2.4.1 Polyornithin-Beschichtung

10 mm Deckgläschen wurden durch kurzes eintauchen in EtOH sterilisiert und noch feucht abgeflammt. 4-Well (Nunc) wurden mit 4 sterilen Deckgläschen bestückt. Pro Well wurden 80 µl 1x poly-D,L-Ornithin Hydrobromid (PORN) hinzu gegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3x mit reichlich dH₂O gewaschen und die Deckgläschen unter der Sterilwerkbank getrocknet. Mit 30 mm Deckgläschen wurde analog verfahren, jedoch wurden sie in 35 mm „*Easy Grip Tissue Culture Dishes*“ (353001, Falcon) zum beschichten gelegt. Teilweise wurden Neuronale Zellen in 35 mm Plastischalen (353001, Falcon), ohne Deckgläschen kultiviert. Hierbei wurden die Kulturschalen direkt mit PORN beschichtet. Eine Lagerung der PORN beschichteten Kulturgefäße ist nach dem trocknen und bei 4° C für max. 7 Tage möglich.

4.2.4.2 Primäre Motoneuronkulturen

Für primäre Motoneuronkulturen (Wiese et al., 2010) wurden Embryonen vom Embryonaltag E13 verwendet. Der Tag nach der Paarung wurde als Tag 1 der Embryonalentwicklung festgelegt, wenn ein Vaginalpfropf erkennbar war (*Plug-Positiv*).

Es können Einzelembryonen-Präparationen oder gesammelte Embryonen-Präparationen (gEP) gemacht werden. Im ersten Fall wird bei heterogenen Mauslinien der Genotyp jedes einzelnen Embryos bestimmt. Dazu sind Gewebeproben des Kopfes zu sammeln und für die Genotypisierung per z.B. PCR auf zu bereiten. Vor Beginn der Präparation wurden folgende Vorbereitungen getroffen:

- Alle Medien (HBSS, NB, NB_X, NB_{Full}) und benötigten Lösungen sind vor Beginn der Präparation anzusetzen und gegebenenfalls warm zu stellen.
- Panningplatte:

Für Einzelembryonen-Präparation, 24-Well Platte mit 400 µl/Well mAB p75 (MLR2; 1:3000) in 10 mM Tris, pH 9,5 beschichten. Für 2 h bei RT inkubieren und anschließend 2x mit HBSS Medium waschen. Medium zwischen den Waschsritten nicht vollständig abziehen, um austrocknen zu vermeiden! Zuletzt 1x mit NB_X Medium waschen und ca. 600 µl in der Schale lassen.

Für gesammelte Embryonen-Präparationen, 10 cm Nunclon Δsurface Schalen (Nunc) mit 10 ml, mAB p75 (1:3000) in Tris 10 mM, pH 9,5 beschichten. Für 2 h bei RT inkubieren und anschließend 2x mit HBSS Medium waschen. Medium zwischen den

Waschschritten nicht vollständig abziehen, um austrocknen zu vermeiden! Zuletzt 1x mit NB_X Medium waschen und ca. 10 ml in der Schale lassen.

- PORN beschichtete Kulturgefäße mit murinen Laminin (2,5 µg / ml, 1:400 aus 1 mg / ml Stock in HBSS verdünnt) für mind. 1h bei RT beschichten. Anschließend 2x mit HBSS, 1x mit NB_X Medium waschen. Nicht trocken fallen lassen.

Zur Embryonenentnahme wurde das trächtige Muttertier durch zervikale Dislokation getötet. Der Bauchraum geöffnet, der *Uterus bicornis* entnommen und in eine 10 cm Petrischale mit HBSS gelegt.

Zur Rückenmarkspräparation wurden die Embryonen zunächst aus den Fruchtblasen entnommen und in eine 3,5 cm Petrischale mit HBSS überführt. Für eine evtl. Genotypisierung (Einzelembryonen-Präparation) wurde der Kopf abgetrennt und in Lysis-Puffer überführt. Der restliche Rumpf wurde auf den Bauch gelegt, der Schwanz entfernt und das Rückenmark zwischen den Extremitäten durchtrennt. Anschließend wurde die Haut über dem Rückenmark abgezogen, das Rückenmark durch zwei schräge seitliche Schnitte frei präpariert und in eine neue Petrischale mit HBSS gelegt. Die Rückenmärker wurden von Meningen und Spinalganglien befreit und in ein vorbereitetes Mikrozentrifugen Röhrchen mit 180µl HBSS überführt. Zur Trypsinisierung wurden 20 µl Trypsin in HBSS (EK: 0,1%) zu jedem Rückenmark gegeben und für 15 min bei 37° C inkubiert. Um den enzymatischen Verdau zu stoppen wurden jeweils 20µl Trypsininhibitor zugegeben. Das trypsinisierte Gewebe wurde sehr vorsichtig 5-6x trituriert. Luftblasen und zu schnelles Triturieren sind dabei unbedingt zu vermeiden! Bei Einzelembryonen-Präparationen wurden 800 µl NB Medium zugegeben und die Zellsuspension auf die vorbereitete Panningplatten (24-Well) gegeben. Bei gesammelten Embryonen-Präparationen wurden die Zellsuspensionen direkt auf eine gemeinsame Panningplatte (8-12 Embryonen pro 10 cm Platte) gegeben. Während einer Inkubationszeit von 30 min, wurden Vibrationen und Erschütterungen jeglicher Art vermieden. Danach wurde 2-3x mit NB-Medium gewaschen um nicht gebundene Zellen zu entfernen. Um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurde im letzten Waschschritt etwas NB-Medium in der Panningplatte belassen. Nun wurden 200 µl (3ml, gEP) Depolarisationslösung hinzu pipettiert und 30 s gewartet, bevor 500 µl (7 ml, gEP) vorgewärmtes NB_X-Medium hinzu gegeben wurden. Dann wurde vorsichtig 5x auf- und abpipettiert und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt. Die Suspension wurde für 5 min bei 400 g zentrifugiert (langsames beschleunigen und bremsen), der Überstand wird bis auf ca. 200 µl abgesaugt und das Zellpellet in 1,8 ml NB_X resuspendiert.

Nach dem bestimmen der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurden die Motoneurone in gewünschten Zelldichten ausplattiert (Verdünnen in NB_X) und für 30 min bei 37° C + 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem die Zellen attachiert waren, wurden sie mit NB_{Full} Medium gefüttert. Neurotrophe Faktoren (BDNF, CNTF) wurden bei Standard-Kulturen in einer Konzentration von 5 ng/ml eingesetzt. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte nach einem Tag, danach alle 2 Tage.

4.2.4.3 Kulturen primärer Neuronen aus den Dorsalen Wurzelganglien

Zunächst wurde wie unter Abschnitt 4.2.4.2 beschrieben das lumbale Rückenmark von E13 Mausembryonen präpariert. Die dorsalen Wurzelganglien (Spinalganglien) wurden von der Meningen Haut abgezupft und in 180 µl HBSS gesammelt. Anschließend wurde 20µl Trypsin (Endkonzentration: 0,1 %) zugegeben und bei 37° C für 20 min inkubiert. Der enzymatische Verdau wurde mit 20µl Trypsininhibitor gestoppt und die Zellsuspension mehrmals trituriert um die Zellen zu vereinzeln. Die Zellsuspensionen der einzelnen Embryonenpräparationen wurden in einem 15 ml Falcon gesammelt in dem 9,5 ml NB_X Medium vorgelegt waren. Die gesamte Zellsuspension wurde auf eine 10 cm Nunclon Δ surface Schale (Nunc) gegeben und für 3 h bei 37° C im Inkubator gelagert. Der Überstand enthält die sensorischen Neurone der dorsalen Wurzelganglien und wurde vorsichtig abgenommen. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 400 g und RT. Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl abgenommen und das Zellpellet darin vollständig durch vorsichtiges tritrieren resuspendiert. Dem NB_{Full} Medium (10 % Pferdeserum) wurde als neurotropher Faktor ausschließlich NGF (5-20 ng/ml) zugegeben.

4.2.4.4 Kompartimentierte Kulturen primärer Neurone (Xona)

Die „SD150 *neuron devices*“ der Firma „Xona Microfluidics“ sind Silikon-Elemente (PDMS) die auf eine für die Kultivierung von Neuronen des zentralen Nervensystems geeignete Matrix gelegt werden können. Die Xona-Elemente wurden direkt nach jedem Gebrauch im Ultraschallbad für 15 min gereinigt, gründlich mit dH₂O gespült, Luftgetrocknet und an einem trockenen dunklen Ort gelagert. Als Matrix wurden 35 mm Kulturschälchen (353001, Falcon) zunächst übernacht bei 4° C mit PORN beschichtet. Danach wurden die Schälchen 3x mit sterilem dH₂O gewaschen und anschließend unter der Sterilwerkbank getrocknet. Währenddessen wurde die Unterseite der trocknen Xona-Elemente mit einem Streifen Tesafilm abgezogen um evtl. anhaftenden Zelldebris und Staub zu entfernen. Dann wurden sie für 20 min in 70 % EtOH gelegt und anschließend unter der Sterilwerkbank für ca. 1 h getrocknet.

Die sterilen und trockenen Xona-Elemente wurden nun mittig auf die trockenen PORN beschichteten Falcon Schälchen gelegt und vorsichtig von der Mitte nach Außen festgedrückt. Es ist auf die Orientierung zu achten, die Unterseite besitzt die offenen Haupt- und Mikrokanäle! Wichtig ist dass sowohl die Xona-Elemente, als auch die Kulturschalen trocken sind, da ansonsten das Silikon nicht ausreichend abdichtet. Daher sind auch Temperaturschwankungen weitestgehend zu vermeiden!

Das obere Reservoir eines Kompartiments wurde nun mit 180µl Laminin geflutet (2,5 µg/ml, 1:400 aus 1 mg/ml Stock in HBSS verdünnt) und abgewartet bis das Laminin durch den Hauptkanal in das untere Reservoir des Kompartiments geflossen ist. Erst jetzt wurde auch das untere Reservoir mit 150 µl Laminin geflutet. Dadurch werden Luftblasen in den Hauptkanälen vermieden. Damit das Laminin auch durch die Mikrokanäle fließen kann wurde etwa 20 min gewartet. Unter Phasenkontrast wurde kontrolliert ob die Mikrokanäle vollständig mit Laminin gefüllt waren. Erst dann wurde das gegenüberliegende Kompartiment wiederum von oben nach unten mit 2x 150 µl Laminin geflutet. Dadurch werden Lufteinschlüsse in den Mikrokanälen verhindert. Die Xona-Elemente wurden nun über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und dabei auf sterile Bedingungen geachtet (unter der Sterilwerkbank, Parafilm). Unmittelbar vor Beginn der Neuronen-Präparation wurden die Xona-Elemente 2x mit NB_x Medium gewaschen. Dabei wurde wie beim der Laminin-Beschichtung vorgegangen. Um das Einbringen von Luftblasen zu verhindern und ein austrocknen des Laminins zu verhindern wird die Flüssigkeit nie vollständig abgenommen, sodass immer ein Rest in den Reservoiren und den Hauptkanälen verblieb.

Während der Präparation der Zellen kann sich das Volumen von oberen und unteren Reservoir eines Kompartiments angleichen, zeitgleich wird durch das kleinere Volumen Medium in einem Kompartiment Laminin aus den Mikrokanälen gedrückt. Die präparierten primären Neuronen wurden nach der letzten Zentrifugation in einem möglichst kleinen Volumen Kulturmedium resuspendiert (~50-100 µl) und unter einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. 5-10µl der Zellsuspension wurden im oberen Reservoir eines Kompartiments direkt an die Öffnung des Hauptkanals pipettiert. Durch den Volumenunterschied von oberen zum unteren Reservoir entsteht eine Ausgleichströmung die die Zellen in den Hauptkanal zieht. Dieser Vorgang wurde im Phasenkontrast kontrolliert und bei Bedarf die Strömung verringert oder ganz gestoppt, indem 3-7µl Medium in das untere Reservoir gegeben wurden. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis der Hauptkanal des Kompartiments die gewünschte Zelldichte aufwies. Anschließend wurden die kompartimentierten Kulturen für 30 min bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert, damit die Zellen

attachieren konnten. Das Füttern der Kulturen wurde analog zum Beschichten, bzw. Waschen durchgeführt. Neurotrophe Faktoren (BDNF, CNTF, NGF) wurden, wenn nicht anders Vermerkt, immer in beiden Kompartimenten mit einer Konzentration von 5 ng/ml eingesetzt, Cytosine- β -D-arabinosefuranosid (Ara-C) mit 10 μ M. Sollte ein Gradient aufgebaut werden, wurde ein Kompartiment mit ~100 μ l mehr Medium inkl. der verwendeten neurotrophen Faktoren befüllt, wobei sich der Gradient immer vom großen zum kleinen Volumen ausbildete. Bei Kulturen mit einem Gradienten für einen neurotrophen Faktor, betrug die Konzentration im Kompartiment mit dem größeren Volumen 20 ng/ml (BDNF, NGF), wenn nicht anders Vermerkt.

Zur Gewinnung von RNA aus den jeweiligen Kompartimenten wurden die Zellen zunächst 1x mit vorgewärmten (37° C), sterilen und RNase freien PBS gespült. Das Volumen wurde soweit wie möglich reduziert und sofort 100 μ l Lysis-Puffer (Trizol + β -Mercaptoethanol oder nach Herstellerangaben wenn ein kommerzielles Kit verwendet wurde) in das obere Reservoir eines Kompartiments gegeben. Durch den Volumenunterschied zwischen den Reservoiren entstand eine Strömung die ausreichend war um das Zell-Lysat mit zu reißen. Das Lysat konnte im unteren Reservoir abgenommen werden.

4.2.4.5 Virale Infektion von Zellen

Die neuronalen Zellen wurden nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Präparation in wenig Kulturmedium resuspendiert und noch vor dem Ausplattieren mit Viren entsprechender Titer infiziert.

4.2.4.6 Paraformaldehyd Fixierung von kultivierten Zellen

Paraformaldehyd (PFA) ist das Polymer des Methanals. Es wird zur Fixierung von Geweben und Zellkulturen verwendet. Es besitzt auch desinfizierende und fungizide Eigenschaften.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 1 x mit warmen (37° C) PBS gewaschen. Das PBS wurde sofort wieder abgenommen und die Zellen mit einer geeigneten Menge 4% PFA geflutet. Die Inkubationszeit beträgt 20 min bei RT und anschließend über Nacht bei 4° C.

4.2.4.7 HOPE Fixierung

Die *“Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect”* oder auch HOPE Fixierung (DCS-Innovative Diagnostik Systeme) ist eine Methode die Proteine und Nukleinsäuren weitestgehend in Ihrem nativen Zustand fixiert. Dadurch sind größere Mengen an Nukleinsäuren in besserer Qualität, als bei quervernetzenden Fixierungsmethoden zu erwarten. Allerdings waren weder die PEN-Membranen, noch das Plastik der Kulturschalen die bei den Laser-Mikrodissektions Experimenten eingesetzt wurden, resistent gegen die verwendete Hope I Lösung, bzw. Aceton, welches in einem Dehydrierungsschritt benutzt wurde. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

4.2.4.8 Immundetektion

Man unterscheidet generell zwischen der Detektion im Gewebe (Immunhistochemie, IHC) und der Detektion in Einzelzellen (Immuncytochemie, ICC).

Zunächst wurden PFA fixierte Zellen 3x 5 min mit PBS gewaschen. Zum aufschließen wurde 1x mit PBST für ca. 20 min inkubiert. Tween-20 (Polyoxyethylen-(20)-Sorbitanmonolaurat), ein mildes Detergenz, induziert dabei Löcher in die Zellmembranen, was eine erhöhte Permeabilität hervorruft. Sollten auch Proteine des Zellkerns gefärbt werden, wurde dem PBST noch 0,5% Triton X-100 (Roche) hinzugefügt. Im Anschluss wurde noch 3x mit PBS gewaschen und dann mit Blocklösung für 1 h bei RT unspezifische Bindungsstellen geblockt. Der 1. Antikörper wurde in Blocklösung auf die gewünschte Verdünnung eingestellt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der 1. Antikörper abgenommen und 3x mit PBS gewaschen. Der 2. Antikörper (Fluoreszenz gekoppelt) wurde in PBS verdünnt, in Dunkelheit für mindestens 1,5 h bei RT inkubiert und anschließend 3x mit PBS gewaschen.

4.2.4.9 Zellkernfärbung mit DAPI

Mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) lassen sich unter anderem Zellkerne anfärben. DAPI bildet dabei mit natürlich vorkommender doppelsträngiger DNA fluoreszierende Komplexe. Es fluoresziert bei ~ 450 nm, wenn es mit Licht der Wellenlänge ~ 345 nm angeregt wird. Die Präparate wurden für 5-10 min bei absoluter Dunkelheit in der frisch angesetzten Färbelösung inkubiert und anschließend 2 x für 10 min mit PBS gewaschen.

4.2.4.10 Zellkernfärbung lebender Zellen mit Hoechst 33342

Zum färben der Zellkerne lebender Zellen wurde der Hoechst 33342 Farbstoff nach Hersteller Angabe verwendet.

4.2.5 Zebrafisch Methoden

Alle Methoden, die bei der Arbeit mit Zebrafisch Embryonen verwendet wurden sind in Glinka et al., 2010 beschrieben, bzw. wurden teilweise aus Glinka (2005) entnommen.

4.2.5.1 Immunhistochemie von Zebrafisch Embryonen

Zunächst wurden die Embryonen fixiert, dazu wurden sie jeweils in ein frisches Glasröhrchen überführt und das Medium weitestgehend abgesaugt. Es wurde 4 % PFA in PBST zugegeben und die Embryonen in dieser Lösung über Nacht bei 4° C im Kühlschrank fixiert.

Zur längerfristigen Lagerung und für anschließende Protokolle, wurden die Embryonen dechorionisiert und in Methanol überführt. Dazu wurde zunächst 2x für 5 min in PBST gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen unter dem Binokular in PBST dechorionisiert und wiederum 2x in PBST gewaschen. Nun wurden die Embryonen 5 min in MetOH inkubiert, das MetOH gegen frisches getauscht und bei -20° C gelagert.

Zum langsamen rehydrieren wurden die Embryonen zuerst 5 min in 50 % MetOH / 50 % H₂O gewaschen, danach 5 min in H₂O, dann 30 min bis 4 h bei RT in H₂O auf dem Horizontalschüttler inkubiert (bei 32 hpf ca. 1 h). Nach dem rehydrieren wurden die Embryonen 1 h in PBDT aufgeschlossen und geblockt. Nun wurde der 1. AK in PBDT verdünnt zugegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert.

Der 1. Antikörper (Znp-1) kann mehrfach wieder verwendet werden und sollte daher abgenommen und bei 4° C aufbewahrt werden. Die Embryonen wurden 4x für 15 min in PBST mit 0,1 % Triton-X 100 waschen. Der 2. Antikörper, ein Biotin gekoppelter anti-Maus-Antikörper wurde 1:1000 in PBDT verdünnt und die Embryonen darin über Nacht bei 4° C inkubiert. Die ABC-Lösung wurde während der folgenden Waschschrte vorbereitet. Hierzu wurde je einen Tropfen Lösung A und B zusammen in 2,5 ml PBS geben und mindestens 30 min bei RT inkubiert. Die Embryonen wurden 4x 15 min in PBST mit 0,1 % Triton-X 100 gewaschen, 1 h in der vorbereiteten ABC-Lösung inkubiert und anschließend noch einmal 4x 15 min in PBST mit 0,1 % Triton-X 100 gewaschen.

Zum färben der Embryonen, wurde eine DAB Tablette in 1 ml Wasser gelöst und die Embryonen 30 min in der Lösung bei RT inkubiert. Je eine DAB Tablette und eine Harnstoff/H₂O₂ Tablette wurde in 1 ml Wasser gelöst, die DAB-Lösung von den Embryonen

abgenommen und durch die frische DAB/Harnstoff/ H₂O₂-Lösung ersetzt. Die Embryonen wurden darin inkubiert bis die gewünschte Färbung erreicht ist (sehr schnelle Färbereaktion <1 min). Die Lösung wurde abgekippt und 3x für 15 min in PBST gewaschen um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Embryonen in neues Röhrchen mit PBST überführt und bei 4° C gelagert. DAB ist kanzerogen und sollte vor Entsorgung in Natriumhypochlorid inaktiviert werden.

4.2.5.2 Fluoreszenz Immunhistochemie von Zebrafisch Embryonen

Es wurde zunächst wie unter Abschnitt 4.2.5.1 das verfahren. Nach der Inkubation des 1. Antikörpers wurde ein fluoreszierender 2. Antikörper auf die Embryonen gegeben. Dieser wurde ebenfalls in PBDT auf die gewünschte Verdünnung eingestellt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde 4x für 15 min in PBST mit 0,1 % Triton-X 100 gewaschen. Die Lagerung erfolgte in PBST bei 4° C im Dunkeln bis zum Eindecken der Embryonen.

4.2.5.3 Whole mount *in-situ* Hybridisierung von Zebrafisch Embryonen

Es wurden Embryonen im gewünschten Entwicklungsstadium gesammelt, wobei Embryonen die älter als 20 h (20 Somiten) sind dechorionisiert wurden, sodass sie beim fixieren gerade liegen. Die Embryonen wurden über Nacht bei 4° C in 4 % PFA in PBST fixiert, gewaschen, das Chorion entfernt, im Anschluss mit MetOH dehydriert und bei -20° C gelagert. Die Embryonen wurden zum rehydrieren nacheinander für je 5 min in 75-, 50- und 25-prozentigem MetOH in PBST bei RT inkubiert, danach 2x 5 min in PBST gewaschen. Es folgte ein Proteinase K Verdau bei RT (0,005 mg/ml in PBST). Die Inkubationszeit richtete sich dabei nach dem Entwicklungsstadium der Embryonen:

- 1 min bei 1-Zellstadium und höher
- 2-3 min bei bis zu 10 Somiten
- 3-4 min bei 10-20 Somiten
- 5-6 min bei 24-32 Somiten
- 10-20 min bei 40-50 h alten Embryonen

Die Embryonen wurden 2x kurz in 2 mg/ml Glycin in PBST gewaschen und für 20 min bei RT in 4 % PFA in PBST fixiert. Nach 5x 5 min waschen in PBST, erfolgt die Hybridisierung. Dazu wurde das PBST abgenommen und die Embryonen in 1 ml Hybridisierungspuffer für 1-8 h bei 65° C inkubiert. Die Hybridisierungsprobe (Appel et al., 1995) wurde in 500 µl Hybridisierungspuffer für 5-10 min auf 80° C erhitzt. Im Anschluss wurde die

Prähybridisierungslösung von den Embryonen abgenommen und durch die erhitzte Hybridisierungsprobe ersetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 65° C.

Die im Folgenden verwendeten SSCT-Lösungen wurden immer einen Tag vor Verwendung frisch angesetzt und über Nacht bei 65° C inkubiert. Zunächst wurde 2x 30 min in 50 % Formamide in 2x SSCT bei 65° C gewaschen, dann 1x 30 min in 2x SSCT bei 65° C und zuletzt 2x 30 min in 0,2x SSCT bei 65° C. Alle Schritte der Detektion wurden bei RT auf einem Taumler oder Schüttler durchgeführt, mit Ausnahme der Färbereaktion. Die Embryonen wurden zunächst für 1-8 h in PBST + 5 % Schafserum geblockt. Die Blocklösung wurde durch 500 µl präabsorbierte Schaf α -Fluorescein-AP Fab Fragmente (Verdünnung 1:2000 in PBST; Antikörper 2 x wieder verwendbar!) ersetzt und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4° C auf einem Taumler inkubiert. Es wurde 6x je 20 min in PBST gewaschen, danach 2x 5 min in frisch angesetzten Puffer SB (pH 9.5). Die Färbereaktion erfolgte in der Färbelösung (SS) für bis zu 48 h, bis die gewünschte Intensität erreicht war. Zum beenden der Färbereaktion wurde 3x in PBST gewaschen und anschließend für mindestens 30 min in 4 % PFA in PBST fixiert. Die Lagerung erfolgt in PBST mit zugesetztem Natriumazid (0,05%) bei 4° C.

Präabsorption des Antikörpers:

Es wurden verschiedene Entwicklungsstadien von Zebrafisch Embryonen gesammelt (mindestens 100 Embryonen pro 10 ml PBST), dechorionisieren war hierbei nicht nötig. Die Embryonen wurden über Nacht in 4 % PFA bei 4° C fixiert und anschließend 4x 5 min in PBST gewaschen. Gelagert wurden die fixierten Embryonen in MetOH bei -20° C. Zum rehydrieren der Embryonen wurde 3x 5 min in PBST gewaschen, danach wurden die Embryonen ein 2 ml Mikrozentrifugen Röhrchen überführt und mit einer Pistille homogenisiert. Das Gesamtvolumen wurde mit PBST auf 1 ml eingestellt. Es wurden 10 µl des Antikörpers zugeben und mindestens über Nacht bei 4° C auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde bei 5000 Upm abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Die embryonale Debris (Pellet) wurde mehrfach in PBST resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand in das Falcon überführt. Der gesammelte Überstand mit PBST wurde auf eine endgültige Verdünnung des Antikörpers von 1:2000 aufgefüllt, anschließend steril filtriert und bei 4° C gelagert.

4.2.5.4 Eindecken gefärbter Zebrafisch Embryonen für die Mikroskopie

Damit die Embryonen beim Mikroskopieren gerade liegen, musste der Dottersack und ein Teil des Schwanzes entfernt werden. Die Embryonen wurden dazu zunächst in 70 % Glycerin in einem 3,5 cm Petrischälchen eingebettet und gewartet bis sie abgesunken waren. Dann wurden sie in 99 % Glycerin überführt und unter dem Binokular geschnitten.

Um ein zu starkes Verformen der relativ dicken Embryonen beim Eindecken zu vermeiden, wurden zwei Tesafilm-Streifen übereinander auf den Objektträger geklebt und mit einem stumpfen Gegenstand fest gerieben. Dann wurde ein Spalt von ca. 2 mm Breite mit einem scharfen Skalpell aus den Tesafilm geschnitten, in den die Embryonen gelegt wurden (max. 5 Stück). Auf 70° C erhitztes Mowiol wurde in den Spalt pipettiert und ein 12 mm Deckgläschen aufgelegt (Abbildung 4.3).

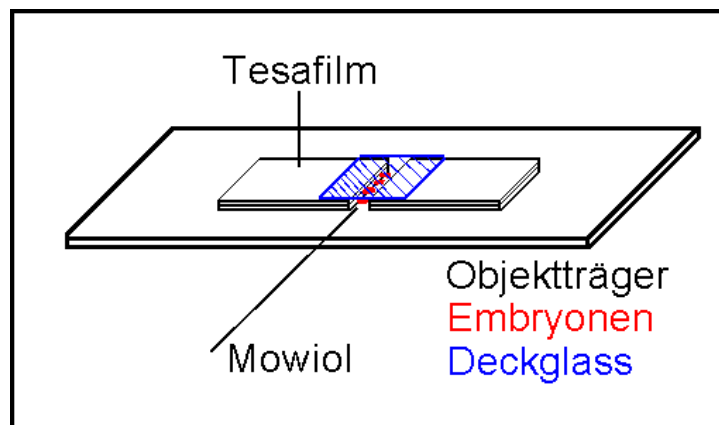


Abb. 4.3: Eindecken von Zebrafisch Embryonen in Mowiol für die Mikroskopie.

Die Auswertung der so eingedeckten Zebrafisch Embryonen erfolgte an einem inversen Zeiss Axiovert 100 Mikroskop.

4.2.5.5 Längenmessung von Axonen embryonaler Zebrafisch Motoneuronen

In einer Kooperation mit Christoph Winkler (ehemals Lehrstuhl für Physiologische Chemie I am Biozentrum, Uni-Würzburg) wurden Zebrafisch Embryonen im 2-Zell Stadium mit hnRNP-R Morpholinos unterschiedlicher Konzentration injiziert. Als Kontrolle der Morpholino Spezifität wurden Mismatch Morpholinos injiziert. Die Embryonen wurden im Rahmen dieser Arbeit einer DAB Färbung unterzogen und mikroskopisch ausgewertet, dabei wurde versucht immer den gleichen Bereich von ca. 5-6 Segmenten pro Embryo zu erfassen. Die Motoneurone der Segmente aus diesem Bereich sind bei 32 h alten Embryonen bereits vollständig ausgebildet. Mit dem frei erhältlichen Programm ImageJ in der Version 1.32j wurden die Axonlängen vermessen. Dazu musste das Programm zunächst auf einen

Größenstandart geeicht werden. Hierzu wurde mit einem 20x Objektiv, mit dem auch die Embryonen photographiert wurden, eine Neubauerkammer (Marienfeld) aufgenommen. Die Softwareseitigen Einstellungen der im Computer verwendeten *Framegrabber*-Karte waren dabei immer gleich. Die Auflösung des Bildes der Neubauerkammer, ist damit die Gleiche wie die ausgewerteten Embryonenbilder. Ein Teilstrich der Neubauerkammer entspricht 50 μm . Mit diesen Angaben konnte in ImageJ ein Größenstandart berechnet werden. Dazu wurde mittels der Funktion „*Straight line selections*“ ein Teilstrich exakt markiert und mit der Funktion „*Set Scale*“ im Kontextmenü „*Analyze*“ der 79 Pixel weiten Markierung die „*known Distance*“ von 50 μm zugewiesen. Daraus ergab sich der Größenstandart von 1,58 Pixeln/ μm . Nachdem die einzelnen Bilder der Embryonen in ImageJ geladen wurden, konnten die Motoaxone mit der Funktion „*Segmented line selections*“ manuell nachgezeichnet werden. Dabei wurde das gesamte Axon vom Austrittspunkt aus dem Rückenmark, bis zum Wachstumskegel markiert und mit der Funktion „*Measure*“ im Kontextmenü „*Analyze*“ ausgewertet. Die Gemessenen Längen konnten schließlich statistisch ausgewertet werden.

4.2.6 Mikroskopie

Die in dieser Arbeit gezeigten Durchlicht- und Fluoreszenz- Bilder von Zebrafisch Embryonen oder Zellkulturen wurden auf einem inversen Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss) mit einer digitalen AxioCam HRC Kamera (Zeiss), einem konfokalen TCS SP2 Mikroskop (Leica) oder einem DMB 6000B Mikroskop (Leica), das Bestandteil des LMD 6500 Systems (Leica) ist aufgenommen. Teilweise wurden Bilder der kompartimentierten Neuronkulturen auf einem Eclipse TS100 (Nikon) mit einem Digital Sight DS-L1 (Nikon) Dokumentationssystem aufgenommen. Makroskopische Aufnahmen von Zebrafischen wurden auf einem MZ75 Binokular (Leica) mit einer digitalen DC300 (Leica) Kamera gemacht.

Laser-Mikrodissektion axonaler Wachstumskegel:

WillCo-Schälchen mit einer PEN-Membran als Trägermatrix, wurden wie unter 4.2.4.1 beschrieben mit PORN und anschließend wie unter 4.2.4.2 beschrieben mit Laminin beschichtet. Die Motoneurone wurden ansonsten unter üblichen Zellkultur Bedingungen gehalten (5 ng/ml BDNF, CNTF, 2 % Pferdeserum). Die Mikrodissektion erfolgte mit einem LMD 6500 System (Leica) nach Hersteller Protokoll. Um 10mm Deckgläschen verwenden zu können, wurde bei der Werkstatt ein Reduzier-Adapter in Auftrag gegeben, der aus einer Edelstahl-Scheibe von ca. 2 mm Stärke besteht. Der äußere Durchmesser entspricht dem

Mikroskopeinsatz für Kulturschalen. Mittig wurde ein Loch von 8 mm Durchmesser mit einem äußeren 2,5 mm Steg gefräst, sodass 10 mm Deckgläschen sicher in der Vertiefung zu liegen kamen. Die Lasereinstellungen zum schneiden der Glasoberfläche wurden wie folgt gewählt:

| Objektiv: | 10x | 20x | 40x |
|---------------|------------|------------|------------|
| Power: | 100 | 100 | 75-80 |
| Speed: | 3 | 2 | 3 |
| Balance: | 0 | 0 | 0 |
| Line spacing: | 5 | 7 | 10 |
| Offset: | 0 | 0 | 0 |

5. Ergebnisse

5.1 HnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen

Um die Rolle von hnRNP-R bei der Entwicklung des Nervensystems in Neuronen näher zu untersuchen, wurden Zebrafisch Embryonen als Modellsystem für *in vivo* Knockdown Untersuchungen gewählt. Dazu wurden künstlich synthetisierte RNA-Analoga, so genannte Morpholino Oligos (MO) in befruchtete Zebrafisch Embryonen im Ein- oder Zweizellstadium injiziert. Morpholinos basieren auf heterozyklischen Morpholinringen anstatt Ribose und sind in der Lage, komplementär an zelleigene mRNAs zu binden. Die entstehenden stabilen Doppelstrang-Hybride können nicht von der ribosomalen Translationsmaschinerie oder Spleisskomplexen verdrängt werden und verhindern somit effektiv die Proteinsynthese, bzw. das Spleißen von prä-mRNAs. Obwohl Morpholinos keine RNase-Substrate darstellen, ist ihre Wirkung nicht permanent, da die anfängliche Morpholino Konzentration bei jeder Zellteilung verdünnt wird.

5.1.1 Primäre Motoneurone in der embryonalen Entwicklung des Zebrafisches

Beim Zebrafisch werden generell drei Subtypen von Motoneuronen unterschieden, nach der jeweiligen Lage des Zellkörpers und der Projektionsrichtung ihrer Axone. Jedes Rumpfsegment eines Embryos wird von 2 Motoneuronen eines Subtyps innerviert. Es wird zwischen rostralen (*Rostral primary*, RoP), mittleren (*Middle primary*, MiP) und kaudalen (*Caudal primary*, CaP) primären Motoneuronen differenziert. Zusätzlich existiert in etwas weniger als der Hälfte der Rumpfsegmente ein vierter Subtyp von primären Motoneuronen, die je nach Zellschicksal während der Embryogenese absterben oder zu Motoneuronen heranreifen können. Sie werden variabel vorhandene (*Variable primary*, VaP) primäre Motoneurone genannt (Eisen et al., 1990).

Die Zellkörper aller Motoneurone sind im Rückenmark lokalisiert. Sie projizieren ihre Axone zunächst entlang eines gemeinsamen Pfades und verlassen das Rückenmark an derselben Stelle eines Rumpfsegments. Die Axone von RoP Motoneuronen wachsen ab diesem Punkt mediolateral durch das horizontale Myoseptum. Die Axone der MiP Motoneurone verzweigen frühzeitig und projizieren entlang des dorsomedialen Myotoms, während die Axone von CaP Motoneuronen ventral entlang des medialen Myotoms auswachsen (Abbildung 5.1). 31 Stunden nach Fertilisation (*hours post fertilization*, hpf) sind die Axone der CaP Motoneurone von Zebrafisch Embryonen klar unterscheidbar, während die Axone der anderen Subtypen primärer Motoneurone im Zebrafisch innerhalb des Rückenmarks projizieren und somit kaum einzeln erfassbar sind. Daher wurden die Axone der CaP Motoneurone für die Analyse des

hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen stellvertretend für alle Motoneurone gewählt.

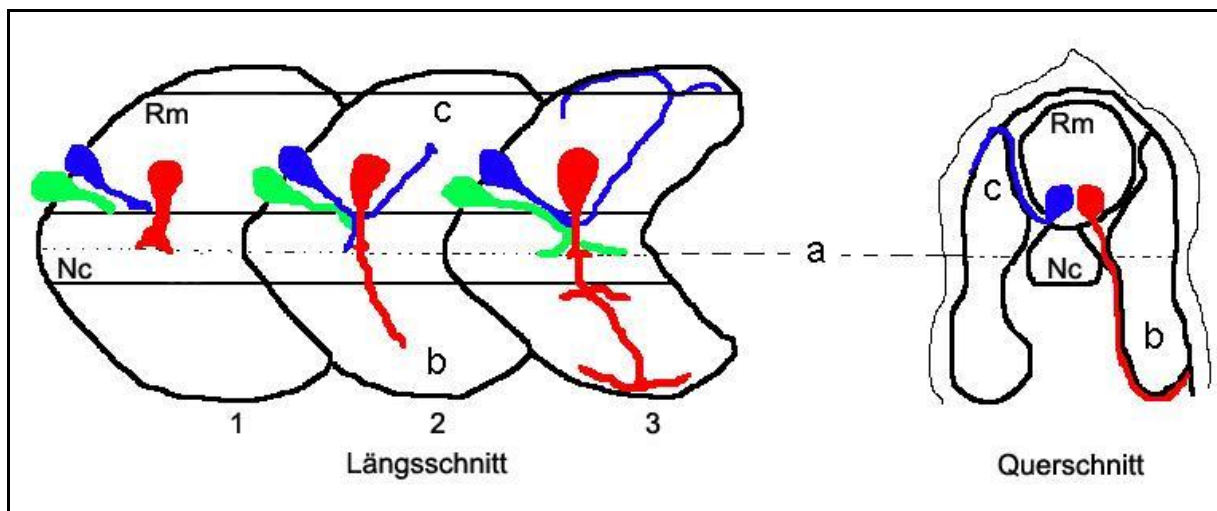


Abb. 5.1: Axonale Wachstumspfade von primären Motoneuronen in Zebrafisch Embryonen.

Es sind die primären Motoneurone eines embryonalen Hemisegments schematisch dargestellt. 1-3: Wachstumspfade während der Embryogenese. Rm, Rückenmark. Nc, Notochord.

a, gemeinsamer Austrittspunkt der Axone aus dem Rückenmark.

b, CaP spezifischer Pfad entlang des medialen Myotoms (rot).

c, MiP spezifischer Pfad entlang des dorsomedialen Myotoms (blau);

RoP Motoneurone (grün).

5.1.2 Identifizierung und Charakterisierung der *Danio rerio* hnRNP-R cDNA

Mit der Proteinsequenz von murinen hnRNP-R (gi:17066599) wurde zunächst eine Datenbanksuche mittels TBLASTN nach orthologen Zebrafisch Sequenzen durchgeführt.

Bei dieser Suche konnte der *Danio rerio* UniGene Cluster „Dr.4457“ (Strausberg et al., 2002), auf Chromosom 19 identifiziert werden. Dieser UniGene Cluster basiert auf zwei cDNAs (NP_998591; AAH53413) mit einer Länge von 1299 Basenpaaren, von denen die Nukleotide 152-794 ein Protein von nur 214 Aminosäuren codieren. Diese verkürzte Sequenz entspricht dem N-terminalen Teil von murinen hnRNP-R (vergleiche Abbildung 5.3, DR_AA53413). Um eventuell weitere Exons (*expressed region*), die nicht in dieser Sequenz enthalten sind aufzuspüren, wurde als nächster Schritt das Zebrafisch Genom mittels TBLASTN und der murinen hnRNP-R Proteinsequenz durchsucht. Hierbei konnte eine Sequenz gefunden werden, die ebenfalls auf Chromosom 19 lokalisiert ist und der vollen Länge der murinen hnRNP-R Sequenz entspricht (genomisches Contig: NW_001511801).

Mit dieser zusammenhängenden Sequenz des putativen *Danio rerio* hnRNP-R Orthologs wurde nach entsprechenden ESTs (*expressed sequence tag*) gesucht, um Hinweise zu erhalten, ob die vorhergesagte vollständige Sequenz auch *in vivo* exprimiert wird.

81 der gefundenen 144 Zebrafisch ESTs konnten mittels CAP3 (*Contig Assembly Programm* 3; (Huang und Madan, 1999)) zu einem zusammenhängenden *in silico* Contig von 2644 Nukleotiden Länge assembliert werden (Abbildung 5.2). Dieses Contig enthält einen offenen Leserahmen von 637 Aminosäuren, der der murinen hnRNP-R Proteinsequenz entspricht (Vergleiche Abbildung 5.3).

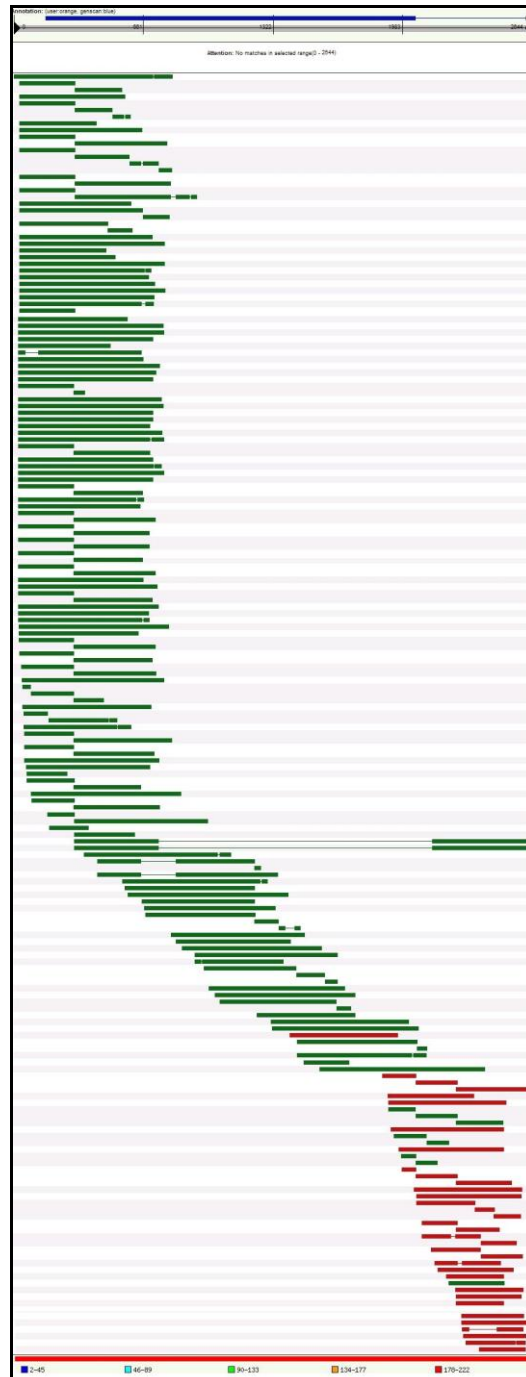


Abb. 5.2: Schematische Darstellung des mittels CAP3 zusammengesetzten Contigs aus Zebrafisch hnRNP-R ESTs.

Die in der Datenbank gefundenen hnRNP-R ESTs konnten überlappend zu einem Contig zusammengefügt werden. Das resultierende Contig besitzt 2644 Nukleotide und enthält einen offenen Leserahmen, der ein Protein von 637 Aminosäuren codieren würde.

| | | |
|--------------|---|-----|
| DR_AAH53413 | MAAEVNGSSVLLKEEEEPEVMT-APRSENYQALLDAGLPQKVAESLDNIFQTGESAEHGL | 59 |
| DR_Insilico | MAAEVNGSSVLLKEEEEPEVMT-APRSENYQALLDAGLPQKVAESLDNIFQTGESAEHGL | 59 |
| Mus_AAL35332 | MANQVNGNAVQLKEEEEFMDTSSVTHTEHYKTLIEAGLPQKVAERLDEIFQT-----GL | 54 |
| DR_AAH53413 | VAYADLDERALDALREFNEEGALSVLQQFKESDLSHVQNKSAFLCGVMKTYRQREKQGNK | 119 |
| DR_Insilico | VAYADLDERALDALREFNEEGALSVLQQFKESDLSHVQNKSAFLCGVMKTYRQREKQGNK | 119 |
| Mus_AAL35332 | VAYVDLDERAIDALREFNEEGALSVLQQFKESDLSHVQNKSAFLCGVMKTYRQREKQGSK | 114 |
| DR_AAH53413 | VQES SKGPDETKIKALLDRGTGYTLDVTTGQRKYGGPPPPDAVFS GPQPG IGTEV FVGKI PR | 179 |
| DR_Insilico | VQES SKGPDETKIKALLDRGTGYTLDVTTGQRKYGGPPPPDAVFS GPQPG IGTEV FVGKI PR | 179 |
| Mus_AAL35332 | VQES TKGPDEAKIKALLERTGYTLDVTTGQRKYGGPPPPDSVYS GVQPG IGTEV FVGKI PR | 174 |
| DR_AAH53413 | DLYEDELVPLFEKAGSIWDLRRDVWPLLS----HILLLF----- | 214 |
| DR_Insilico | DLYEDELVPLFEKAGSIWDLRLMMDPLTGQNRGYAFITFCSKDAAQEAVKLCDNYEIRSG | 239 |
| Mus_AAL35332 | DLYEDELVPLFEKAGPIWDLRLMMDPLS GQNRGYAFITFCGKEAAQEAVKLCDSYEIRPG | 234 |
| DR_Insilico | KYLGVCISVANNRLFVGS I PKNKTRES I LEDFGKVTEGLQEVI LYTQPDDKKKNRGFC FL | 299 |
| Mus_AAL35332 | KHLGVCISVANNRLFVGS I PKNKTKENI LEEF'S KVTEGLVDVI LYHQPDKKKNRGFC FL | 294 |
| DR_Insilico | EYEDHKSAXQARRRLMSGKVKVWGNPVTVEWADPVAEPDPEIMAKVKVLFVVRKLATPVTE | 359 |
| Mus_AAL35332 | EYEDHKSAAQARRRLMSGKVKVWGNVVTVEWADPVEEPDPEVMAKVKVLFVVRNLATTVTE | 354 |
| DR_Insilico | ELLEKTFSQFGKLERVKKLKDYAFVHFEERDAAVKAMQDMNGKELGGEEIEIVLAKPPDK | 419 |
| Mus_AAL35332 | EILEKSFSEFGKLERVKKLKDYAFVHFEDRGAAVKAMDEMNGK EIEGEEIEIVLAKPPDK | 414 |
| DR_Insilico | KRKERQAARQTTRNTGYDDYYYYPPPRMPPPGRGRGRGGGGYSYPPDYGYEYYDDYY | 479 |
| Mus_AAL35332 | KRKERQAARQASRS TAYEDYYYHPPPRMPPPMRGRGRGRGGGGYPPDYGYEDYYDDYY | 474 |
| DR_Insilico | GGYDYHDIRGGYDDPYGYDDGYTMRGRGT-RGSRGAPPPPRGRAAPPTRGRGGYPPRGG | 538 |
| Mus_AAL35332 | G-YDYHDIRGGYEDPYGYDDGYAVRGRGGGRGGRGAPPPPRGRGAPP PRGRAGYSQRG- | 532 |
| DR_Insilico | AFMGSGRGGRGGGGPFQLPRGRGTRGARGNRGGNVGGKRAKXVFNQPD SKRRQT-NQQN | 597 |
| Mus_AAL35332 | APLGPFRGS RGGRRGPAQQQRGRGSRGARGNRGGNVGGKRAKADGYNQPD SKRRQTNNQQN | 592 |
| DR_Insilico | WGSQPIAQQPLQQGGGEYS S GYSYSNDSLEFSQDSYGQQWK | 637 |
| Mus_AAL35332 | WGSQPIAQQPLQQGGDYSGNYGYNNDNQEYQD TYGQQWK | 632 |

Abb. 5.3: Gegenüberstellung der *Danio Rerio* und muriner hnRNP-R cDNAs

Die in der Datenbank gefundene Zebrafisch hnRNP-R Proteinsequenz (DR_AAH53413) ist der *Danio rerio in silico* Proteinsequenz und der murinen hnRNP-R (mus_AAL35332) Sequenz gegenübergestellt. Die konservierten RNA Bindungsmotive (RRMs), sowie die C-terminale RGG Box des hnRNP-R Proteins sind grau hinterlegt. Das N-terminale Peptid, welches für die Immunisierung von Kaninchen synthetisiert wurde, ist in der murinen Sequenz umrandet (Rossoll et al., 2002).

5.1.3 Sequenzierung der Zebrafisch hnRNP-R cDNA

Um die prognostizierte *in silico* Sequenz zu bestätigen wurde mRNA aus Zebrafisch Embryonen im Alter von 20-31 hpf isoliert und in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung von Primern die im 5'- und 3'- Bereich der Sequenz liegen, nahe am Start-/Stop-Codon, konnte ein „Touchdown-PCR“ Protokoll etabliert werden, das ein Fragment von ca. 1900 Nukleotiden Länge ergab (Abbildung 5.4). Da eine vollständige Sequenzierung dieses Fragments in einem Ansatz nicht gelang, wurde eine schrittweise Sequenzierungsstrategie angewendet. In die bereits sequenzierten Bereiche wurden neue Primer gelegt und der nächste Abschnitt sequenziert, bis schließlich die einzelnen Teilsequenzen zusammenfügt werden konnten. In dieser vollständigen Sequenz wurde ein offener Leserahmen von 1914

Basenpaaren gefunden, der einem *Danio rerio* hnRNP-R Protein von 637 Aminosäuren entspricht (vgl. Abbildung 5.3).

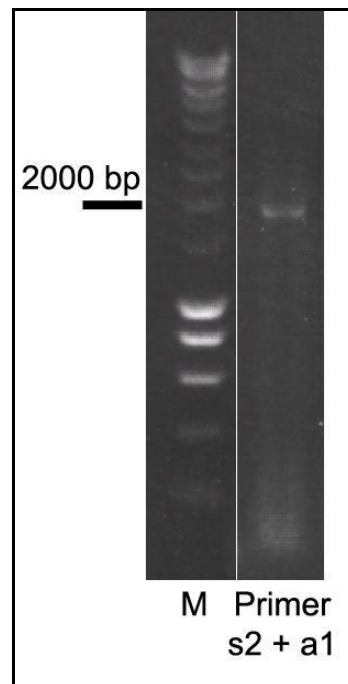


Abb. 5.4: Touchdown PCR der hnRNP-R cDNA

Bei der Touchdown-PCR wurde in den 6 ersten Zyklen die Temperatur um jeweils 1° C gesenkt. Beginnend mit 66° C, um ein spezifisches Binden der Primer an das Template zu ermöglichen. Anschließend folgten 30 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60°C. Mit den Primern Sense2 (s2) und Anti1 (a1), die in der 5'-, bzw. 3'-UTR der hnRNP-R mRNA gelegen sind, wurde ein Fragment von ca. 1900 bp amplifiziert.

5.1.4 HnRNP-R Morpholino Injektionen in Zebrafisch Embryonen

Die verwendeten antisense Morpholino Oligonukleotide sind komplementär zu den ersten 25 Nukleotiden der Zebrafisch hnRNP-R mRNA, sie überdecken 10 Nukleotide in der 5'-UTR, das ATG Startcodon und die ersten 12 Nukleotide der kodierenden Sequenz.

Als Kontrolle, ob die Morpholinos spezifisch nur die hnRNP-R mRNA binden, wurden Mismatch Morpholinos synthetisiert, bei denen 5 Nukleotide zufällig ausgetauscht waren und von denen keine Bindung an die Zebrafisch hnRNP-R mRNA zu erwarten war (Abbildung 5.5). Die Zebrafisch Embryonen wurden im Ein- bzw. Zweizellstadium mit jeweils 0,5 nl Morpholinos injiziert und konnten sich anschließend bis 31 hpf entwickeln.

DR hnRNP-R mRNA: 5'- TTG TCA CGT AAT GGC CGC AGA GGT G - 3'

hnRNP-R Morpholino: 3'- AAC AGT GCA TTA CCG GCG TCT CCA C - 5'

Mismatch Morpholino: 3'- AAG AGT CCA TTA GCG GCC TCT GCA C - 5'

Abb. 5.5: Gegenüberstellung der hnRNP-R mRNA Sequenz mit den Morpholino Sequenzen.

Die *Danio rerio* (DR) hnRNP-R mRNA Sequenz ist den Antisense-Sequenzen der gerichteten und der Mismatch Morpholinos gegenübergestellt. Das ATG Startcodon der mRNA, sowie die ausgetauschten Nukleotide der Mismatch Morpholinos sind hervorgehoben.

In einem ersten Experiment wurde eine relativ geringe Dosis von 3,1 ng gegen hnRNP-R gerichtete Morpholinos injiziert, die allerdings zu schweren Entwicklungsdefekten führte und eine hohe Mortalitätsrate von ~ 85 % zur Folge hatte (39 von 46 Embryonen, Tabelle 5.1).

Die Embryonen starben in Entwicklungsstadien zwischen der späten Gastrulation und der frühen Somitogenese, was auf eine Funktion von hnRNP-R in der frühen Embryonalentwicklung schließen lässt. Als Deformiert wurden Embryonen klassifiziert, die eine verkürzte Körperachse, geknickte Schwanz- und/oder fehl gebildete Kopfpforten, verlangsamtes Wachstum oder ein teilweise nekrotisches ZNS aufwiesen. Diese Morpholino Dosis war letal, und bei folgenden Experimenten wurden nur subletale Morpholindosen von 0,6 ng - 1,6 ng verwendet. Auch hier waren die beschriebenen Fehlbildungen zu beobachten, allerdings in geringerer Frequenz (Tabelle 5.1). Für alle weiteren Experimente wurden nur solche Embryonen ausgewertet, die normale Rumpfgößen und keine Fehlbildungen der Körperachse aufzeigten (Abbildung 5.5). Bei 0,6 - 1,6 ng überlebten zwischen 81 und 86 % der injizierten Embryonen, während bei den mit 3,1 ng Mismatch MO injizierten Embryonen 99 % überlebten (Tabelle 5.1).

Die Injektion der Mismatch Morpholinos führte zu einem leicht ventralisiertem Phänotyp mit Verdickungen in der Schwanzregion. Der axonale Phänotyp der Motoneurone unterschied sich nicht auffallend von den nicht injizierten Kontroll-Embryonen. Als Kontrolle für die Injektionsprozedur wurde das Standard Genetool Morpholino verwendet, wobei keine Auffälligkeiten zu beobachten waren.

| hnRNP-R MO Dosis | # injizierte Embryonen | # lethal | # deformiert |
|-----------------------------|---------------------------|-------------|--------------|
| 3,1 ng | 46 | 39 (84,8 %) | 7 (100 %) |
| 1,6 ng | 469 | 67 (14,3 %) | 215 (53,5 %) |
| 1,3 ng | 120 | 23 (19,2 %) | 36 (37,1 %) |
| hnRNP-R Mismatch | | | |
| 3,1 ng | 133 | 1 (0,8 %) | 0 |

Tab. 5.1: Übersicht der Sterblichkeitsrate und Deformationen von Zebrafisch Embryonen nach Morpholino Injektionen.

Zusammengefasst ist die Zahl der injizierten Embryonen bei verschiedenen Morpholino Dosen, die Zahl der Embryonen die 31 h nach Injektion abgestorben (#letal) waren und die Zahl der überlebenden Embryonen die Deformationen im Vergleich zu nicht injizierten Embryonen gleichen Alters, entwickelten (#deformiert). Deformationen wurden klassifiziert als: verkürzte Körperachsen, verlangsamtes Wachstum, geknickte Schwanzpartien und Körperachsen, fehl gebildete Kopfpartien, und nekrotische Bereiche des ZNS. Die höchste injizierte hnRNP-R Morpholino Dosis von 3,1 ng führte zum Absterben von 84,8 % der injizierten Embryonen und starker Deformation der überlebenden Embryonen. Diese Dosis wurde daher als letal eingestuft. Für weitere Analysen spezifischer Effekte wurden subletale Morpholino Dosen von 0,6-1,6 ng eingesetzt. Bei 0,6 ng waren vereinzelt leichte Fehlbildungen an Schwanzpartien auffällig, die nicht bei höheren Dosen von 1,3 und 1,6 ng auftraten.

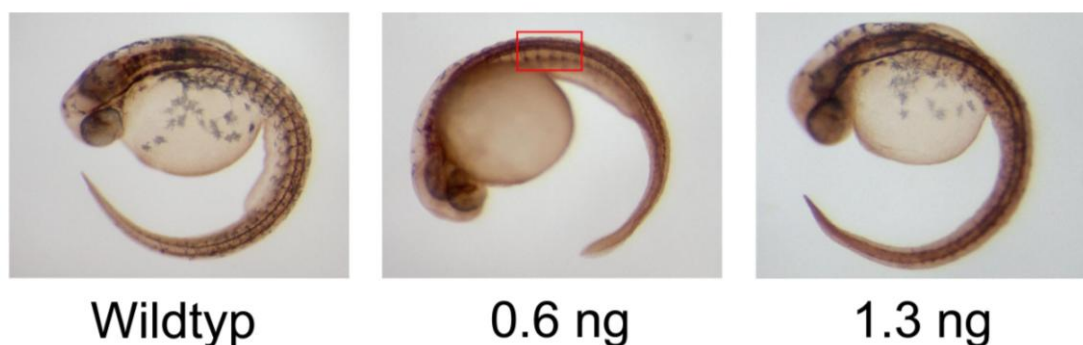


Abb. 5.6: Makroskopischer Vergleich von selektierten Zebrafisch Embryonen.

Nicht injizierte wildtypische und hnRNP-R Morpholino injizierte Embryonen, die für weitere Experimente analysiert wurden, wurden auf Fehlbildungen der Körperachse und ähnliche Rumpfgöße sortiert. Sie sind in ihrem makroskopischen Erscheinungsbild miteinander vergleichbar. Das rote Rechteck bei 0,6 ng zeigt die Embryonalsegmente die in weiteren Experimenten näher untersucht wurden. Die hier gezeigten Embryonen wurden mit dem znp1 Antikörper DAB gefärbt.

5.1.5 Charakterisierung eines murinen hnRNP-R Antiserums für Versuche mit Zebrafisch Homogenaten

Für Western Blot Analysen von hnRNP-R und Mismatch Morpholino injizierten Zebrafisch Homogenaten sollte ein hnRNP-R spezifisches Antiserum verwendet werden. Das Antiserum wurde durch die Immunisierung von Kaninchen mit einem 18 Aminosäure langen N-terminalen Fragment von murinen hnRNP-R gewonnen (Rossoll et al., 2002; vgl. Abbildung 5.3). Dieses Peptid unterscheidet sich vom nah verwandten hnRNP-Q auf Ebene der Proteinsequenz. Der Bereich von hnRNP-R, in dem dieses Fragment liegt, ist zwischen Zebrafisch und Maus zu 67 % identisch (vgl. Abbildung 5.3). Bei der Immunisierung von Kaninchen mit dem murinen hnRNP-R Peptid wurden Antiseren aus zeitlich aufeinander folgenden Blutabnahmen gewonnen. Zunächst wurde getestet, welches der vorhandenen Seren gegen Zebrafisch Homogenate ein Signal liefert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Serum, welches gegen murines hnRNP-R ein gutes Signal liefert, auch bei nicht injizierten Zebrafisch Homogenaten die besten Resultate erzielte (Abbildung 5.7; 83F).

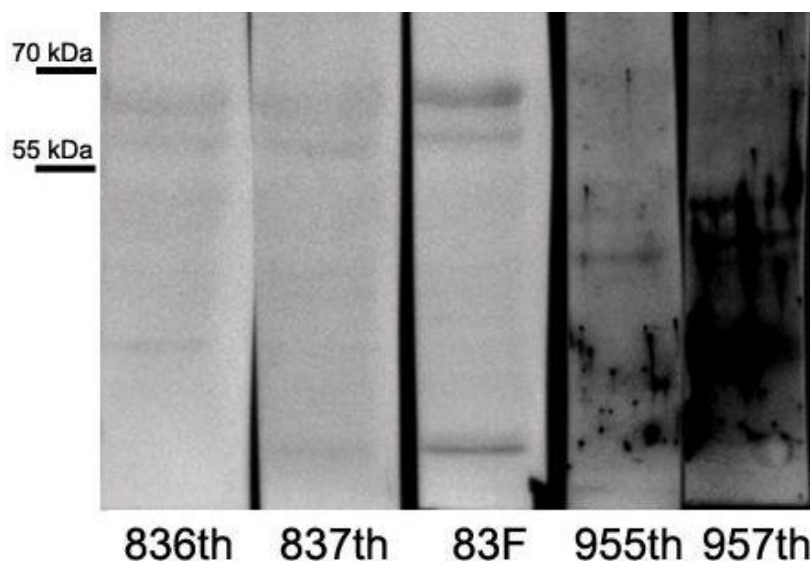


Abb. 5.7: Vergleich verschiedener hnRNP-R Antiseren in Western Blot Analysen von wildtypischen Zebrafisch Homogenaten.

Das hnRNP-R Antiserum mit der Bezeichnung 83F (83 Final) liefert bei gleicher eingesetzter Menge das deutlichste Signal. Seren, die aus vorangegangenen Blutabnahmen gewonnen (836th, 837th) wurden, zeigten schwächere Signale. Es wurden auch zwei Seren getestet, die von einem anderen gegen hnRNP-R immunisierten Kaninchen stammen (955th, 957th), diese liefern jedoch kein spezifisches Signal, dafür starken Hintergrund.

Dieses Serum wurde anschließend mit dem zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten Peptid oder einem unspezifischen Kontrollpeptid in unterschiedlichen Mengen über Nacht bei 4° C inkubiert, ultrazentrifugiert und der Überstand im Western Blot gegen ein His markiertes

Maus hnRNP-R Protein getestet (Abbildung 5.8). Es konnte gezeigt werden, dass eine Präabsorption mit 500µg hnRNP-R Peptid das hnRNP-R Signal im Western Blot vollständig eliminiert.

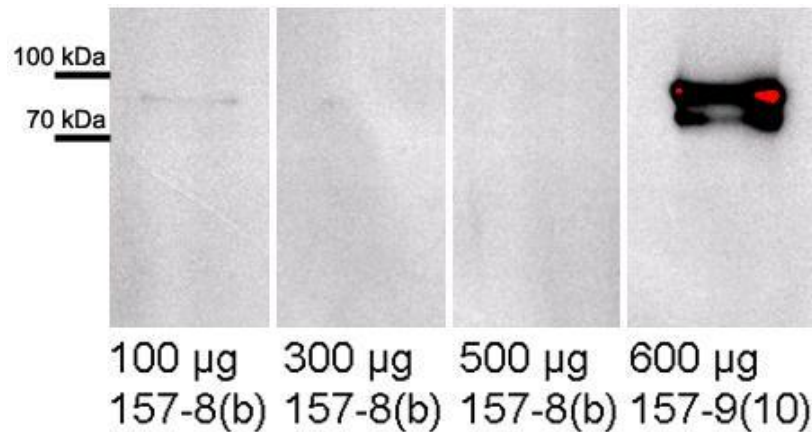


Abb. 5.8: Präabsorption des 83F hnRNP-R Antiserums mit unterschiedlichen Mengen hnRNP-R Peptid.

Das hnRNP-R Antiserum (83F) wurde mit 100, 300 und 500µg hnRNP-R Peptid (157-8(b)) und 600µg eines unspezifischen CYPY-Kontroll-Peptids (157-9(10)) absorbiert und auf einem Western Blot gegen ein His markiertes Maus hnRNP-R Protein getestet. Das Antiserum, welches mit dem Kontroll-Peptid absorbiert wurde, zeigt wie zu erwarten ein deutliches Signal bei ~95 kDa. Auch bei Einsatz von 100µg hnRNP-R Peptid ist noch ein Signal erkennbar. Bei 300µg hnRNP-R Peptid ist das Signal fast vollkommen verschwunden und bei 500µg ist kein Signal mehr sichtbar.

Um die Spezifität des hnRNP-R Antiserums gegen das Zebrafisch hnRNP-R Protein zu testen, wurden Zebrafisch Embryo Homogenate (31 hpf), sowie His-markiertes murines hnRNP-R und Homogenate von Mausembryonen (E13) als Positiv-Kontrollen in einem Western Blot getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl bei den Kontrollen, als auch bei den Zebrafisch Homogenaten, das hnRNP-R Signal verschwand, wenn das Antiserum mit dem hnRNP-R Peptid (157-8(b)) präabsorbiert wurde (Abbildung 5.9).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das hnRNP-R Antiserum auch das Zebrafisch Protein spezifisch erkennt und für Western Blot Analysen von injizierten Embryonen geeignet ist.

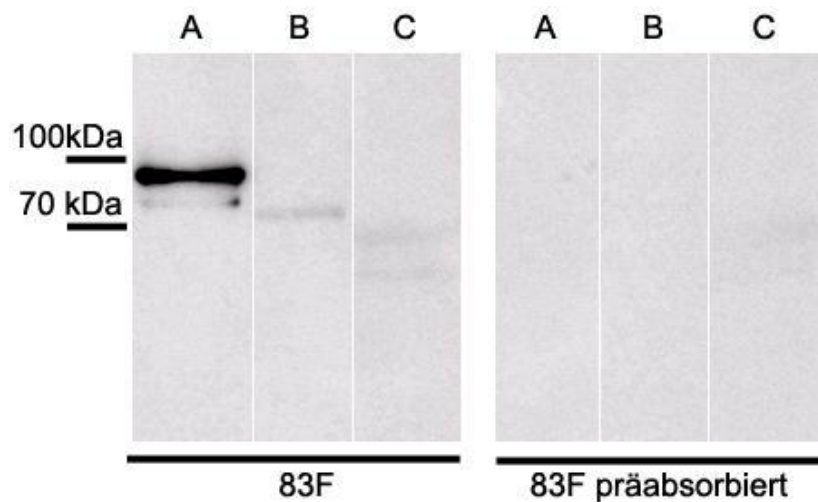


Abb. 5.9: Das 83F hnRNP-R Antiserum erkennt Zebrafisch hnRNP-R Protein spezifisch
 Maus und Zebrafisch Proben wurden einmal mit dem hnRNP-R Antiserum (83F) und einmal mit Antiserum, das mit 500µg 157-8(b)-Peptid absorbiert wurde, in einem Western Blot getestet. Die markante Bande (~95 kDa) des His markierten Maus hnRNP-R (A) verschwindet vollständig, ebenso das wildtypische murine hnRNP-R (B, E13 Homogenat, ~72 kDa). Beim Zebrafisch Homogenat (C) ist das Signal sehr stark reduziert.

5.1.6 Western Blot Analysen von hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Homogenaten

In Western Blot Analysen von embryonalen Zebrafisch Homogenaten (31 hpf) konnte mit dem murinen hnRNP-R Antiserum (83F) eine deutliche Bande bei ~65 kDa gezeigt werden (Abbildung 5.10), die etwas niedriger läuft, als das vorhergesagte Zebrafisch hnRNP-R Protein erwarten ließe (71 kDa). Die Injektion von 0,6 ng gegen hnRNP-R gerichteter Morpholinos liess diese Bande bereits wesentlich schwächer erscheinen, wohingegen bei der Injektion von Mismatch MO auch in höheren Dosen (3,1 ng) keine Schwächung dieser Bande erkennbar war. Dieses Ergebnis zeigt, dass die bei 65 kDa migrierende Bande dem vollständigen hnRNP-R Protein im Zebrafisch entspricht, und dass bereits Morpholidosen von unter 1 ng die Produktion von hnRNP-R Protein wirksam reduzieren.

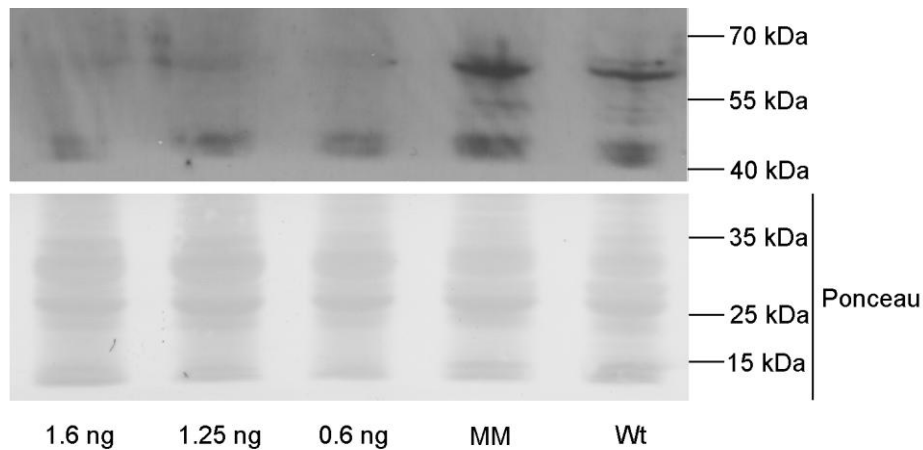


Abb. 5.10: Western Blot von hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Homogenaten mit murinen hnRNP-R Antiserum (83F).

Embryo Extrakte von Injektionsexperimenten in angegebener Morpholino-Dosis. In jeder Spur wurde die Proteinmenge von einem Embryoäquivalent aufgetragen. Gleiche Proteinbeladung wurde mittels Ponceau S-Färbung kontrolliert.

Wt, nicht injizierte Embryo Homogenate. MM, Mismatch Morpholino injizierte Embryo Homogenate.

5.1.7 HnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen führt zu einem Morpholino-Dosis abhängigen axonalen Phänotyp

Die Herzschlagrate der Morpholino injizierten Embryonen erschien im Vergleich zu nicht injizierten wildtypischen Embryonen normal. Allerdings bewegten sich die injizierten Embryonen weniger oft spontan im Vergleich zu Kontroll-Embryonen (vgl. Videos im Supplement von Glinka et al., 2010). Um diesen Effekt des hnRNP-R Knockdowns auf zellulärer Ebene näher zu untersuchen wurden Zebrafisch Embryonen mit 4 % PFA fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Der dabei verwendete *znp1* Antikörper färbt primäre Motoneurone im Zebrafisch (Melancon et al., 1997).

Nach 31 Stunden Embryonalentwicklung sind bei CaP Motoneuronen von nicht injizierten wildtypischen (Abbildung 5.11, A und B) und Mismatch Morpholino (C) injizierten Zebrafisch Embryonen Axone deutlich erkennbar. In jedem Hemisegment sprosst ein Axon aus dem Rückenmark zu seinem Ziel im Somiten, wobei nur gelegentlich Verzweigungen am horizontalen Myoseptum zu beobachten sind (Stern in B).

Bereits bei der niedrigsten injizierten Morpholino Dosis von 0,6 ng (D-F) waren verstärkt zusätzliche Verzweigungen zu beobachten (Pfeilspitzen) und die Länge der Axone war im Durchschnitt signifikant ($P < 0,05$; vgl. Statistik in Abbildung 5.12) reduziert. Vereinzelt waren Axone, mit einer deutlichen Reduktion des Längenwachstums (Abbildung 5.11, Pfeil in E) zu beobachten

Bei 1,3 ng injizierten Morpholinos (G-I) zeigte sich ein ähnlicher Phänotyp. Auch hier erschienen die Embryonen makroskopisch normal (vgl. Abbildung 5.6). Im Vergleich zu Kontrollembryonen (Abbildung 5.11, A-C) zeigten sie jedoch stark verkürzte Axone (Pfeile in G-I; vgl. Statistik in Abbildung 5.12) und vermehrt Verzweigungen (Pfeilspitzen in G-I; vgl. Statistik in Abbildung 5.13).

Bei der höchsten verwendeten MO Dosis von 1,6 ng (Abbildung 5.11, J-L) war der axonale Phänotyp am stärksten ausgeprägt. In einigen Hemisegmenten projizierte kein Axon aus dem Rückenmark zum ventralen Mesenchym (Pfeile in L). Eine stark erhöhte Anzahl mehrfacher Verzweigungen war ebenfalls zu beobachten (Pfeilspitzen in J-L).

Bei dem Mismatch Morpholino injizierten Embryonen war kein Unterschied bezüglich der Axonlänge oder der Anzahl der Verzweigungen im Vergleich zu nicht injizierten Embryonen feststellbar (C; vgl. Statistiken in Abbildungen 5.12 und 5.13). Es kam jedoch zu einer Verdickung des Dottersackes bei einigen Embryonen.

Um die beobachteten erhöhten axonalen Verzweigungen der Motoneurone näher zu untersuchen, wurde die Zahl der Verzweigungen pro Axon in fünf Hemisegmenten je Embryo gezählt und so die durchschnittliche Zahl der Verzweigungen pro Axon bestimmt (Abbildung 5.13). Axone von nicht und Mismatch Morpholino injizierten Embryonen wachsen entlang des Mittellinien Myotoms (*midline myotome*). Bei einigen Axonen sind Verzweigungen am Mittellinien Myoseptum (*midline myoseptum*) zu beobachten. Das horizontale Myoseptum wird als Zwischenziel für die Axone der CaP Motoneurone angesehen (Myers et al., 1986). Zwischen 24 und 48 Stunden der Embryonalentwicklung, erreichen sie den ventralen Bereich des Myotoms (Beattie et al., 2000). In unseren Experimenten wurde das ventrale Myotom von den Axonen der Kontroll-Embryonen nach 31 h erreicht.

Wenn 0,6 ng Morpholino injiziert wurden, konnten keine ungewöhnlichen Verzweigungen der Axone am horizontalen Myoseptum beobachtet werden (Abbildung 5.11, D-F). Die meisten Axone sind bereits über dieses Zwischenziel hinaus gewachsen. Jedoch ist die Zahl der Axone, die noch nicht an ihrem ventralen Ziel angekommen sind, erhöht (Pfeil in E).

Bei der mittleren Morpholino Dosis von 1,3 ng war dieser Effekt verstärkt (Abbildung 5.11, G-I). Wiederum konnten keine abnormen Verzweigungen am horizontalen Myoseptum beobachtet werden, jedoch war die axonale Elongation nach diesem Punkt gestört.

Die Zahl der Axone mit ein oder mehr Verzweigungen, die ventral in Richtung horizontales Myoseptum auswachsen, ist erhöht ($P < 0,001$, vgl. Statistik in Abbildung 5.13). Diese

zusätzlichen Verzweigungen wachsen vor der ventralen Stelle aus, an dem die Axone normalerweise lateral abzweigen (Abbildung 5.11, Pfeilköpfe in G und H).

Zusätzlich war die Zahl der Axone erhöht, die nicht über das erste Zwischenziel am horizontalen Myoseptum auswachsen (Pfeil in G).

Bei einer Dosis von 1,6 ng Morpholinos war die Zahl der Axone, die nicht über diesen Punkt gelangten, noch größer (Pfeile in J und L). Bei einigen Axonen konnten stattdessen relativ lange Äste beobachtet werden, die jedoch nicht ventral auswachsen (Pfeilkopf in K). Andere Axone zeigten ventrales Wachstum, waren jedoch abnorm verzweigt. Auch die Zahl von Axonen, die den ventralen Wendepunkt nicht erreichten, aber kurz nach dem horizontalen Myoseptum falsch verzweigten, war erhöht (Pfeilkopf in L).

Zusammenfassend wurden nach einem Knockdown von hnRNP R in Zebrafisch Embryonen dosisabhängige, abnorme Verzweigungen beobachtet, die mit reduziertem axonalem Wachstum korrespondierten.

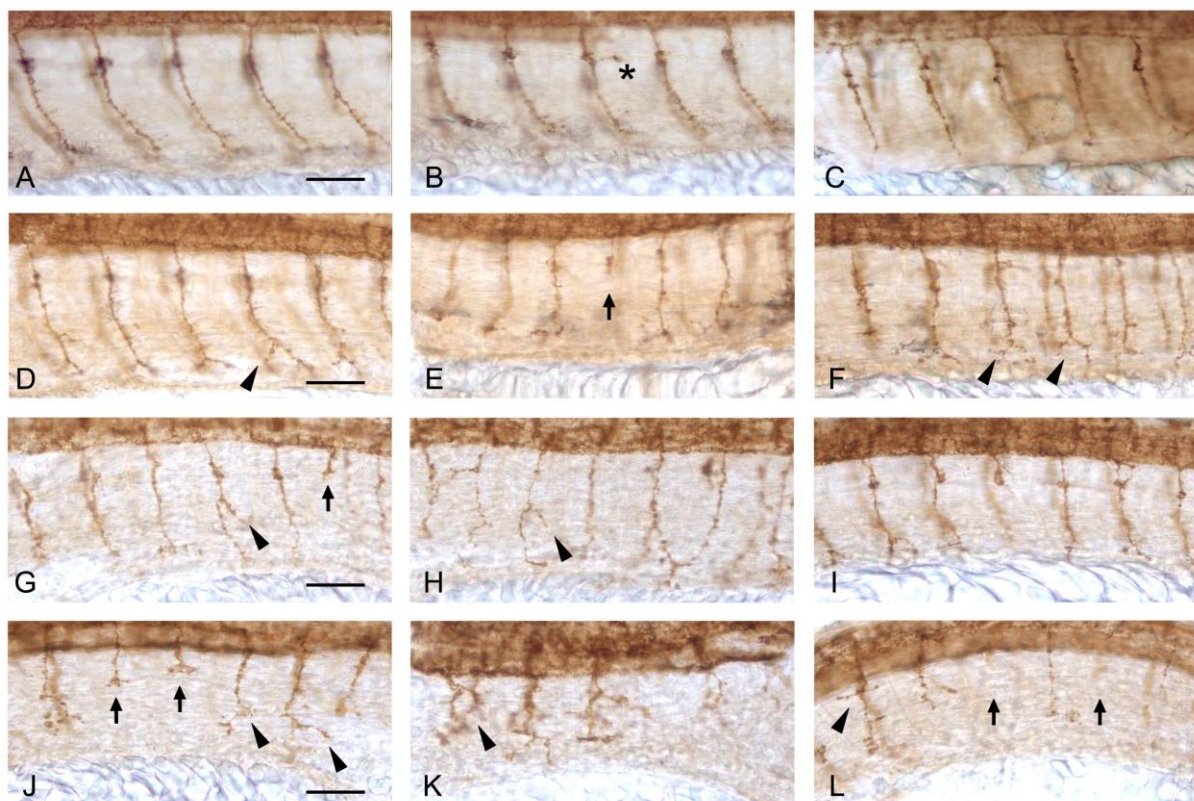


Abb. 5.11: HnRNP-R Morpholino Dosis abhängiger, axonaler Phänotyp bei Zebrafisch Embryonen.

Zebrafisch Embryonen wurden im 1 und 2-Zellstadium mit hnRNP-R Morpholinos, bzw. Mismatch Morpholinos injiziert und bis 31 Stunden nach der Fertilisation gezüchtet. Nach fixieren der Embryonen mit 4 % PFA und DAB-Färbung mit einem znp1-Antikörper, wurden Rumpfsegmente präpariert und mikroskopisch analysiert. Laterale Abbildungen der

Rumpfsegmente (Vergleiche rotes Rechteck in Abbildung 5.6), wobei anterior links und dorsal oben liegt.

A und B, nicht injizierte wildtypische Kontrollen. C, Mismatch Morpholino injizierte Embryonen. HnRNP-R Morpholino injizierte Embryonen: D-F, 0,6 ng; G-I, 1,3 ng; J-L, 1,6 ng. Der Stern in B zeigt eine der seltenen Verzweigungen am horizontalen Myoseptum bei nicht injizierten Embryonen. Pfeilspitzen deuten auf zusätzliche Verzweigungen, die bei höheren Morpholindosen vermehrt zu beobachten waren

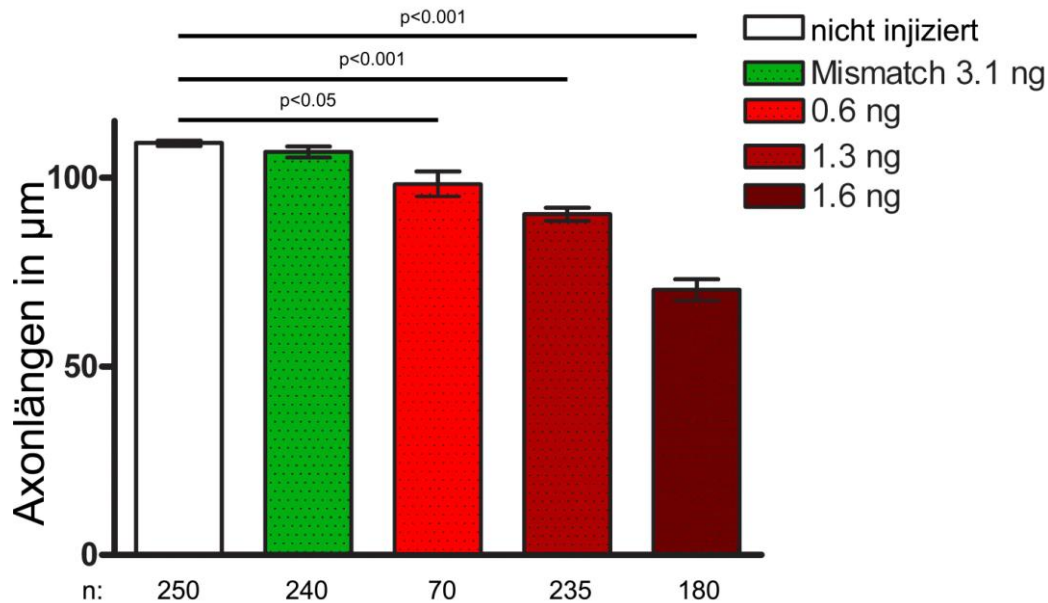


Abb. 5.12: Die Axonlänge von Motoneuronen bei hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Embryonen ist reduziert.

Von jedem Embryo wurden die Axone von primären CaP Motoneuronen aus 5 Hemisegmenten gemessen und der Durchschnittswert für die Statistik verwendet.

n, entspricht der Zahl ausgewerteter Embryonen in der jeweiligen Gruppe.

Die Axone von CaP Motoneuronen Mismatch injizierter Embryonen (106.8 ± 1.43 µm), zeigten keine Reduktion ($p > 0,05$) in der Axonlänge, verglichen mit nicht injizierten Embryonen (109.2 µm ± 0.71). Bei den mit hnRNP-R Morpholino injizierten Embryonen wurde eine dosisabhängige Reduktion von 10% (0,6 ng, 98,3 µm ± 3,3), 17% (1,3 ng, 90,3 µm ± 1,75) und 36% (1,6 ng, 70,3 ± 2,77 µm) beobachtet.

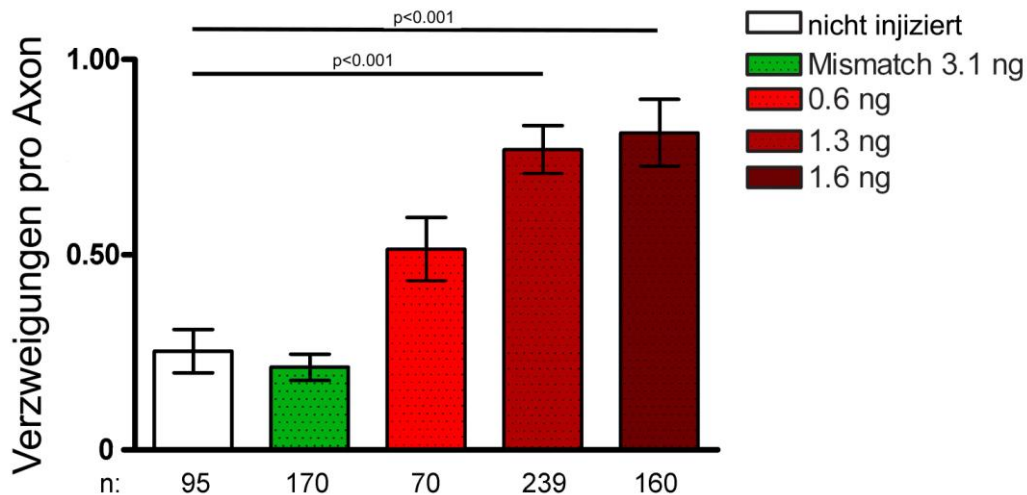


Abb. 5.13: Die Anzahl von axonalen Verzweigungen bei Motoneuronen von hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Embryonen ist erhöht.

Es wurde die Zahl der Verzweigungen von 5 Axonen von CaP Motoneuronen pro Embryo gezählt.

n, entspricht der Zahl ausgewerteter Embryonen in der jeweiligen Gruppe.

Es konnte kein Unterschied ($p > 0,05$) zwischen Mismatch Morpholino und nicht injizierten Embryonen festgestellt werden. Bei den hnRNP-R Morpholino injizierten Embryonen ist ein dosisabhängiger, deutlicher Anstieg abnormer axonaler Verzweigungen zu erkennen.

5.1.8 hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen führt nicht zum Verlust primärer Motoneurone

Der beobachtete axonale Phänotyp nach hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen und der Befund, dass vor allem bei höheren Morpholindosen Axone nicht in der Lage waren, aus dem Rückenmark heraus zu wachsen, führte zu der Fragestellung nach dem Überleben der im Rückenmark angesiedelten CaP Motoneurone. Hierzu wurde das LIM Genprodukt *islet2* als Marker benutzt, um zu untersuchen ob die Zellkörper vorhanden waren, oder ob die Reduktion von hnRNP-R Protein zum Zelltod der Motoneurone und damit zum Verlust der Axone führt.

Im Zebrafisch werden vier Subtypen von Motoneuronen nach der charakteristischen Lage der Zellkörper und den jeweiligen axonalen Projektionsmustern unterschieden (vgl. 5.2.1). CaP und VaP Motoneurone können einfach identifiziert werden, da nur diese beiden Subtypen *islet2* exprimieren (Appel et al., 1995). Zu Beginn der Axogenese (~18 hpf) exprimieren nur CaP und VaP Motoneurone *islet2*, wohingegen MiP und RoP Motoneurone *islet1* exprimieren. Die *islet1* Expression beginnt bei RoP Motoneuronen etwas später als bei MiP Motoneuronen. Weder MiP, noch RoP Motoneurone exprimieren zu irgendeinem Zeitpunkt *islet2* (Hutchinson und Eisen, 2006).

Zur Identifikation der CaP und VaP Motoneuron Zellkörper wurde eine *islet2* spezifische RNA-Sonde für *in situ* Hybridisierungs-Experimente verwendet (Appel et al., 1995; Winkler und Moon, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass zwischen 18 und 20 hpf, CaP und VaP Motoneuron Zellkörper im Vergleich zu Mismatch Morpholino oder nicht injizierten Embryonen nicht reduziert waren (Abbildung 5.14).

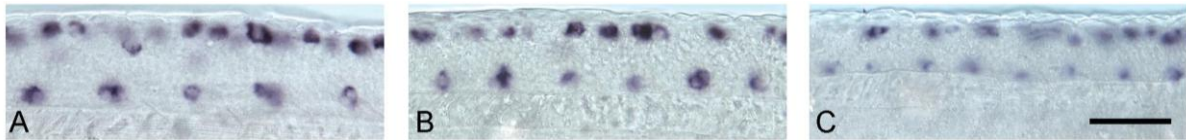


Abb. 5.14: CaP und VaP Motoneurone von hnRNP-R Morpholino injizierten Embryonen sind nicht reduziert.

Laterale Ansicht des Rückenmarks eines nicht injizierten (A), mit Mismatch (B, 1,3 ng) und hnRNP-R (C, 1,3 ng) Morpholino injizierten Embryos (18-20 hpf).

Zellkörper von CaP und VaP Motoneuronen wurden durch eine *islet2* spezifische Sonde in einer *in situ* Hybridisierung markiert. Im Vergleich zu nicht und Mismatch injizierten Embryonen konnte bei den hnRNP-R Morpholino injizierten Embryonen keine Reduktion der vorhandenen Zellkörper in den Rumpfsegmenten festgestellt werden.

Die dorsal über dem Rückenmark gelegenen *islet2* positiven Zellen sind sensorische Rohon-Beard Neuronen. Maßstabsbalken: 50 µm.

Um zu untersuchen, ob dieselben Motoneurone in den folgenden 13 Stunden der Embryonalentwicklung durch Zelltod eliminiert werden, oder auch andere Motoneuron-Populationen betroffen sind, wurde ein monoklonaler Antikörper (39.4D5; Ericson et al., 1992) verwendet, der die *islet1* und *islet2* Proteine erkennt. Auf diese Art und Weise lassen sich 31 Stunden nach der Fertilisation alle Motoneurone in Zebrafisch Embryonen, und zusätzlich auch sensorische Rohon-Beard Neurone, die dorsal vom Rückenmark lokalisiert sind markieren. Bei mit 1,3 ng hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Embryonen konnte weder bei den Motoneuronen, noch bei den Rohon-Beard Neuronen, eine Reduktion der Zellkörperzahl im Vergleich zu nicht injizierten Zebrafisch Embryonen beobachtet werden (Abbildung 5.15).

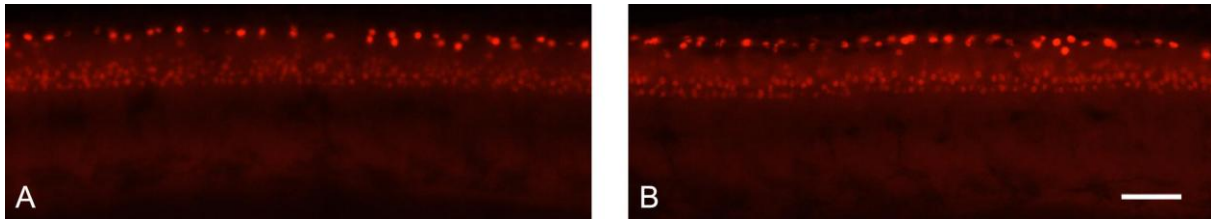


Abb. 5.15: Primäre Moto- und sensorische Rohon-Beard Neurone sind nach hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen nicht reduziert.

Laterale Ansichten eines nicht - (A) und mit hnRNP-R Morpholino injizierten Embryos (B, 1,3 ng), die mit einem monoklonalen Antikörper (39.4D5) gegen *islet1/2* gefärbt wurden. Weder bei der Motoneuron-Population, noch bei den Rohon-Beard-Neuronen sind Unterschiede in der Zellkörperzahl auszumachen. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Zusammenfassend ist es unwahrscheinlich, dass der beobachtete pathologische Phänotyp durch den Zelltod der Motoneurone nach hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen hervorgerufen wird. Darüber hinaus ist das Überleben einer anderen neuronalen Zellpopulation, den sensorischen Rohon-Beard Neuronen, ebenfalls unverändert. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass hnRNP-R Depletion für neuronales Überleben keine entscheidende Rolle spielt.

5.1.9 Andere neuronale Zelltypen sind durch hnRNP-R Knockdown nicht beeinträchtigt

Um zu untersuchen ob die beobachteten axonalen Phänotypen nach hnRNP-R Depletion in Zebrafisch Embryonen Motoneuron spezifisch sind, wurden Interneurone und sensorische Neurone mit einem monoklonalen Antikörper gegen acetyliertes Tubulin gefärbt.

Die berührungsempfindlichen primären Rohon-Beard Neuronen im Rückenmark projizieren ihre Axone in die Epidermis und dorsale Region der kaudalen Schwanzfalte (*fin fold*; Reyes et al., 2004). Die Länge dieser Axone erschien bei hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Embryonen normal, jedoch konnten verstärkt Verzweigungen beobachtet werden (Abbildung 5.16). Dies legt die Vermutung nahe, dass diese sensorischen Neurone ebenfalls bei niedrigen hnRNP-R Mengen beeinflusst werden. Allerdings ist der Effekt wesentlich schwächer ausgeprägt als bei Axonen von CaP Motoneuronen. Auch bei *Smn* defizienten Mäusen konnte ein ähnlicher Phänotyp bei sensorischen Neuronen beobachtet werden (Jablonka et al., 2006).

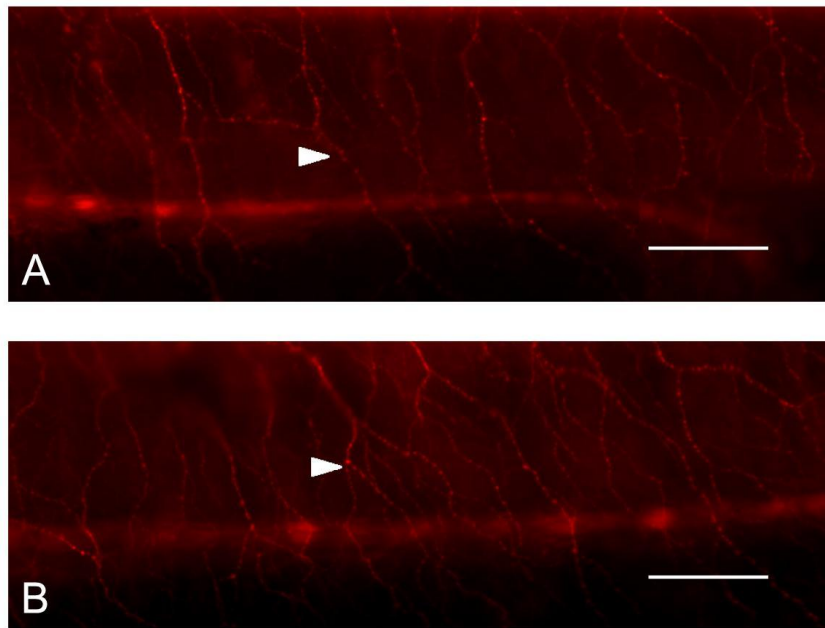


Abb. 5.16: Sensorische Rohon-Beard Neurone weisen kein reduziertes axonale Längenwachstum auf, sind aber stärker Verzweigt.

Laterale Ansicht von nicht injizierten (A) und hnRNP-R Morpholino injizierten Embryonen (B, 1,3 ng), die mit einem monoklonalen Antikörper gegen acetyliertes Tubulin gefärbt wurden. Die Axone der sensorischen Neurone (Pfeilspitzen) weisen keine Reduktion im Längenwachstum auf. Im Vergleich zu Axonen wildtypischer Neurone sind sie aber stärker verzweigt. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Neurone die im Hinter- und Mittelhirn des Zebrafischs gelegen sind und deren Axone im medial longitudinalen oder dem lateral longitudinalen Fasciculus verlaufen (McWhorter et al., 2003) zeigten keine Abnormitäten bezüglich dem axonalen Längenwachstum oder der Häufigkeit von Verzweigungen (Abbildung 5.17).

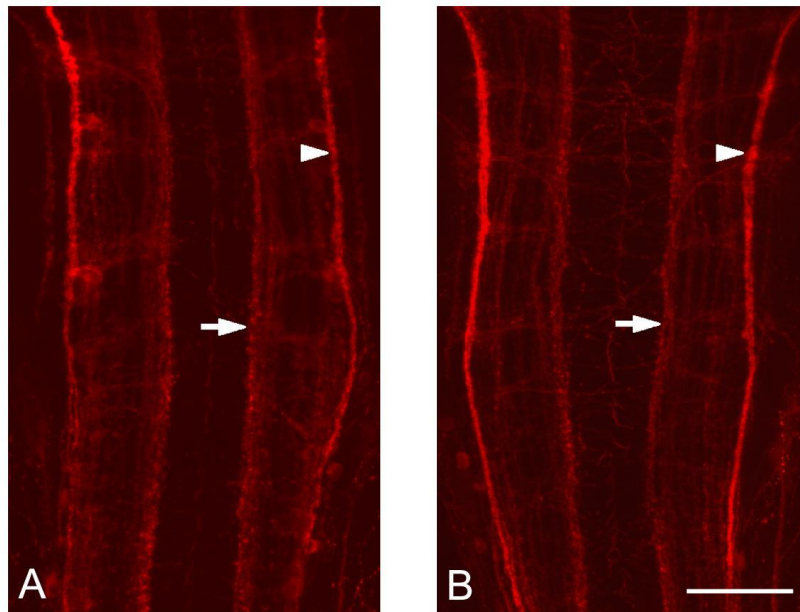


Abb. 5.17: Neurone des Kleinhirns weisen nach hnRNP-R Knockdown keine Abnormitäten auf.

Dorsale Ansicht (Anterior oben) des Kleinhirns von nicht injizierten (A) und hnRNP-R Morpholino injizierten Embryonen (B, 1,3 ng), die mit einem monoklonalen Antikörper gegen acetyliertes Tubulin gefärbt wurden. Die Axone von Neuronen aus dem Hinter- und Mittelhirn projizieren im medialen (Pfeile) longitudinalen oder dem lateralen (Pfeilköpfe) longitudinalen Fasciculus. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Leiter-Ähnlichen Strukturen in wildtypischen oder Morpholino injizierten Embryonen ausgemacht werden. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Auch die sensorischen Neuronen, welche lateral entlang der Körperachse verlaufen (*lateral line sensory neuron*) waren bei hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Embryonen normal ausgebildet (Abbildung 5.18). Dies weist darauf hin dass der Effekt einer reduzierten hnRNP-R Proteinmenge in Axonen von Motoneuronen stärker zum Tragen kommt, als in Neuriten von anderen Neuronen.

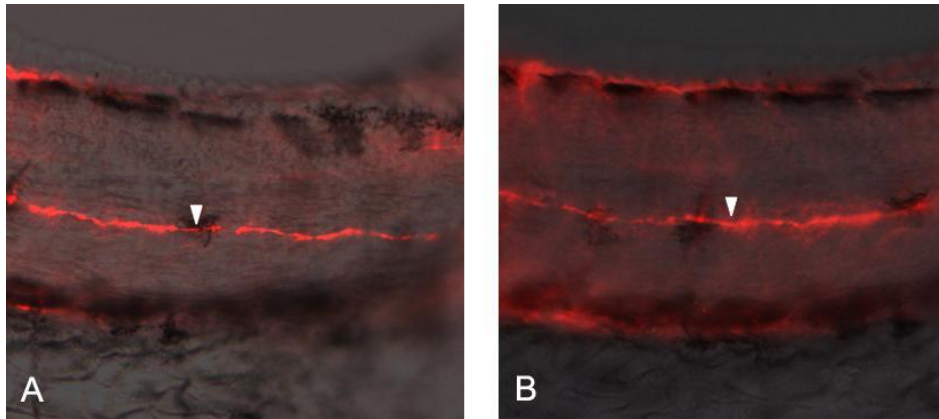


Abb. 5.18: *Lateral line* sensorische Neuronen sind durch einen hnRNP-R Knockdown nicht beeinträchtigt.

Laterale Ansichten eines nicht injizierten (A) und eines hnRNP-R Morpholino injizierten Embryos (B, 1,6 ng), die mit einem monoklonalen Antikörper gegen acetyliertes Tubulin gefärbt wurden. Das *lateral line* sensorische Neuron einer Körperseite erscheint in Embryonen bei denen hnRNP-R in geringen Mengen vorhanden ist normal entwickelt.

Zusammenfassend konnten bei anderen neuronalen Zelltypen von Zebrafisch Embryonen keine auffälligen Veränderungen nach einem hnRNP-R Knockdown festgestellt werden. Lediglich die Axone der Rohon-Beard Neurone zeigten leicht erhöhte Verzweigungen, wie es auch für SMN defiziente sensorische Neuronen der Maus gezeigt wurde (Jablonka et al., 2006). Es ist daher davon aus zu gehen, dass der bei Zebrafisch Embryonen beobachtete axonale Phänotyp nach hnRNP-R Knockdown, Motoneuron spezifisch ist und diese Neuronen am stärksten beeinträchtigt wurden.

5.1.10 Murine hnRNP-R mRNA kann den durch hnRNP-R Knockdown verursachten axonalen Phänotyp von Zebrafisch Embryonen weitestgehend aufheben

Murine und Zebrafisch hnRNP-R mRNA sind in dem 25 Nukleotide langen Sequenzbereich an dem die Morpholinos binden, nur zu etwa 52 % identisch. Daher ist davon auszugehen, dass gegen Zebrafisch hnRNP-R mRNA gerichtete Morpholinos nicht an die murine mRNA binden und somit die Translation stattfinden kann. Da murines und hnRNP-R des Zebrafisches auf Proteinebene hoch homolog sind, ist zu erwarten, dass murines hnRNP-R das depletierte Zebrafisch Protein funktionell ersetzen kann.

Der durch 1,3 ng injizierte hnRNP-R Morpholinos verursachte axonale Phänotyp primärer Motoneurone konnte durch gleichzeitige Injektion von 50 pg muriner hnRNP-R mRNA weitestgehend aufgehoben werden (Abbildung 5.19, F und H). Die Axone der CaP Motoneurone waren signifikant länger als bei den nur mit Morpholino injizierten Embryonen, jedoch immer noch 6 % kürzer als in der nicht injizierten Kontrollgruppe (H). Höhere

Konzentrationen muriner mRNA resultierten in stark dorsalisierten Embryonen mit fehlerhafter Segmentierung der Körperachse (G). Wurden mehr als 50 pg muriner mRNA zusammen mit hnRNP-R Morpholinos injiziert, entwickelten die Embryonen einen Phänotyp, der denen von nur mit muriner mRNA injizierten Embryonen entsprach, jedoch mit einer höheren Sterblichkeitsrate. Geringere Mengen mRNA waren nicht in der Lage, den durch die hnRNP-R Morpholinos verursachten Phänotyp, signifikant zu kompensieren.

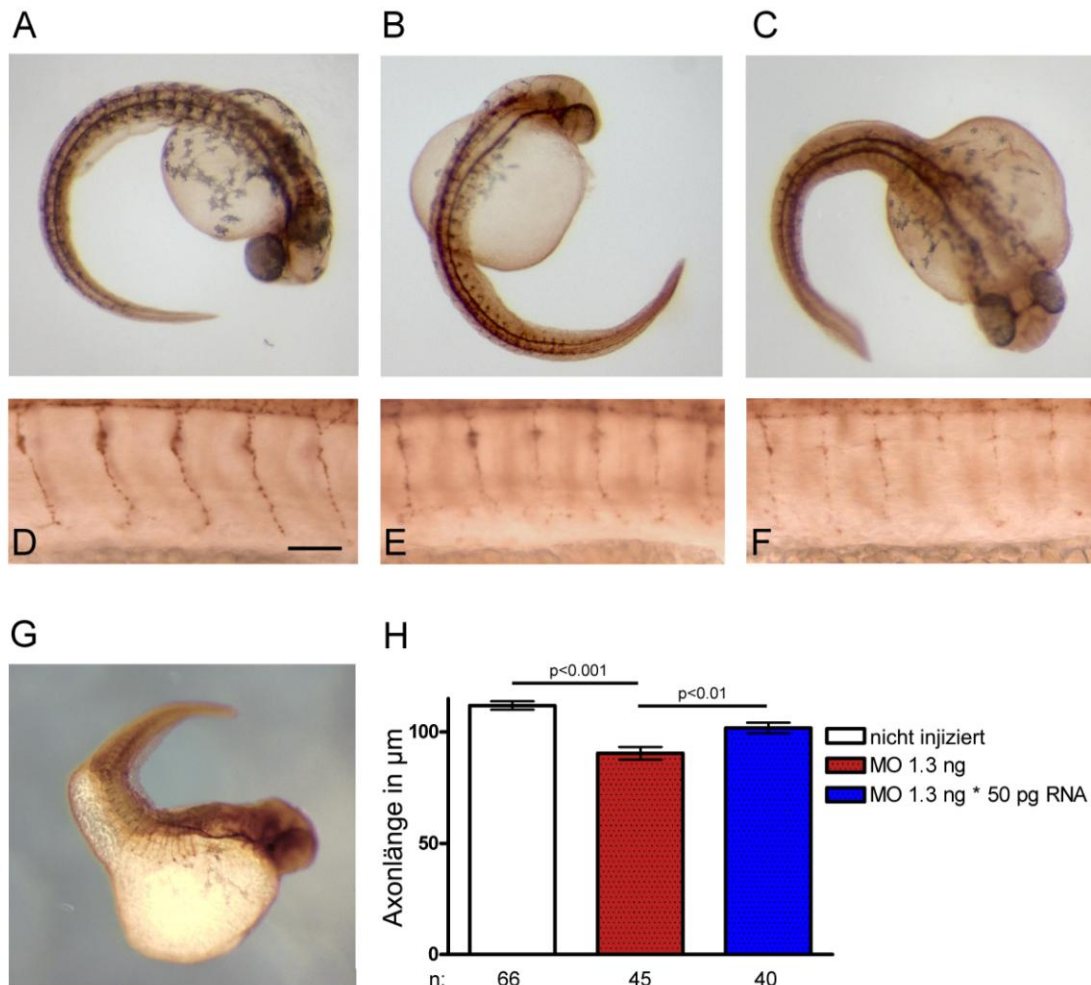


Abb. 5.19: Murine hnRNP-R mRNA ist teilweise in der Lage den durch hnRNP-R Knockdown verursachten axonalen Phänotyp von primären CaP Motoneuronen im Zebrafisch aufzuheben.

Gesamte (A-C) und vergrößerte Ansichten (D-F) von nicht injizierten (A, D), mit hnRNP-R Morpholinos (B, E; 1,3 ng) und hnRNP-R Morpholinos (1,3 ng) zusammen mit muriner mRNA (50 pg) injizierten (C, F) Zebrafisch Embryonen.

Die Embryonen wurden einer DAB-Färbung unter Verwendung des znp1 Antikörpers unterzogen. (G) Injektion von 50 pg muriner hnRNP-R RNA führte zu dorsalisierten Embryonen mit fehlerhafter Segmentierung der Körperachse. (H) Statistische Auswertung der Axonlängen. Die Koinjizierte murine hnRNP-R mRNA bewirkte ein signifikant längeres axonales Wachstum, als bei nur mit hnRNP-R Morpholinos injizierten Embryonen. Maßstabsbalken: 50µm.

5.2 Herstellung eines hnRNP-R Knockout Konstruktes durch Rekombination in *E. coli*

Ziel des Projektes war es, durch gezielte Genmodifikation eine hnRNP-R defiziente Mauslinie zu erzeugen. Nachdem klassische Verfahren zur Erzeugung einer hnRNP-Knockout Maus nicht erfolgreich waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Ansatz verfolgt.

Hierbei sollte durch homologe Rekombination *in vivo* in *E. coli* ein künstliches bakterielles Chromosom (*Bacterial artificial chromosome*, BAC), das das genomische hnRNP-R Fragment der Maus enthält, manipuliert werden. Dabei wird ein Teil des genomischen Fragments deletiert und durch eine Selektionskassette ersetzt. Der Vorteil eines so modifizierten BAC Klons ist, dass die an die Deletion grenzenden Bereiche, länger als bei klassischen Konstrukten sind. Da diese Donor-Sequenzen homolog zur genomischen Empfängersequenz sind, spricht man von Homologiearmen.

5.2.1 Gerichtete *in vivo* Modifizierung eines hnRNP-R BAC Klons durch λ -vermittelte homologe Rekombination

Zunächst wurde in der genomischen hnRNP-R Sequenz der Maus ein geeigneter BAC Klon durch eine Datenbanksuche identifiziert. Dieser BAC Klon (RP24-363E15) enthält ein genomisches Fragment von ~204 kb Länge (135449594:135653474) welches die vollständige hnRNP-R Sequenz sowie 136,6 kb upstream vom Start-, bzw. 41,4 kb downstream vom Stop-Codon umfasst. Diese seitlichen Überhangsequenzen dienen bei der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen als Homologiearme. Zur Modifikation des BAC Klons wurde das „*Quick & Easy BAC Modification Kit*“ von Gene Bridges verwendet. Dieses Kit basiert auf einem Protokoll das von Francis Stewart am EMBL entwickelt wurde und wird als Red/ET Rekombination oder auch λ -vermittelte Rekombination bezeichnet. *E. coli* Bakterien exprimieren dabei Proteinpaare aus Phagen, entweder RecE/RecT aus dem λ -Prophagen oder Red α /Red β vom λ -Phagen. Diese Proteinpaare sind in ihrer Funktion Äquivalent. RecE/Red α sind 5'-3'-Exonucleasen und RecT/Red β sind Proteine, die Einzelstrang DNA binden und das Anlagern zueinander homologer DNA Sequenzen vermitteln. Dadurch wird die homologe Rekombination der Donor- und Empfänger-Sequenzen ermöglicht (Abbildung 5.20).

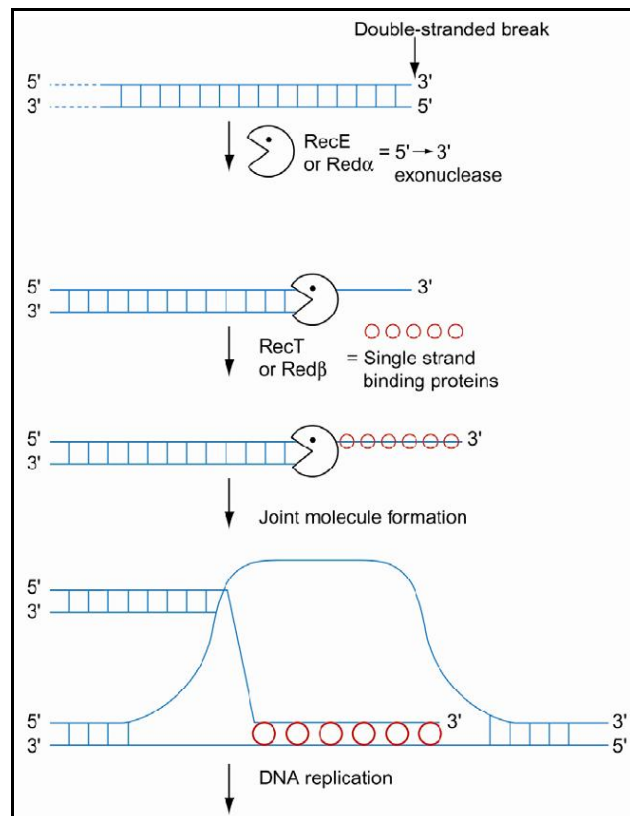


Abb. 5.20: Schematischer Ablauf der λ -vermittelten homologen Rekombination in *E. Coli*.

Durch die rekombinanten Proteinpaare RecE/RecT, bzw. Red α /Red β wird die Reparatur der DNA nach einem Doppelstrangbruch eingeleitet. Red α /RedE verdaut zunächst ausgehend von einem Doppelstrangbruch einen DNA-Strang. Dadurch bleibt ein Einzelstrang mit einem 3'-Überhang übrig, an den Red β /RedT bindet. Dieses DNA-Protein-Hybrid bindet an homologe DNA-Sequenzen und dient als Primer für die folgende DNA-Replikation. Abbildung aus dem Gene Bridges Protokoll übernommen.

Zunächst wurde ein Tn5-neo PCR-Produkt, welches rechts und links von Homologiearmen flankiert ist, für die Rekombination in *E. coli* erzeugt. Dazu wurden 2 Oligos entworfen, die jeweils einen homologen Bereich von 50 Basenpaaren ((N)₅₀) links bzw. rechts von der gewünschten Deletion enthalten (Abbildung 5.21, A, A'). Am 3'-Ende der Oligos wurden Sequenzen für die Amplifikation der Neo-Kassette angefügt (B, B').

Die (N)₅₀ Sequenzen wurden hierbei aus der genomischen hnRNP-R Sequenz unmittelbar am Startcodon (Oligo 1) bzw. am Stopcodon (Oligo 2) gewählt, was zu einer vollständigen Deletion der genomischen hnRNP-R Sequenz führt. Die Sequenzen für die Amplifikation der Tn5-Neo Kassette (B, B') sind durch das Protokoll vorgegeben.

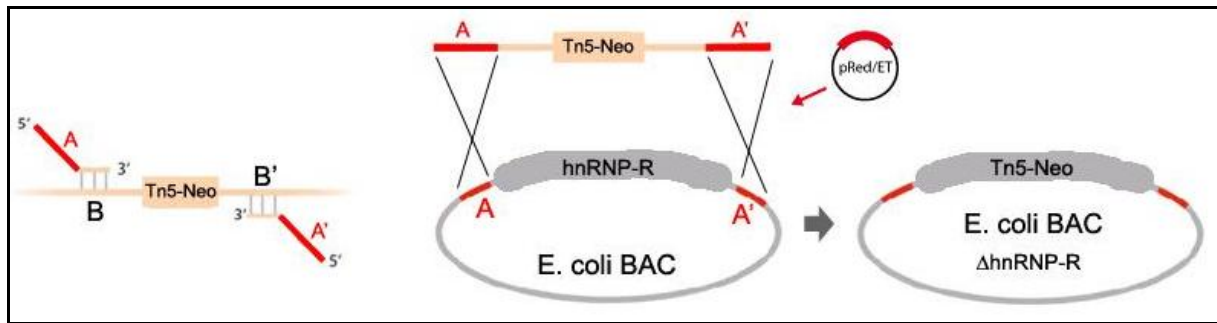


Abb. 5.21: Schema zum Entwurf der Oligos für ein Tn5-Neo PCR Produkt und homologe Rekombination in einem *E. coli* BAC Wirt.

Die PCR-Primer für die Amplifikation des Tn5-Neo Produktes besitzen an ihren 5'-Enden 50 Basenpaare, die zur genomischen Sequenz des zu deletierenden Zielgens homolog sind (A, A'). Am 3'-Ende befinden sich komplementäre Sequenzen, die eine Amplifikation der Tn5-Neo Kassetten ermöglichen. Dieses PCR Produkt wird in *E. coli* transformiert, die neben dem BAC mit der genomischen Zielsequenz auch das pRed/ET Expressionsplasmid tragen.

Durch L-Arabinose wird die Expression der für die homologe Rekombination benötigten Proteine induziert. Die zwischen den Homologiearmen (A, A') gelegene Zielsequenz (hnRNP-R) des BAC Klon, wird durch die Selektionskassette (Tn5-Neo) in einem Crossover Zwischenschritt ersetzt. Abbildung nach dem Gene Bridges Protokoll.

Es wurde eine PCR mit diesen Oligos und einer Tn5-neomycin Template DNA (vom Hersteller geliefert) durchgeführt. Parallel wurden elektrokompente *E. coli* Bakterien, die den hnRNP-R BAC Klon tragen, mit dem Red/ET-Expressionsplasmid (pRedET) transformiert. Da das pRedET eine Tetracyclin Resistenz trägt und Temperatursensitiv ist, müssen die Zellen bei 30° C kultiviert werden. Diese Zellen wurden nach erfolgreicher Anzucht wiederum elektrokompent gemacht und mit dem linearen Tn5-Neo PCR Fragment transformiert. Durch Zugabe von L-Arabinose (Sigma) wird die Expression des pRedET induziert und die für die λ -vermittelte Rekombination benötigten Proteine produziert.

Die induzierten Zellen wurden nun elektrokompent gemacht und mit dem linearen Tn5-Neo PCR-Produkt transformiert. Durch anschließendes Inkubieren über Nacht bei 37° C und einem Wechsel des Antibiotikums von Tetracyclin zu Kanamycin, geht das Red/ET-Expressionsplasmid verloren und gleichzeitig wird der modifizierte BAC Klon stabilisiert.

Die so gewonnen modifizierten BAC Klone wurden auf die Rekombination der Tn5-Neo Kassetten mittels PCR überprüft (Abbildung 5.22). Dazu wurden je ein Primer in die Tn5-Neo Kassetten und ein korrespondierender Primer außerhalb der Deletion, in die flankierenden Bereiche der BAC Sequenz gelegt. Von 20 gepickten Klonen waren 16 auf beide PCRs positiv.

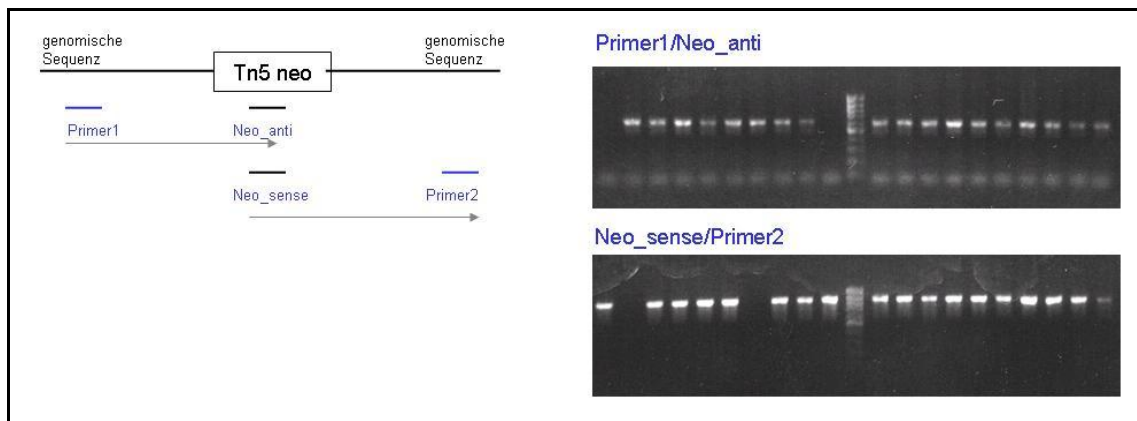


Abb. 5.22: PCR Test der modifizierten hnRNP-R BAC Klone

80 % der getesteten BAC Klone zeigen in zwei unabhängigen PCRs das gewünschte homologe Rekombinations-Ereignis. Es wurde jeweils ein Primer vor, bzw. nach der hnRNP-R Deletion (Primer1/2) gelegt und der dazu passende entgegengesetzt gerichtete Primer in die Tn5-Neo Kasette (Neo_anti/sense), welche die hnRNP-R Sequenz ersetzt.

5.2.2 Southern Blot Charakterisierung von Δ hnRNP-R BAC Klone

Um die PCR positiven modifizierten BAC Klone zu testen wurde als nächstes ein Southern Blot mit zwei Sonden vor und nach der Deletion durchgeführt.

Die zu erwarteten Fragmente nach Verdau der BAC DNA sind bei nicht modifizierter hnRNP-R BAC Sequenz 4,4 und 4,6 kb. Durch die Deletion sind bei einer modifizierten BAC Sequenz 1,7 und 3,3 kb zu erwarten (Abbildung 5.23).

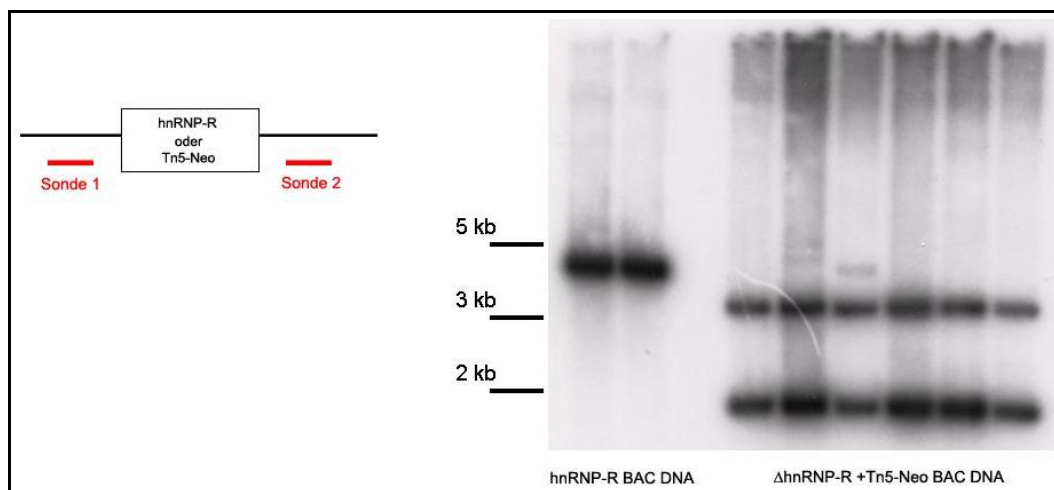


Abb. 5.23: Southern Blot von Δ hnRNP-R BAC Klone.

Die erwarteten Fragmentgrößen von 1,7 und 3,3 kb sind bei den modifizierten BAC Klone (Δ hnRNP-R+Tn5-Neo) deutlich zu sehen. Bei den nicht modifizierten hnRNP-R BAC Klone, die als Kontrolle mitgeführt wurden, liegen die Fragmentgrößen von 4,4 und 4,6 kb zu eng zusammen, sodass sie auf dem Gel nicht vollständig aufgelöst wurden. Sie erscheinen als eine Bande, die aber ca. doppelt so intensiv ist wie die einzelnen Signale bei den modifizierten BAC Klone. Es ist davon auszugehen, dass beide Sonden (1+2) an die Restriktionsfragmente (4,4 + 4,6 kb) gebunden haben.

5.2.3 Southern Blot Charakterisierung von elektroporierten Stammzellklonen

Ein modifizierter BAC Klon wurde 24 Stunden bei 30° C kultiviert. Anschließend wurde ein modifiziertes DNA Präparations-Protokoll, ohne Affinitätssäulen verwendet und diese DNA mittels eines CsCl-Gradienten unter Ultrazentrifugation gereinigt. Die gereinigte BAC DNA wurde zunächst durch einen NotI-Restriktionsverdau linearisiert und anschließend in Stammzellen elektroporiert. Nach Anwachsen der Zellen unter G418 Selektion, konnten Klone gepickt und DNA für Southern Blot Experimente gewonnen werden.

Da bei einem homologen Rekombinations-Ereignis der gesamte BAC Klon in das Maus Genom integrieren kann, sind PCR Reaktionen für das Testen der Stammzellklone auf korrekte homologe Rekombination ungeeignet. Die seitlich der Deletion gelegenen Homologiearme sind zu groß um mittels PCR überspannt werden zu können. Eine Möglichkeit besteht darin, durch quantitative PCR, Rückschlüsse auf die Zahl der Genkopien zu ziehen. Für das vorliegende hnRNP-R Knockout-Konstrukt wurde ein quantitativer Southern Blot durchgeführt. Dabei wird versucht zwischen wildtypischer Situation (2 Allele), nicht homologer (zufälliger) Rekombination (2 Allele + Neo) und erfolgreicher homologer Rekombination (1 Allel + Neo bzw. kein Allel + 2x Neo) zu unterscheiden, indem man Rückschlüsse auf die Gendosis zieht.

Dazu wurde eine Sonde (Hn2819bh3) in die genomische hnRNP-R Sequenz gelegt, die ein 2819 Basenpaar großes Fragment nach einem HindIII Verdau markiert. Diese Sonde bindet nicht an das rekombinierte Δ hnRNP-R Fragment. Eine Rekombination des Δ hnRNP-R BAC Konstruktes kann homolog auf einem Allel des murinen hnRNP-Rs erfolgen (Heterozygot) oder unwahrscheinlicher, auf beiden Allelen gleichzeitig (Homozygot). Es kann jedoch auch zu einer nicht homologen Rekombination an einem beliebigen Ort im Genom kommen, wobei es zu einer vollständigen Integration des modifizierten BAC Klons kommt. In letzteren Fall würde die Stammzelle durch die integrierte Tn5-Neo Kasette die G418 Selektion überstehen, aber weiterhin zwei wildtypische hnRNP-R Allele tragen. Eine genomische Kontrolle, die als Referenz für eine im Verhältnis zum Zielgen unveränderte Gendosis genutzt wird, ist notwendig. Hierzu wurde eine IMP1 spezifische Sonde (I1c4436h3) entworfen, die ein 4436 bp großes Fragment nach einem HindIII Verdau markiert.

Durch Messen der Signalstärke der Banden im Southern Blot und vergleichender quantitativer Analyse (Aida Image Analyzer Software) kann eine Aussage über die Gendosis des Zielgens

getroffen werden. Hierbei wurde der Hintergrund der jeweiligen Spur von den Signalstärken der beiden gemessenen Banden subtrahiert (Abbildung 5.24).

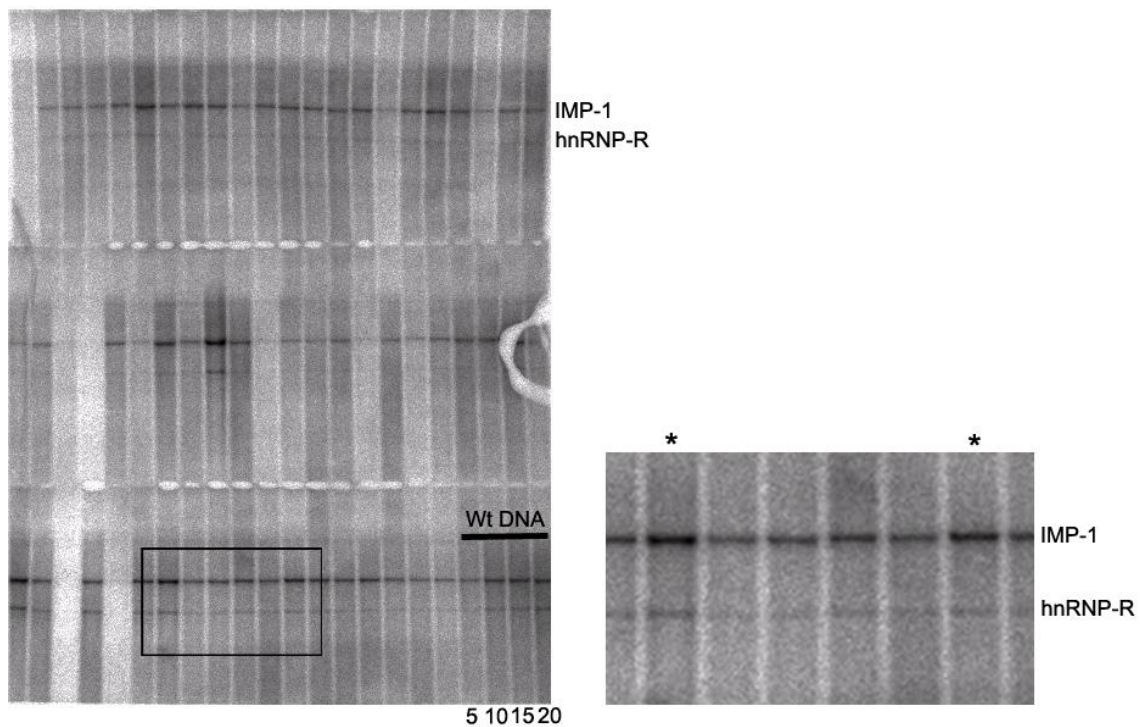


Abb. 5.24: Quantitativer Southern Blot von Δ hnRNP-R BAC elektroporierten embryonalen Stammzellklonen.

Pro Spur wurden $\sim 10\mu\text{g}$ embryonale Stammzell DNA, die mit HindIII linearisiert war, aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte bei 64°C mit der hnRNP-R und IMP1 Sonde parallel. Im unteren rechten Bereich des Blots wurde DNA von wildtypischen Stammzellen in unterschiedlichen Mengen aufgetragen um die Sensitivität des Blots zu bestimmen. Bereits ab $5\mu\text{g}$ DNA ist ein deutliches Signal zu erkennen. Vergrößerter Bereich: Zwei mögliche homolog rekombinierte Klone, bei denen die hnRNP-R Gendosis halbiert ist, sind durch Sterne markiert.

Die in den Southern Blot Quantifizierungen, auf ein homologes Rekombinations-Ereignis, positiv befundenen Stammzellklone, wurden bislang mehrfach in Mausembryonen injiziert, es ist jedoch bis dato kein chimäres Tier gefunden worden.

5.3 Präparation axonaler RNA von Kulturen primärer Maus Motoneuronen

Ziel des Projektes ist es RNAs aus den axonalen Kompartimenten von primären Motoneuronkulturen zu gewinnen und damit Gen-Array Studien bzw. quantitative RT-PCR Analysen durchzuführen. Die Fragestellung ist, ob es bei Knockout oder Knockdown von Zielgenen wie hnRNP-R, SMN, TDP43, IMPs oder auch anderen evtl. an RNA Transport, bzw. Translokation beteiligten Proteinen zu Veränderungen in der RNA Populationen der Axone, bzw. Wachstumskegeln kommt. Neue bisher unbekannte Transkripte, die an diesen Prozessen beteiligt sind oder von RNA-Transport Komplexen transloziert werden, ließen sich mit dieser Technik ebenfalls identifizieren. Bisher ist es nicht gelungen die Axone primärer embryonaler Motoneurone gerichtet wachsen zu lassen, da Zielführungssignale (*guidance cues*) für Motoneurone bislang nicht eindeutig beschrieben worden sind. Daher ist es schwierig axonale RNAs in für Array-Studien ausreichenden Mengen zu gewinnen.

5.3.1 Primäre Maus Motoneuron Kulturen auf PEN Membranen für die Laser-Mikrodissektion (LMD) von Wachstumskegeln

Ein erster experimenteller Ansatz bestand darin, primäre embryonale Maus Motoneurone (E13) auf Polyethylene Naphthalat (PEN) Trägermembranen zu kultivieren, Wachstumskegel unter dem Mikroskop zu lokalisieren, zu markieren und schließlich mit dem Laser auszuschneiden. Die Membranfragmente mit den Wachstumskegeln sollten in einem RNA stabilisierenden Lysis-Puffer gesammelt werden und anschließend RNA für eine lineare Amplifikation isoliert werden. WillCo-Schälchen, die eine PEN-Membran als Matrix besitzen, wurden zunächst mit Poly-Ornithin und anschließend mit Laminin beschichtet. Die Motoneurone wurden, für sieben Tage mit BDNF und CNTF kultiviert.

Es hat sich gezeigt, dass die feinen axonalen Strukturen von Motoneuronen unter dem Mikroskop, nicht bzw. kaum erkennbar waren. Da Polyethylene-Naphthalat eine wirksame Gas-Barriere darstellt, sind die Membranen perforiert damit die Zellen ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Diese Poren führen sowohl im Durchlicht, als auch im Phasenkontrast zu einem starken Hintergrund sodass zelluläre Strukturen wie Axone und Wachstumskegel nicht zu erkennen sind (Abbildung 5.25).

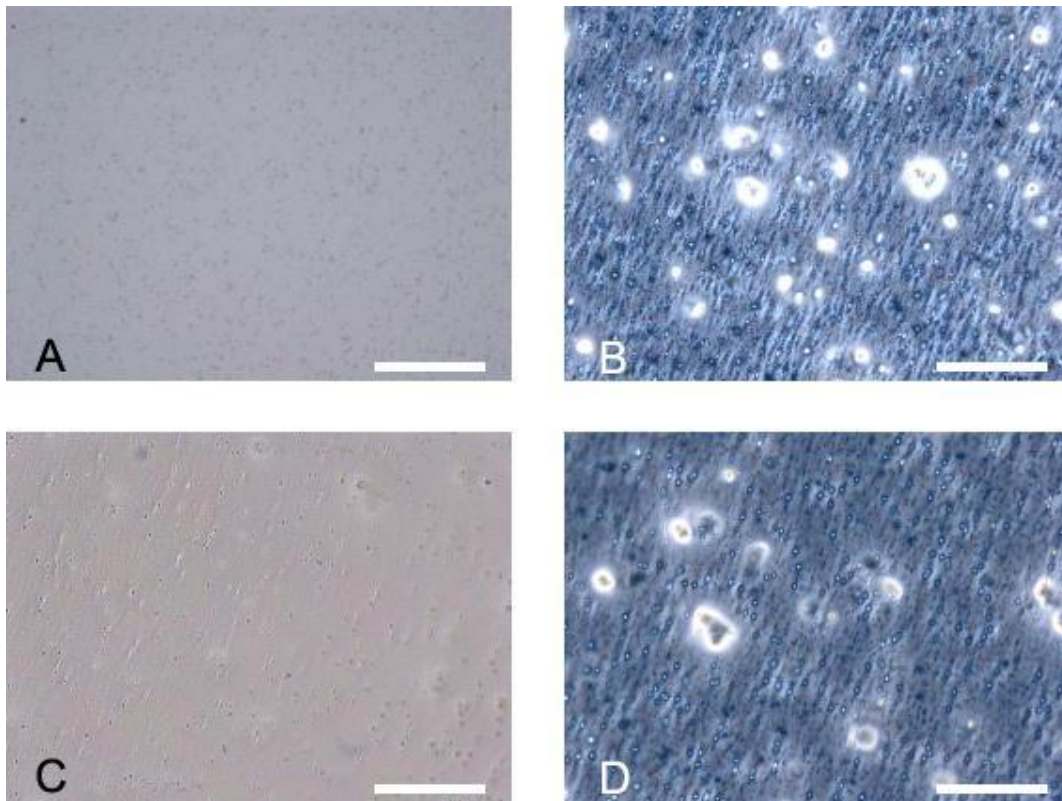


Abb. 5.25: Durchlicht- und Phasenkontrast-Aufnahmen von primären Motoneuronkulturen auf PEN Membranen.

Aufnahmen von 5 Tage alten primären Motoneuronkulturen, die auf PEN-Membranen in Gegenwart von BDNF und CNTF (je 5 ng/ml) kultiviert wurden.

Die PEN-Membranen erzeugen sowohl im Durchlicht (A, C), als auch im Phasenkontrast (B, D) starken Hintergrund, der das lokalisieren von Axonen und Wachstumskegeln nahezu unmöglich macht. A, B, 20x Objektiv. B, D, 40x Objektiv. Maßstabsbalken: 50 µm.

Die primären Motoneurone wurden daraufhin am Tag des Ausplattierens mit einem Lentivirus infiziert, der das fluoreszierende Protein eGFP exprimiert (Virus zur Verfügung gestellt von T. Hermann). Unter Fluoreszenzlicht war es nun möglich Zellkörper von primären Motoneuronen und deren Axone zu identifizieren (Abbildung 5.26, A). Die Kulturen wurden nicht fixiert, da eine schlechtere Ausbeute und Qualität der RNA bei quervernetzenden Fixierungsmethoden erwartet wurde. Da die Laser-Mikrodissektion normalerweise fixierte und getrocknete Präparate voraussetzt, wurde das Medium direkt vor Beginn der Experimente soweit wie möglich, aber nicht vollständig abgenommen. Die Membranen trocknen innerhalb von 30 Minuten ein und erzeugen dabei eine zunehmende Autofluoreszenz die es enorm erschwert die zellulären Strukturen zu identifizieren (B). Versuche mit einer nicht quervernetzenden HOPE (Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect) Fixierung, waren nicht erfolgreich, da die PEN-Membran und die Kulturschalen durch die Reagenzien (insbesondere Aceton) angegriffen wurden. Da die Kulturen beim Mikroskopieren ohne Medium rasch eintrockneten und somit eine starke

Fragmentierung der RNA zu erwarten war, wurde die Kultivierung von primären Motoneuronen auf PEN-Membranen zunächst nicht weiter verfolgt.

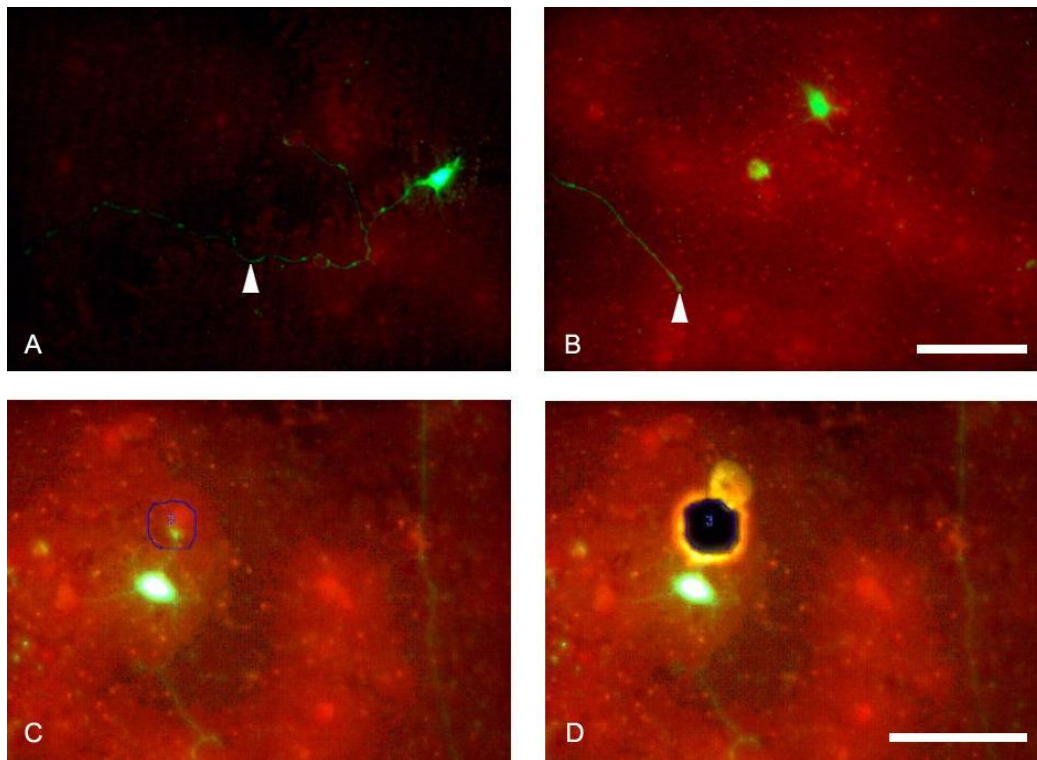


Abb. 5.26: Fluoreszenz Aufnahmen von GFP exprimierenden primären Motoneuronen auf PEN Membranen.

Durch das GFP Signal lassen sich sowohl die Zellkörper der Motoneurone, als auch die Axone (A, Pfeilspitze), bzw. die Wachstumskegel (B, Pfeilspitze) lokalisieren. Jedoch erzeugen die eintrocknenden PEN Membranen ein stark fluoreszierendes Hintergrundsignal A, innerhalb von ca. 10 Minuten aufgenommenes Bild mit nur leichtem Hintergrund. B, im weiteren Verlauf, nach weiteren 20 Minuten aufgenommenes Bild mit stärkerem Hintergrund. C, markierter Wachstumskegel (Kreis). D, Mit dem Laser ausgeschnittener Bereich.

A, B, 20x Objektiv; C, D, 40x Objektiv. Maßstabsbalken: 50 μm .

5.3.2 Kultivierung von primären Maus Motoneuronen auf Deckgläschen für die Laser-Mikrodissektion von Wachstumskegeln

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen bestand darin die Motoneuron Kulturen auf Deckgläsern zu kultivieren und zu versuchen die Neuriten, bzw. Wachstumskegel von der Glasoberfläche mit dem Laser zu schneiden. Hierzu wurde ein Adapter angefertigt, der es ermöglicht, 10mm Deckgläser mit dem LMD-Mikroskop zu verwenden. Die Kulturen waren wiederum nicht fixiert und das Medium wurde kurz vor Beginn der Experimente abgenommen, ohne die Zellen ganz trocken fallen zu lassen.

Es hat sich gezeigt, dass nur Zellkörper knapp oberhalb der Glasoberfläche erfasst werden können (Abbildung 5.27, A, B). Bei Neuriten und Wachstumskegel gelang dies nicht, da sie

zu flach sind. Die Zellkörper wurden bei dieser Vorgehensweise regelrecht pulverisiert, sodass es fraglich ist ob intakte RNA gewonnen werden kann. Es hat sich aber gezeigt, dass es möglich ist, den Laserstrahl knapp unter der Glasoberfläche zu fokussieren. Dadurch werden Bruchstücke aus dem Glass gesprenzt, an denen Zellfragmente haften sollten (C, D).

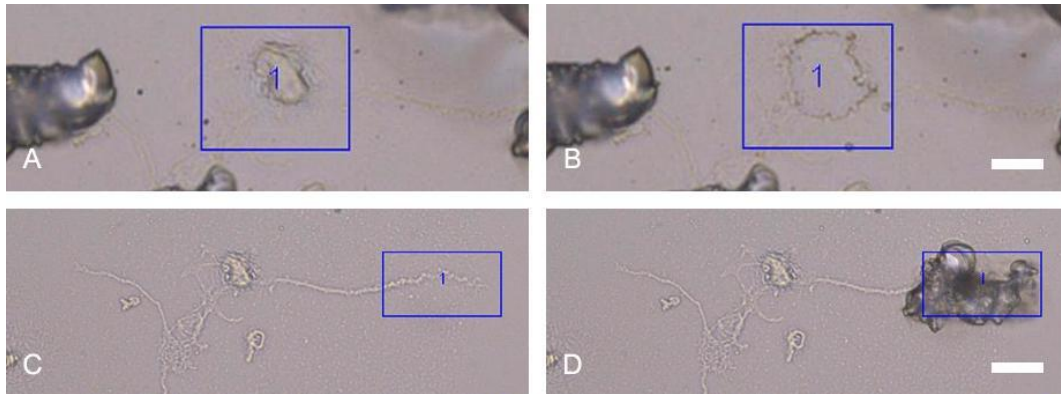


Abb. 5.27: Versuche Zellkompartimente mittels Laser Mikrodisektion von einer Glasoberfläche zu schneiden.

Primäre Motoneuronen wurden auf Deckgläschen in Gegenwart von BDNF und CNTF kultiviert.

A, zeigt einen Zellkörper in einem markierten Bereich (blaues Rechteck, 1). B, Gleiches Bild nach dem Schneiden. Der Zellkörper wurde erfolgreich von der Glasoberfläche entfernt.

C, zeigt ein markiertes distales Axon vor dem Schneiden. D, Nach dem Schneiden in die Glasoberfläche, bei der Glasbruchstücke abgesplittert wurden. Maßstabsbalken: 10 μ m.

In dem Zeitraum, bis die Zellen vollständig eingetrocknet sind, können durchschnittlich nur ca. 100 Wachstumskegel markiert und ausgeschnitten werden. Daher ist von einer starken Fragmentierung der nicht quervernetzten RNA auszugehen. Versuche RNA mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen) RNA aus gesammelten Proben zu extrahieren waren nicht erfolgreich. Es konnte keine RNA aufgereinigt werden. Wahrscheinlich wurden zuwenig Wachstumskegel isoliert um ausreichend RNA Material für einen Nachweis bzw. quantitativer RT-PCR Analysen zu gewinnen. Um in die Glasoberfläche zu schneiden wird eine höhere Laser-Energie benötigt, als zum schneiden von PEN-Membranen. Auch wenn der Laserimpuls nur sehr kurz auf die Zellstrukturen und damit auf Nukleinsäuren einwirkt, so ist eine Fragmentierung von Nukleinsäuren durch den verwendeten UV-Laser möglich, wodurch die Gesamtausbeute reduziert wird.

5.4 Kompartimentierte Kulturen von Neuronen

Ein weiterer Ansatz für die Gewinnung axonaler RNA besteht darin, die Axone durch gerichtetes Wachstum in kompartimentierten Kammersystemen von den Zellkörpern zu separieren. Bislang konnten noch keine Neurone des zentralen Nervensystems erfolgreich in Campenot-Kammern kultiviert werden (Park et al., 2009). Die „Microfluid Neuron Devices“ der Firma „Xona Microfluidics“ sind Kammersysteme die für die Kultivierung von Neurone des zentralen Nervensystems geeignet sind.

Die Elemente bestehen aus einem Silikonpolymer (Polydimethylsiloxan, PDMS) und besitzen zwei durch Mikrokanäle verbundene Kompartimente (Abbildung 5.28). In einer Ausführung sind die Mikrokanäle zwischen linkem und rechtem Kompartiment nur etwa $150\mu\text{m}$ breit, was es Axonen von primären Motoneuronen ermöglicht durch sie hindurch zu wachsen und somit der distale Teil der Axone für Analysen zur Verfügung steht (A). Durch unterschiedliche Volumina in den beiden Kompartimenten ist es möglich, einen hydrostatischen Druck zu erzeugen, wodurch eine Diffusion von beispielsweise Überlebensfaktoren von einer zur anderen Seite wirksam unterbunden wird (B; Taylor et al., 2005). Durch Volumenerhöhung auf der einen Seite kann somit ein BDNF Gradient durch die Mikrokanäle hinweg erzeugt werden, der Axonen von Motoneuronen als Wachstumssignal dienen kann.

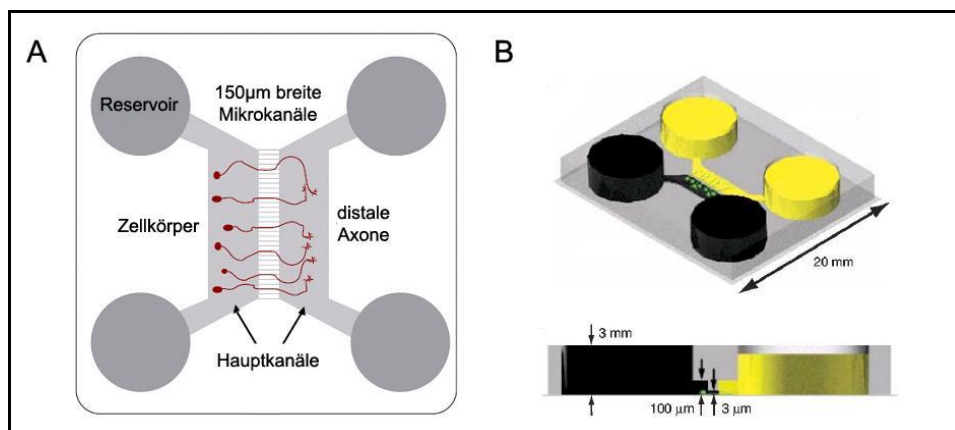


Abb. 5.28: Schematischer Aufbau der Microfluid Neuron Devices.

Die Elemente aus PDMS, sind nach unten offen und können so auf eine für die Zellen geeignete Matrix aufgebracht werden.

A, Aufsicht. Je zwei Reservoire sind durch einen Hauptkanal miteinander verbunden und bilden ein Kompartiment. Die beiden Systeme sind durch $150\mu\text{m}$ breite Mikrokanäle miteinander verbunden. Im linken Kompartiment werden die Zellen ausplattiert und können Neuriten durch die Mikrokanäle in das rechte Kompartiment projizieren.

B, Durch ein größeres Volumen in einem Kompartiment (schwarz) wird ein hydrostatischer Druck erzeugt, der eine Diffusion aus dem gelben Kompartiment wirkungsvoll unterbindet. Nach Taylor et al., 2005.

5.4.1 Kompartimentierte Kulturen von Neuronen dorsaler Wurzelganglien

Zunächst wurden Neurone des peripheren Nervensystems aus dorsalen Wurzel Ganglien wildtypischer E13 Mausembryonen in den Kammern kultiviert. Dazu wurden 35 mm Kulturschalen (Falcon) mit PORN beschichtet, mit dH₂O gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden in 70% Ethanol sterilisierte, getrocknete Xona-Elemente aufgelegt und vorsichtig angepresst. Das Kammersystem wurde nun mit Laminin beschichtet und am nächsten Tag mehrmals mit Neurobasal-Medium gespült. Nachdem sich gleiche Volumina zwischen den beiden Reservoirs eines Kompartiments eingestellt hatten, wurden die Zellen (~150000) in einem Reservoir eines Kompartiments ausplattiert. Der geringe Volumenunterschied durch die hinzugefügte Zellsuspension erzeugt eine Ausgleichsströmung zwischen den Reservoirs eines Kompartiments, welche die Zellen in die Hauptkanäle zieht, wo sie attachieren können.

Im gegenüberliegenden Kompartiment wurde ca. 100µl weniger Kulturmedium mit NGF (20 ng/ml) eingesetzt. Das Neuritenwachstum von Zellen aus dem dorsalen Wurzelganglion wird bei NGF-Dosen von 1-20 ng/ml stimuliert, wohingegen höhere Dosen (50-200 ng/ml) inhibierend wirken (Conti et al., 1997). Durch den hydrostatischen Druck, der aus dem Volumenunterschied von einem zum anderen Kompartiment resultiert, sollte kein NGF zu den Zellkörpern diffundieren. In einem parallel durchgeführten Experiment wurden auf beiden Seiten, gleiche Volumina Kulturmedium mit jeweils 5 ng/ml NGF gegeben, da Neurone aus den dorsalen Wurzelganglien diese Mindest-Konzentration für ihr Überleben und basales Neuriten Wachstum benötigen (Hengst et al., 2009).

Bei diesem Experiment zeigte sich, dass die Zellkörper ohne NGF in ihrem Kompartiment und der höheren NGF Konzentration im gegenüberliegenden Kompartiment bereits nach 24 Stunden in Kultur, abstarben und nur wenige Neuriten ausbildeten (Abbildung 5.29, A und B). Offensichtlich ist kein NGF durch die Mikrokanäle diffundiert. Dies belegt, dass die hydrostatische Trennung der beiden Kompartimente durch unterschiedliche Volumina funktioniert. Zellen die mit NGF (5 ng/ml) ohne Volumen-Unterschied zwischen den Kompartimenten kultiviert wurden, zeigten nach 24 h ein höheres Überleben und deutliches Neuriten Wachstum (C und D).

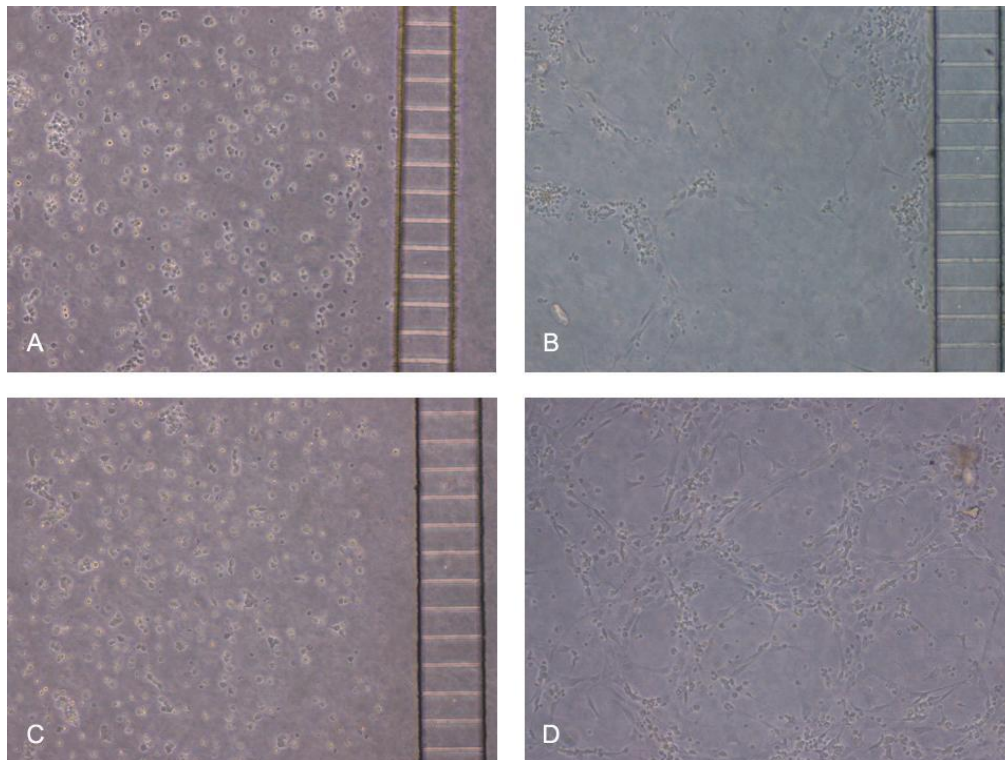


Abb. 5.29: Hydrostatische Trennung der Kompartimente bei Kulturen von Neuronen aus dorsalen Wurzelganglien.

Zellen aus embryonalen dorsalen Wurzelganglien wurden in kompartimentierten Xona-Elementen kultiviert. Die Leiterartigen Strukturen sind die beschriebenen 150 μ m breiten Mikrokanäle. Gezeigt sind Kulturen am Tag des Ausplattierens (A und C) und nach 24 h (B und D).

A und B, die Zellen wurden mit 20 ng/ml NGF im rechten Kompartiment kultiviert, jedoch bei geringerem Volumen. Dadurch konnte kein NGF in das Kompartiment diffundieren in dem sich die Zellkörper befinden (links). Nach 24 h sind die meisten Zellkörper kondensiert und es sind nur wenige Neuriten zu erkennen.

C und D, beide Kompartimente wurden mit 5 ng/ml NGF, ohne Volumenunterschied eingestellt. Nach 24 h haben deutlich mehr Zellen überlebt und begonnen Neuriten auszuwachsen.

Um einen ansteigenden NGF-Gradienten zu erzeugen, der Neuriten als Wachstumssignal dienen kann, wurden im Zellkörper-Kompartiment 5 ng/ml NGF und im gegenüberliegenden Kompartiment 20 ng/ml NGF bei größerem Volumen (+100 μ l) eingesetzt. Bereits nach 24 Stunden waren Neuriten durch die Mikrokanäle in das gegenüberliegende Kompartiment gewachsen (Abbildung 5.30, A und B). Nach 5 Tagen in Kultur waren lange Neuriten in hoher Zahl zu beobachten (C und D). Es konnten allerdings auch Zellkörper beobachtet werden, die zu Beginn der Kultur nicht in diesem Kompartiment vorhanden waren (C).

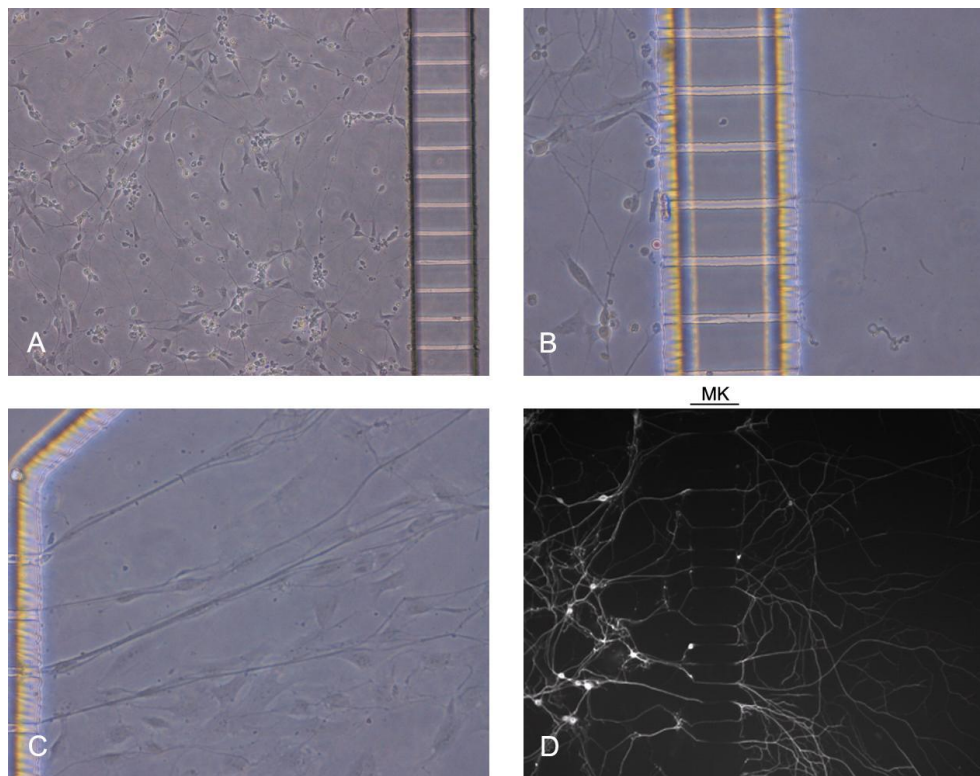


Abb. 5.30: Kompartimentierte DRG Kulturen in einem NGF-Gradienten

Zellen aus dorsalen Wurzelganglien wurden in einem NGF-Gradienten kultiviert.

Dabei wurden 5 ng/ml in das Zellkörper-Kompartiment (links) und 20 ng/ml bei größerem Gesamtvolumen (+100 μ l) in das axonale Kompartiment (rechts) gegeben.

A, Bereits nach 24 h in Kultur ist deutliches Neuritenwachstum zu sehen.

B, Vergrößerung des rechten Kompartiments, ebenfalls nach 24 h. Neuriten sind entlang des NGF Gradienten durch die Mikrokanäle gewachsen.

C, Nach 5 Tagen in Kultur sind lange Neuriten erkennbar. Zellkörper in hoher Zahl, die zu Beginn der Kultur noch nicht vorhanden waren (B) stammen wahrscheinlich von Gliazellen oder Fibroblasten.

D, Färbung mit einem Antikörper gegen Tau. Neuriten sind nur durch die freien Mikrokanäle (MK) gewachsen und haben die Silikonbarrieren nicht unterwachsen.

Um die Identität der unerwünschten, proliferierenden Zellen näher zu bestimmen wurden Färbungen mit einem S-100 Antikörper und einem p75 Antikörper durchgeführt (Abbildung 5.31). Das S-100 protein ist im Zytoplasma und/oder im Nukleus von Astrozyten und Schwann-Zellen lokalisiert und gehört zur Familie der Kalzium bindenden Proteine wie Calmodulin und Troponin C. S-100 positive Zellen wurden zwar in der Kultur gefunden, aber nur vereinzelt sind Zellkörper im rechten Kompartiment S-100 positiv (A).

Der Nerven-Wachstumsfaktor Rezeptor p75 ist ein 75 kDa Transmembran Glykoprotein das vorwiegend von Schwann-Zellen und Neuronen, aber auch von einer Reihe nicht neuronaler Zellen exprimiert wird. Nahezu alle Zellen in der Kultur sind p75 positiv (B).

Dies zeigt, dass es sich bei den Zellen, die Neuriten in das rechte Kompartiment projizieren um Neuronen handelt. Wahrscheinlich handelt es sich bei den proliferierenden Zellen um eine Mischpopulation von Fibroblasten und Gliazellen.

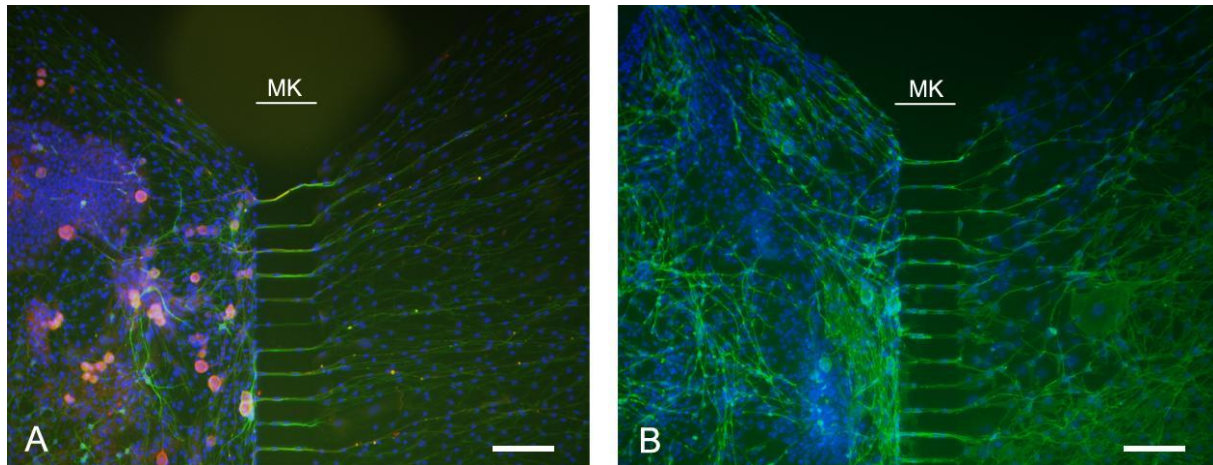


Abb. 5.31: Färbungen von kompartimentierten Neuron Kulturen der dorsalen Wurzelganglien mit S-100 und p75 Antikörpern.

Färbung von 10 Tage alten unter NGF-Gradienten (5-20 ng/ml) kultivierten Neuronen des dorsalen Wurzelganglions. Ein Antikörper gegen Tau (grün), zeigt deutlich die Neuriten, die durch die Mikrokanäle (MK) gewachsen sind.

A, Eine Antikörperfärbung gegen S-100 (mAk, rot), wurde verwendet um Schwann-Zellen zu färben. Nur wenige sind durch die Mikrokanäle auf die rechte Seite des Kammer-systems gelangt. Deutlich sind jedoch die Zellkerne von proliferierenden Zellen gefärbt (DAPI).

B, Färbung gegen p75, markiert alle Zellen in der Kultur positiv. Maßstabsbalken: 150 μ m.

5.4.2 Kompartimentierte Kulturen primärer embryonaler Maus Motoneuronen

Nachdem die Kultivierung von sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems erfolgreich war, sollten Neurone des zentralen Nervensystems in den kompartimentierten Kammern kultiviert werden. Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob ein Gradient von in Lösung befindlichem BDNF ein gerichtetes Wachstum der Axone von primären Maus Motoneuronen in das axonale Kompartiment bewirken kann. Das BDNF in der Lage ist, axonales Wachstum zu lenken, konnte anhand von Oberflächen gebundenen BDNF bei hippocampalen Neuronen bereits gezeigt werden (Mai et al., 2009). Die primären Motoneurone wurden bei diesen Experimenten auf PORN und Laminin kultiviert.

Es wurde immer in beiden Kompartimenten einer Kultur CNTF (5 ng/ml) und eine basale Konzentration BDNF (5 ng/ml) eingesetzt, um die Bedingungen für das Überleben der Neurone optimal zu halten. Ein Gradient ausgehend von 20 ng/ml BDNF im axonalen Kompartiment (5 ng/ml im Zellkörper-Kompartiment) mit erhöhtem Volumen bewirkte, dass Axone nach 7 Tagen durch die Mikrokanäle wuchsen (Abbildung 5.32, A). In einer parallelen Kultur wurde untersucht ob die Axone zufällig durch die Mikrokanäle oder entlang des

BDNF Gradient wachsen. Dazu wurde in beiden Kompartimenten die gleiche Menge BDNF (20 ng/ml) eingesetzt. Hierbei konnten nach 7 Tagen keine Axone beobachtet werden, die durch die Mikrokanäle gewachsen waren (B). Die Axone projizierten eher zufällig in alle Richtungen.

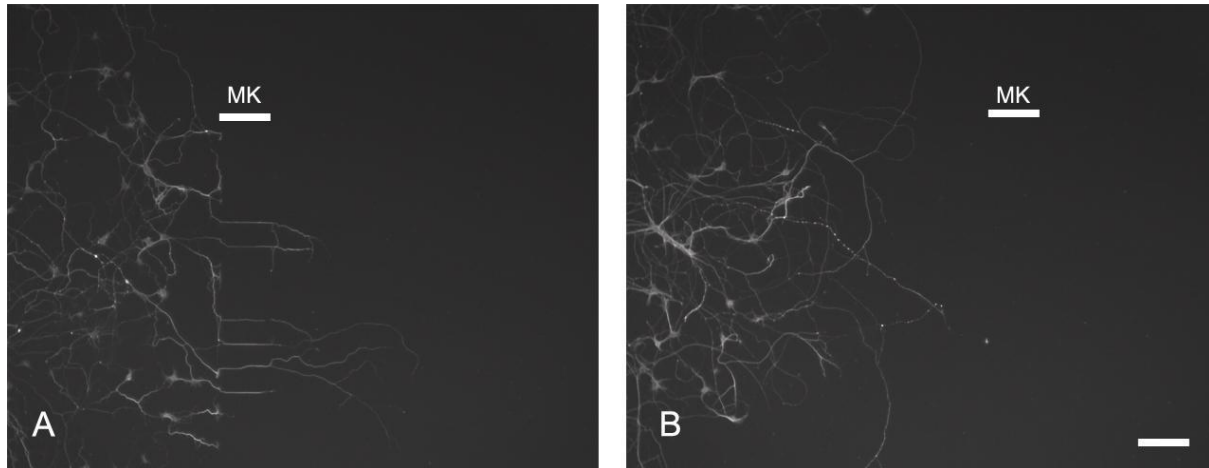


Abb. 5.32: Embryonale primäre Maus Motoneurone projizieren Axone entlang eines BDNF Gradienten.

100000 Motoneurone je Xona-Element wurden ausplattiert und 7 Tage kultiviert. Nach dem Fixieren der Zellen wurden mit einem Antikörper gegen Tau die Axone sichtbar gemacht.

A, Gezeigt ist eine Kultur bei der im axonalen Kammersystem (rechts) 20 ng/ml BDNF eingesetzt wurden. Deutlich zu sehen sind Axone, die durch die Mikrokanäle (MK) entlang des BDNF-Gradienten gewachsen sind.

B, Eine Kultur bei der in beiden Kompartimenten 20 ng/ml BDNF eingesetzt wurde. Es kann sich kein BDNF-Gradient durch Diffusion ausbilden. Die Axone sind normal entwickelt, aber eine bevorzugte Wachstumsrichtung ist nicht erkennbar. Maßstabsbalken: 150 μm .

Um murine Motoneurone in hohen Zellzahlen von 500000 bis 1 Million je Xona-Element zu kultivieren, wurden alle Embryonen (10-15) eines trächtigen Muttertiers zusammengeführt. Die so erzielten hohen Zelldichten haben sich als notwendig erwiesen, damit eine ausreichende Zahl Zellkörper in den Hauptkanälen attachiert. Da Motoneurone im Verhältnis zu anderen Neuronen in Zellkultur kürzere Axone ausbilden, ist es erforderlich eine möglichst hohe Zahl von Zellkörpern in unmittelbarer Nähe der Mikrokanäle zu platzieren, damit die auswachsenden Axone durch diese hindurch in das gegenüberliegende Kompartiment projizieren können. Absolut reine Kulturen sind technisch, auch durch Anreicherung der Motoneurone mit einem Panning-Schritt, nicht möglich. Bei angestrebten Zelldichten von bis zu 1 Million ausplattierten Zellen, entsprechen bereits 1% unerwünschter Zellen, einer Zahl von 10000. Problematisch ist die Tatsache, dass Gliazellen oder Fibroblasten in der Kultur proliferieren und diese somit relativ schnell überwachsen können. Um das zu verhindern wurde allen primären Motoneuronkulturen Cytosine- β -D-arabinosefuranosid (Ara-C) in einer

Konzentration von 10 μM hinzugefügt. Ara-C wird relativ schnell in ein Triphosphat metabolisiert, das DNA während der Synthese in der S-Phase des Zellzyklus schädigt. Daher sind sich mitotisch teilende Zellen besonders betroffen.

Bei Experimenten mit hohen Zelldichten von 500000, 800000 und 1000000 eingesetzten Motoneuronen, waren nach 7 Tagen in Kultur Axone in großer Zahl durch die Mikrokanäle in das axonale Kompartiment gewachsen. Es konnten nur vereinzelt DAPI positive Zellkerne auf der axonalen Seite einer Kultur gefunden werden (Abbildung 5.33, A), bei zwei weiteren Kulturen waren keine Zellkörper durch die Mikrokanäle migriert (B und C). Die Morphologie der Motoneurone und deren Axone erschienen normal. Eine offensichtliche Beeinträchtigung der Neurone durch Ara-C (10 μM) konnte nicht beobachtet werden. Eine parallele GFAP-Färbung wurde benutzt um Astrozyten und Schwann-Zellen zu markieren (B und C). Die Färbung zeigt deutlich das Vorhandensein von Gliazellen im Zellkörper, jedoch nicht im axonalen Kompartiment. Dieser Befund zeigt, dass eine Ara-C Konzentration von 10 μM die Proliferation unerwünschter Gliazellen und Fibroblasten in Kulturen primärer Motoneurone wirksam inhibiert und diese Zellen nicht mehr durch die Mikrokanäle in das axonale Kompartiment des Kammersystems migrieren.

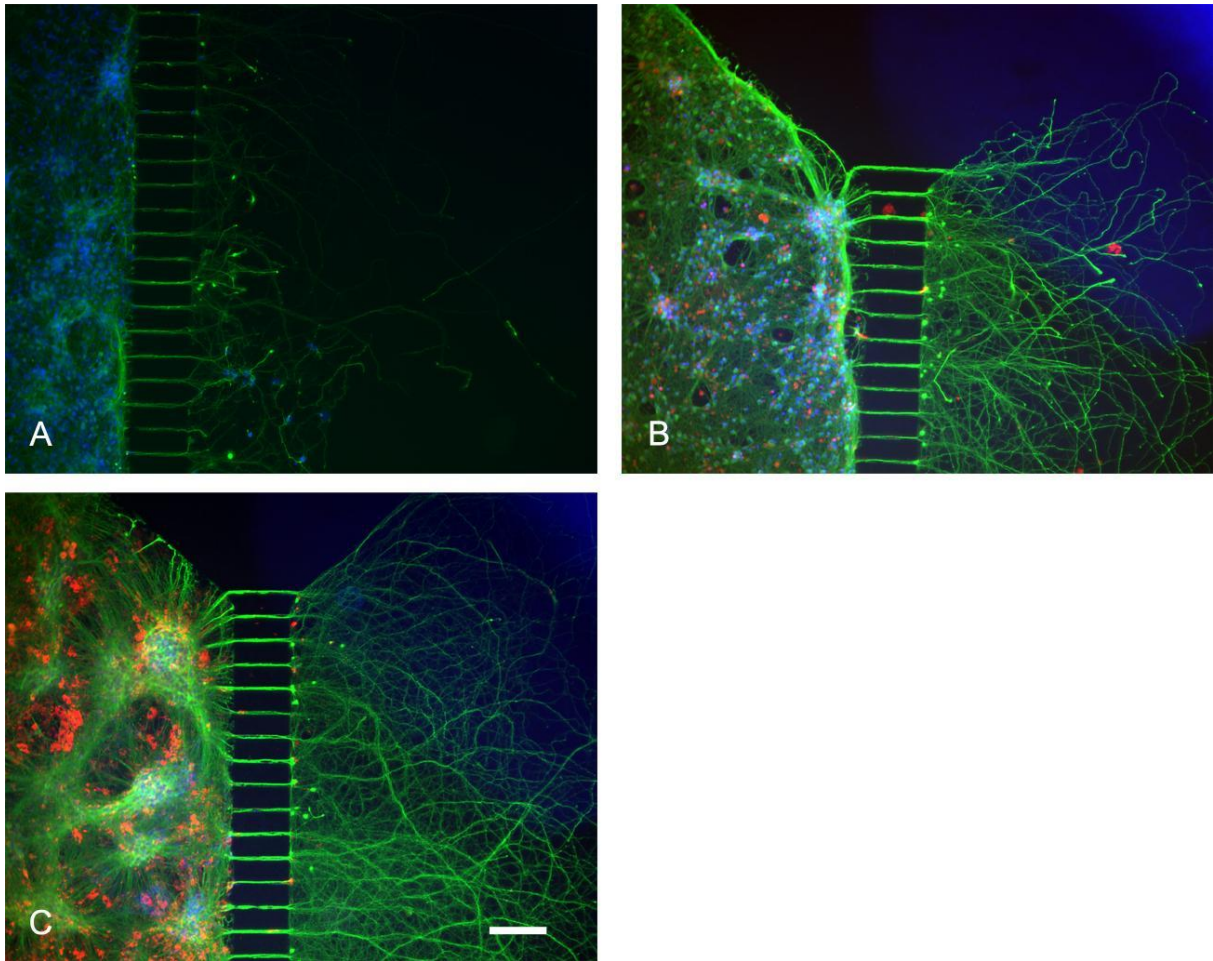


Abb. 5.33: Kompartimentierte primäre Motoneuron Kulturen in hohen Zelldichten.

Die Motoneurone wurden 7 Tage in einem BDNF-Gradienten (5 ng/ml, links; 20 ng/ml, rechts) und mit beiderseits 10 μ M Ara-C kultiviert. Es wurden ~500000 (A), ~800000 (B) und ~1000000 (C) Zellen eingesetzt. Um die Axone sichtbar zu machen, wurde ein gegen Tau (grün) gerichteter Antikörper verwendet. Zellkerne wurden durch eine DAPI-Färbung markiert (blau). Um die Wirksamkeit von Ara-C in den Kulturen zu kontrollieren, wurde eine GFAP-Färbung (rot, mAk, B und C) durchgeführt. Ara-C inhibiert die Proliferation der nicht erwünschten Zellen wirkungsvoll. Maßstabsbalken: 150 μ m.

5.4.3 Axonale RNA Präparationen von kompartimentierten Maus Motoneuron Kulturen

Um sicherzustellen, dass die aus dem axonalen Kompartiment gewonnene RNA nicht durch Material der Zellkörperseite verunreinigt ist, muss bei der Zell-Lyse eine hinreichende Trennung der Volumenströme erreicht werden. Um dies zu testen wurden primäre Motoneuron Kulturen von CD1 Mäusen mit einem GFP exprimierenden Lentivirus infiziert, damit lebende Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar sind. Die Motoneurone wurden in einem BDNF-Gradienten (5-20 ng/ml) und mit Ara-C (10 μ m) kultiviert. Die Zellen wurden nicht fixiert. Das axonale Kompartiment wurde mit PBS gewaschen und anschließend das Volumen fast vollständig reduziert, sodass der Hauptkanal, der die distalen Axone enthält, nicht eintrocknet. Es wurden sofort 200 μ l Trizol mit 10 mM β -Mercaptoethanol in das obere Reservoir gegeben und die Lyse der Zellen verfolgt (Abbildung 5.34, A-C). Durch den Volumenunterschied vom oberen zum unteren Reservoir entsteht eine Strömung, die ausreicht das Zell-Lysat im unteren Reservoir zu sammeln, wo es aufgenommen wurde. Bereits 30s nach Trizol Applikation waren im Phasenkontrast keine Axone mehr erkennbar (Vergleiche Pfeilspitze in A mit B).

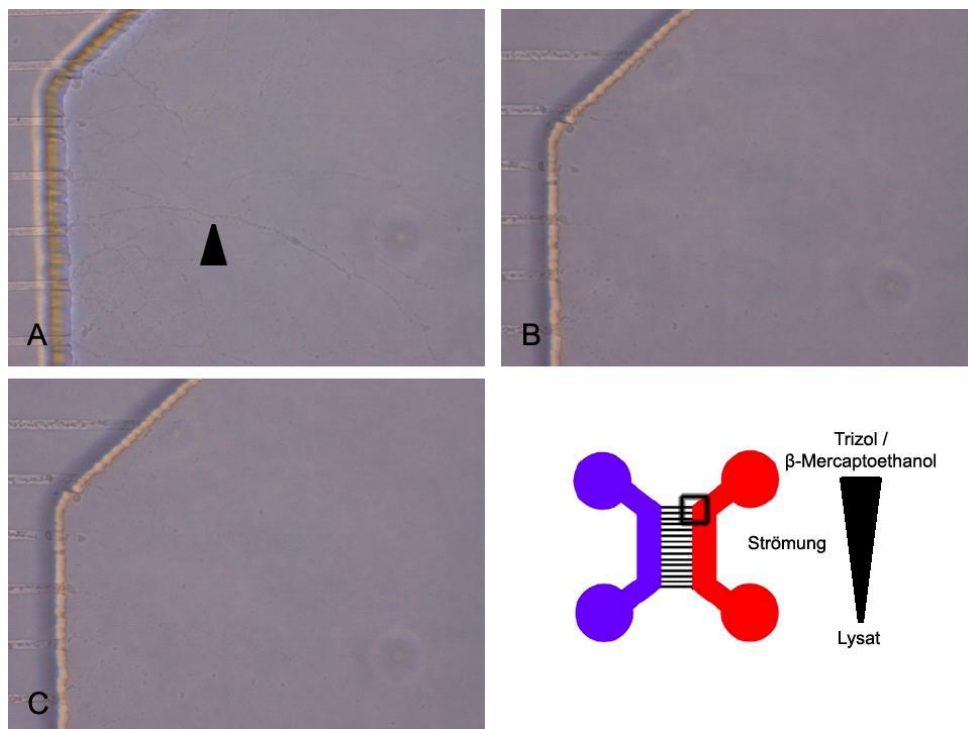


Abb. 5.34: Zell-Lyse axonaler Kompartimente mit Trizol.

A, Axone nicht fixierter primärer Motoneurone (Pfeilspitze) vor Applikation von Trizol / β -Mercaptoethanol.

B, 30 Sekunden nach Trizol Applikation in das axonale Kompartiment waren die Axone bereits lyseiert.

C, 60 Sekunden nach Trizol Applikation.

Sofort nach Kontakt mit Trizol verschwand das axonale GFP Signal (Abbildung 5.35, A und B). Zellkörper und Axone des im nicht mit Trizol behandelten Kompartiment hingegen, verloren auch während einer 6-minütigen Inkubation mit Trizol im axonalen Kompartiment, ihr GFP-Signal nicht (C). Auch Zellkörper die direkt an den Mikrokanälen gelegen waren zeigten keine Anzeichen einer Lyse (Vergleiche B und C). Es kann also davon ausgegangen werden, dass kein Trizol innerhalb dieser Zeitspanne durch die Mikrokanäle gelangt und somit eine Kontamination der folgenden axonalen RNA Präparation mit RNA aus lysierten Zellkörpern unwahrscheinlich ist.

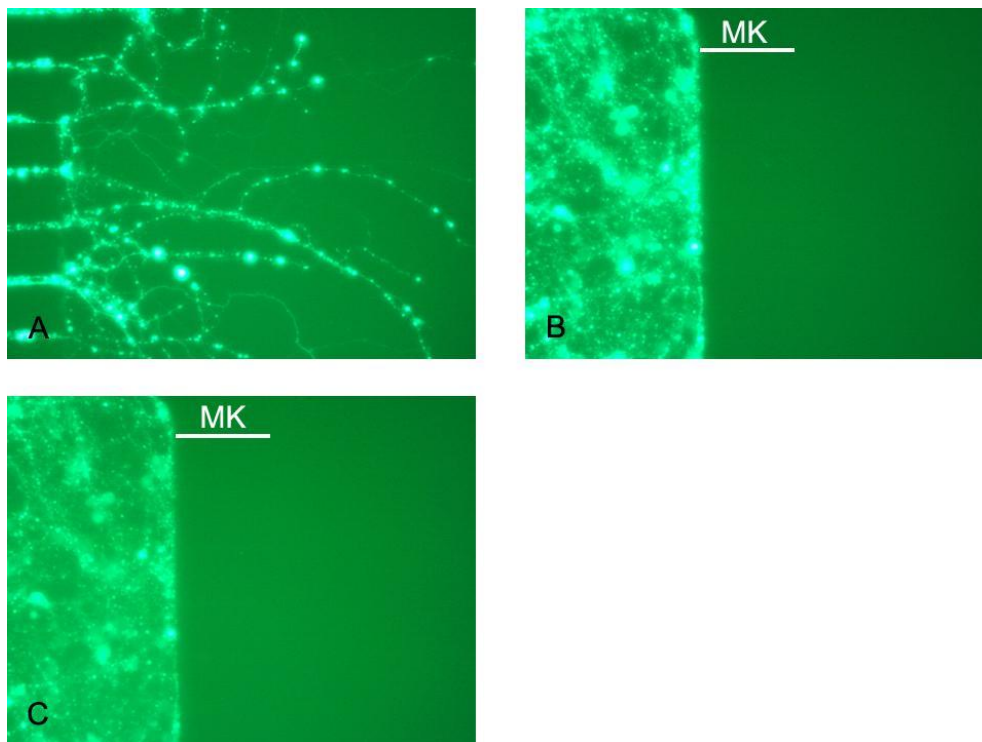


Abb. 5.35: Trizol lysiert Axone, gelangt aber nicht durch die Mikrokanäle zu den Zellkörpern.

A, vor Trizol Applikation. Deutlich sind die GFP exprimierenden Axone sichtbar.

B, 120 Sekunden nach Trizol Applikation. Die Axone wurden vollständig lysiert. Zellkörper direkt an den Mikrokanälen (MK) gelegen zeigten keine Anzeichen einer Lyse.

C, 360 Sekunden nach Trizol Applikation. Die Zellkörper waren unverändert. Das schwächere GFP Signal ist auf die mehrfache Belichtung zurück zu führen.

Von primären Motoneuron Kulturen die auf PORN und Laminin, für 10 Tage in einem BDNF-Gradienten (5-20 ng/ml) mit Ara-C (10 μ M) kultiviert wurden, wurde RNA mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) gewonnen. Dabei wurde statt mit Trizol, mit RLT-Puffer (Qiagen) + β -Mercaptoethanol lysiert. Um zu gewährleisten, dass keine Zellkörper im axonalen Kammersystem vorhanden waren und somit die axonalen RNA-Präparationen verunreinigten, wurden die Zellen vor Beginn der Lyse mit Hoechst 33342 gefärbt. Dieser

Farbstoff bindet an DNA und ist somit geeignet die Zellkerne lebender Zellen zu markieren (Abbildung 5.36). Es wurde nur axonale RNA von Kulturen gewonnen, die keine Zellkörper im axonalen Kompartiment aufwiesen.

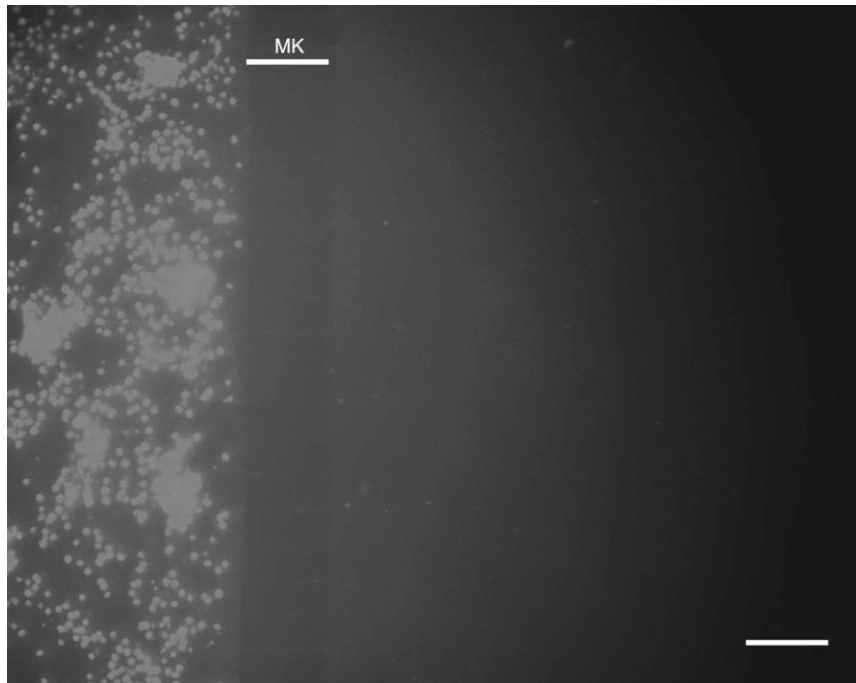


Abb. 5.36: Hoechst 33342 Färbung einer kompartimentierten primären Motoneuron Kultur.

Der Farbstoff Hoechst 33342 bindet an DNA und markiert Zellkerne lebender Zellen. Eine deutliche Färbung der Zellkerne ist nur im Zellkörper Kompartiment zu erkennen. Vereinzelt schwache Signale im axonalen Kompartiment sind Hintergrund, da bei augenscheinlicher Kontrolle unter Phasenkontrast keine Zellkörper an diesen Positionen erkennbar waren. MK, Mikrokanäle. Maßstabsbalken 150 μm .

Zell-Lysate wurden sowohl aus dem axonalen wie auch aus dem Zellkörper-Kompartiment gewonnen und die RNA getrennt aufgereinigt. Die RNA Präparationen wurden mit einem Spektralphotometer (Nanodrop, Peqlab) gemessen. Dabei konnten 797 ng (26,6 ng/ μl) 1630 ng (54,3 ng/ μl) aus den Zellkörper-, sowie 59,4 ng (1,98 ng/ μl) und 26,7 ng (0,9 ng/ μl) aus den axonalen Kompartimenten gewonnen werden.

5.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR Analysen von RNA Präparationen kompartimentierter primärer Motoneuron Kulturen

Um Aussagen über die Qualität und Quantität der gewonnen RNA treffen zu können, wurden spezifische Primer für β -Aktin, ribosomale S18 RNA und mitochondrial codiertes Cytochrom B ausgewählt. Aus kompartimentierten Motoneuron Kulturen gewonnene, totale RNA wurde mit der Superscript III Reversen Transkriptase (Invitrogen) zu cDNA umgeschrieben. Dabei wurde das gesamte Elutionsvolumen von 10 μ l, der axonalen RNA-Aufreinigung und 1 μ l der zytosolischen RNA-Aufreinigung für die RT-Reaktion eingesetzt. Das RT-Reaktionsvolumen betrug dabei 20 μ l. Bei der ribosomalen S18 RNA handelt es sich nicht um eine Messenger RNA, daher wurden zufällige Hexamere (N6), anstatt Oligo(dT)₂₀-Primer, die nur mRNAs erkennen, verwendet. Da N6-Primer häufiger und an mehr RNA Template binden, ist die Gesamteffizienz der RT-Reaktion im Vergleich zu einer Reaktion mit Oligo(dT)₂₀-Primern erhöht.

Um die Effizienz der β -Aktin PCR (Primerpaar LC_bact 2a/b) bestimmen zu können wurde mit cDNA, die aus dem Rückenmark einer E18 Maus gewonnen wurde, eine Eichgerade erstellt. Dazu wurde die cDNA in mehreren Verdünnungen eingesetzt und der höchsten Verdünnung (500x), die relative Konzentration von 1 zugewiesen (Tabelle 5.2).

| Verdünnung | Relative Konzentration | Crossing Point |
|------------|------------------------|----------------|
| 10 x | 50 | 21,15 |
| 25 x | 20 | 22,59 |
| 50 x | 10 | 23,87 |
| 100 x | 5,0 | 25,05 |
| 200 x | 2,5 | 26,03 |
| 500 x | 1,0 | 27,57 |

Tab. 5.2: Quantitative Echtzeit-PCRs für β -Aktin in einer Verdünnungsreihe der cDNA zum Ermitteln einer Eichgerade.

Werden die erhaltenen Crossing Points der einzelnen RTq-PCR Reaktionen gegen die logarithmischen relativen Konzentrationen aufgetragen, erhält man eine Eichgerade, die einem für weitere Berechnungen benötigte Werte liefert (Abbildung 5.37).

So beträgt die Effizienz E der PCR Reaktion mit den verwendeten β -Aktin Primern, bei einem Slope von 3,787 ($=\Delta n$), $E=10^{1/\Delta n}=10^{1/3,787}=1,84$, oder 92% ($2=100\%$).

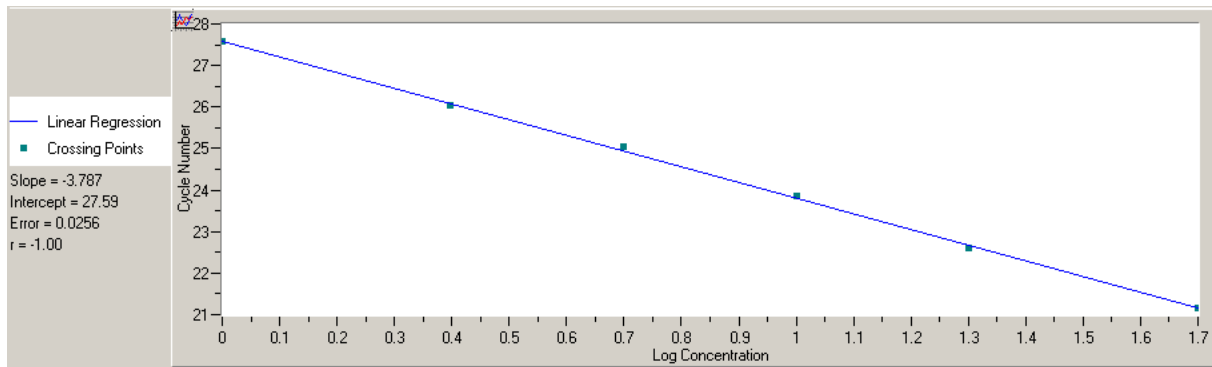


Abb. 5.37: Eichgerade für eine quantitative Echtzeit-PCR mit β -Aktin Primern.

Die Crossing Points aus RTq-PCRs mit verschiedenen Verdünnungen der Template cDNA wurden gegen die logarithmischen relativen Konzentrationen aufgetragen. Daraus ergibt sich ein Slope von -3,787 und ein relativer $Y_{\text{intercept}}$ von 27,59.

In Tabelle 5.3 sind die mittleren Crossing Points von jeweils 3 parallel angesetzten RTq-PCR Reaktionen und in der jeweiligen Verdünnung dargestellt.

Der Slope (Δn) von unverdünnter zytosolischer Template cDNA zur 1:10 Verdünnung ist hierbei $\Delta n = 31,09 - 29,16 = 1,93$ und entspricht bei einer Effizienz von 1,84, nicht dem zu erwartenden Δn von $\sim 3,79$. Bei der axonalen cDNA liegt er mit 1,91 im gleichen Bereich. Das Δn der 1:10 und 1:20 Verdünnungen, welches einer Halbierung der Template Menge entspricht und somit die gleiche Kopienzahl bei einer PCR Effizienz von 2 einen Zyklus später erreicht werden sollte, liegt bei der zytosolischen cDNA bei $\sim 1,3$ (bei $E = 1,84$) und ist damit im Rahmen des Erwarteten. Wahrscheinlich stören Komponenten der Reversen Transkription die RTq-PCR im ersten Fall. Bei den Verdünnungen sind diese Komponenten so weit verdünnt, dass sie nicht mehr inhibierend wirken. Im Fall der axonalen cDNA ist die Detektionsgrenze der RTq-PCR bei 1:10 und 1:20 bereits erreicht und das Δn ändert sich kaum. Es werden bereits statistische Fehler abgebildet.

| | Mittlere Crossing Points | | |
|-------------------|--------------------------|-------------|-------|
| | β -Aktin | Cytochrom B | S18 |
| Zellkörper | | | |
| unverdünnt | 29,16 | 29,77 | 17,84 |
| 1:10 | 31,09 | 31,24 | 22,26 |
| 1:20 | 32,40 | 32,26 | 22,64 |
| Axonal | | | |
| unverdünnt | 31,12 | 31,38 | 21,95 |
| 1:10 | 33,03 | 32,55 | 26,78 |
| 1:20 | 33,19 | 32,57 | 26,26 |

Tab. 5.3: Mittlere Crossing Points quantitativer Echtzeit-PCRs (RNeasy Kit).

Dargestellt sind die mittleren Crossing Points aus je drei Replikaten, von RTq-PCRs (Primerpaare: LC_bact 2a/b, LC-cytb 1a/b und LC_S18 1a/b). Es wurden jeweils 1 μ l der reversen Transkription in der RTq-PCR als Template eingesetzt. Die RNA Präparationen wurden mit dem Qiagen RNeasy Kit durchgeführt. Zellkörper, RNA Präparation aus Kompartimenten der Zellkörperseite. Axonal, RNA Präparation aus axonalen Kompartimenten.

Die RNA Präparationen als nächstes mit dem PicoPure-Kit der Firma Arcturus durchgeführt, das kompatibel mit dem linearen Amplifikationskit derselben Firma ist. Da es für Einzelzell RNA Präparationen geeignet ist, wäre eine höhere RNA Ausbeute aus dem axonalen Kompartiment zu erwarten. Das Elutionsvolumen betrug jeweils 10 μ l und es wurden 1 μ l zytosolische und 10 μ l axonale RNA in der reversen Transkription (20 μ l Reaktionsvolumen) eingesetzt. Tabelle 5.4 stellt wiederum die mittleren Crossing Points aus drei Replikaten einer RTq-PCR mit den zuvor verwendeten β -Aktin Primern dar. Diesmal wurden cDNA Verdünnungen von 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 eingesetzt. Das Δn der zytosolischen RTq-PCRs ist diesmal durchwegs im Bereich der mit einer PCR-Effizienz von 1,84 zu erwarten ist (1,31; 1,18; 1,36; 0,83). Allerdings sind die Werte der axonalen RTq-PCRs alle an der Detektionsgrenze der Reaktion angesiedelt (Crossing Points > 33).

Dies lässt auf eine schlechte Ausbeute bei der RNA Präparation mit dem PicoPure-Kit schließen oder die Zellen in dieser kompartimentierten Kultur waren bereits teilweise apoptotisch bzw. die Axone stark degradiert, was eine Fragmentierung der axonalen RNA zur Folge hätte.

| Mittlere Crossing Points (β-Aktin) | |
|--|-------|
| Zellkörper | |
| unverdünnt | 17,99 |
| 1:2 | 19,3 |
| 1:4 | 20,48 |
| 1:8 | 21,84 |
| 1:16 | 22,67 |
| Axonal | |
| unverdünnt | 33,45 |
| 1:2 | 35,20 |
| 1:4 | 35,02 |
| 1:8 | 35,62 |
| 1:16 | 34,56 |

Tab. 5.4: Mittlere Crossing Points quantitativer Echtzeit-PCRs für β -Aktin (PicoPure Kit).

Dargestellt sind die mittleren Crossing Points aus je drei Replikaten quantitativer Echtzeit-PCRs mit β -Aktin Primern (LC_bact 2a/b). Es wurden jeweils 2 μ l der reversen Transkription als Template eingesetzt um mögliche Pipetierfehler zu reduzieren. Die RNA Präparationen wurden mit dem Arcturus PicoPure Kit durchgeführt. Zellkörper, RNA Präparation aus kompartimentierten Kammern der Zellkörperseite. Axonal, RNA Präparation aus kompartimentierten Kammern der axonalen Seite.

6. Diskussion

Nervenzellen unterscheiden sich von vielen anderen Zellen, z.B. Zellen des hämatopoetischen Systems durch einen hohen Grad an Polarität. Dendriten enthalten Rezeptoren für Neurotransmitter an dendritischen Spines, wohingegen diese Strukturen in Axonen fehlen. Dafür enthalten Axone den kompletten Apparat für die Freisetzung von Neurotransmittern. Bei einigen Nervenzellen, insbesondere den motorischen Nervenzellen des Rückenmarks erreichen solche Axone beim Menschen eine Länge von über 1 Meter, sodass hoch spezialisierte Mechanismen notwendig sind, um diese polarisierten Strukturen auszubilden und aufrechtzuerhalten. Nicht nur die Sortierung von Proteinen, sondern auch der gerichtete Transport spezifischer mRNAs spielt hier eine große Rolle. In dieser Promotionsarbeit sollte die Rolle des axonalen Transports der β -Aktin mRNA genauer untersucht werden, insbesondere in Hinblick auf die physiologische und pathophysiologische Relevanz im Zusammenhang mit Motoneuronenerkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass es bei einem Knockdown von hnRNP-R in Zebrafisch Embryonen zu einer dosisabhängigen Reduktion des Längenwachstums und fehlerhaften axonalen Verzweigungen primärer Motoneurone kommt. Das Überleben der Motoneurone war dabei nicht beeinflusst. Andere neuronale Zellpopulationen wurden durch den hnRNP-R Knockdown nicht beeinträchtigt. Murine hnRNP-R mRNA, die zusammen mit hnRNP-R Morpholinos injiziert wurde, war in der Lage den axonalen Phänotyp zu retten.

6.1 HnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen

Das Zebrafisch Modellsystem ist hervorragend geeignet, um entwicklungsbiologische Fragestellungen und Krankheitsmechanismen zu erforschen (Dodd et al., 2000). Es besitzt gegenüber anderen Tiermodellen erhebliche Vorteile um die Entwicklung von Organen und Geweben *in vivo* zu studieren. So lassen sich Zebrafische in großer Zahl und mit relativ geringem Aufwand züchten, bei geeigneter Haltung produzieren sie ganzjährig Nachkommen und sie entwickeln sich innerhalb von nur 4 Monaten zur Geschlechtsreife. Am attraktivsten erscheint jedoch die Tatsache, dass sich die durchsichtigen Embryonen außerhalb des Mutterlaibs entwickeln. Weder bei *Drosophila melanogaster* noch bei *Caenorhabditis elegans* oder der Maus ist die Beobachtung von Gewebe- und Organentwicklung so leicht möglich wie beim Zebrafisch. Das gesamte Zebrafisch Genom ist kartographiert und die Entwicklung jeder einzelnen Zelle von der befruchteten Oocyte bis zum adulten Fisch bekannt. Genetische Screens in großem Maßstab ermöglichten es, umfangreiche Sammlungen mutierter Zebrafisch-Stämme anzulegen, und es konnten bereits viele Mutationen entdeckt

werden, die human pathologischen Phänotypen entsprechen. Die Entwicklung von Protein Knockdown Techniken beim Zebrafisch hat zum Verständnis des Pathomechanismus von muskulären Dystrophien beigetragen (Parsons et al., 2002). Aufgrund der genannten Vorteile und des hervorragend charakterisierten Nervensystems, sowie der einfachen neuromuskulären Organisation ist der Zebrafisch sehr gut geeignet um neuromuskuläre Erkrankungen zu untersuchen. Die Protein Knockdown Technik mittels Morpholinos wurde unter anderem dazu verwendet, ein SMA-Krankheitsmodell im Zebrafisch zu etablieren (McWhorter et al., 2003), und wurde auch in dieser Arbeit dazu benutzt, um hnRNP-R in Zebrafisch Embryonen zu depletieren.

6.1.1 hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen führt zu einem Morpholino-Dosis abhängigen axonalen Phänotyp

hnRNP-R wurde ursprünglich als nukleäres RNA bindendes Protein identifiziert (Dreyfuss et al., 1993; Hassfeld et al., 1998). Allerdings wurde es auch in relativ großen Menge in Axonen und Wachstumskegeln muriner Motoneuronen gefunden (Rossoll et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass reduzierte hnRNP-R Proteinexpression in Zebrafisch Embryonen zu gehemmten axonalen Wachstum und aberranter Wegfindung von primären Motoneuronen führt. Wie für Snn zeigt sich auch für hnRNP-R, dass es für die Entwicklung der Axone von Motoneuronen notwendig ist. Die beobachteten Defekte sind unabhängig von Zelltod und spezifisch für Motoneurone (vgl. 5.1.8 und 5.1.9; Glinka et al., 2010). Sie weisen wie schon bei den Untersuchungen zu reduzierten Snn Mengen im Zebrafisch (McWhorter et al., 2003) darauf hin, dass die frühesten Defekte bei SMA in den sich entwickelnden Motoneuronen entstehen und letztlich zum Absterben der Motoneurone und dem Krankheitsbild der SMA führen. Die große Ähnlichkeit der beobachteten Phänotypen bei Reduktion von hnRNP-R oder Snn lassen vermuten, dass beide Proteine nicht nur direkt miteinander interagieren (Mourelatos et al., 2001; Rossoll et al., 2003), sondern auch im gleichen molekularen Signalweg agieren. Die Morpholino-Dosis abhängige Ausprägung des Phänotyps bei hnRNP-R Knockdown in den Zebrafisch Embryonen weist starke Parallelen zu den unterschiedlich stark ausgeprägten Krankheitsbildern der SMA-Subtypen auf, bei denen weniger funktionales Snn Protein einem schwerwiegenderen Phänotyp entspricht. Bei niedrigen hnRNP-R Morpholino Dosen wurden nur selten fehlerhafte Verzweigungen der proximalen Axone beobachtet, die vom Rückenmark zum horizontalen Myoseptum auswachsen (vgl. 5.1.7). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Initiation des axonalen Auswachsens und die Pfadfindung entlang des allgemeinen Pfades (vgl. Abbildung

5.1) bei geringen Dosen von hnRNP-R Morpholinos kaum gestört sind. Bei der höchsten Dosis jedoch konnte ein vollständiges Fehlen von axonalen Projektionen aus dem Rückenmark zum ventralen Mesenchym beobachtet werden, wobei die Zellkörper der nicht projizierenden Motoneurone noch im Rückenmark vorhanden waren. In dieser Hinsicht unterscheidet sich der Befund bei hnRNP-R Knockdown von Knockdown Experimenten mit SMN Morpholinos im Zebrafisch, in denen das erste Zwischenziel der axonalen Wegfindung immer erreicht wurde (McWhorter et al., 2003). Allerdings wurden bei der Studie von McWhorter und Kollegen, sehr viel höhere Dosen von Morpholinos (6 und 9 ng) eingesetzt. Dies könnte darauf hinweisen, dass ein Fehlen von hnRNP-R weitaus weniger gut kompensiert werden kann als ein Fehlen von SMN. Es wäre auch möglich, dass die verwendeten hnRNP-R Morpholinos effektiver sind als die verwendeten Snn Morpholinos.

6.1.2 Der beobachtete axonale Phänotyp nach hnRNP-R Knockdown in Zebrafisch Embryonen ist Motoneuron spezifisch

Da hnRNP-R, wie auch Snn, ubiquitär exprimiert wird, ist es schwierig, eindeutige Aussagen darüber zu treffen, ob die beobachteten axonalen Defekte wirklich in den Motoneuronen ansässig sind oder als sekundäre Defekte beispielsweise durch Muskelzellen vermittelt werden. Im Zebrafisch, wurden einzelne Motoneuronen mit Snn Morpholinos mikroinjiziert und so gezeigt, dass es sich im Falle von Snn um eine zellautonome Funktion handelt (McWhorter et al., 2003). Da die Technik der Einzelzellinjektion in unserem Labor nicht etabliert ist, wurde von einer Kollegin (Natalja Funk) aus unserer Arbeitsgruppe ein Lentivirus kloniert, der gegen murines hnRNP-R gerichtete shRNAs (short hairpin RNAs) exprimiert. Die Auswirkungen der lentiviralen Infektion wurden an isolierten primären Motoneuronen der Maus *in vitro* untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass wie im Zebrafisch das Überleben der Motoneurone nicht beeinträchtigt ist, und der Effekt einer hnRNP-R Suppression auf Axone beschränkt ist. Dendriten von Motoneuronen in Kultur, die mit dem Lentivirus infiziert wurden, zeigten kein reduziertes Wachstum (Glinka et al., 2010). Dieser Befund weist auf eine autonome Funktion von hnRNP-R in Motoneuronen hin. Allerdings kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass verminderte hnRNP-R Protein Mengen in Muskelzellen den Defekt bei Zebrafisch Motoneuronen beeinflussen.

Bei sensorischen Rohon-Beard Neuronen des Zebrafisches konnten leicht erhöhte Verzweigungen nach einem hnRNP-R Knockdown beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.16), wobei die Axonlängen dieser Neuronen nicht verkürzt erschienen. Bei sensorischen Neuronen dorsaler Wurzelganglien in einem SMA Typ I Mausmodell wurde eine Reduktion der

Neuritenlänge und unverändertes Überleben dieser Neuronen beobachtet (Jablonka et al., 2006). Wahrscheinlich liegen diesen Beobachtungen dieselben Mechanismen zugrunde, die bei primären Motoneuronen zu reduzierten β -Aktin Mengen in den Wachstumskegeln führen. Da das „*lateral line*“ sensorische Neuron bei hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Embryonen (vgl. Abbildung 5.18), wie bei Smn depletierten Embryonen (McWhorter et al., 2003) keine Auffälligkeiten zeigte, sind offensichtlich nicht alle sensorischen Neuronen gleichermaßen betroffen.

6.1.3 Nukleäre Funktionen von hnRNP-R könnten zu dem beobachteten axonalen Phänotyp beitragen

Das hnRNP-R Protein ist nicht nur im Zytosol, sondern auch im Zellkern zu finden und könnte zu nukleären Mechanismen beitragen, die mit dem in Zebrafisch und primären Motoneuronkulturen beobachteten Phänotyp assoziiert sind. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass die beobachteten Effekte wie reduzierte β -Aktin mRNA Mengen und die fehlerhafte Zusammenlagerung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen ($Ca_{V2.2}$) in Wachstumskegeln von infizierten Motoneuronen (Glinka et al., 2010) einen nachgelagerten Effekt von nukleären Funktionen des hnRNP-R Proteins darstellen. Würden reduzierte hnRNP-R Mengen zu einer Reduktion von β -Aktin auf Ebene der Transkription führen, müssten auch andere Zelltypen betroffen sein und ebenso das Wachstum von Dendriten. Zebrafisch Embryonen besitzen auch im Falle eines hnRNP-R Knockdowns normale Rumpfgrößen (vgl. Abbildung 5.6) und das Dendriten-Wachstum ist bei Maus Motoneuronkulturen nicht beeinträchtigt (Glinka et al., 2010).

6.1.4 hnRNP-R könnte an der Kontrolle der Translation der β -Aktin mRNA beteiligt sein

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass rekombinantes hnRNP-R direkt an die 3'-UTR der β -Aktin mRNA bindet (Glinka et al., 2010), die für die Translokation dieser mRNA in Neuriten nötig ist (Tiruchinapalli et al., 2003; Huttelmaier et al., 2005). In dieser Hinsicht verhält sich hnRNP-R ähnlich wie IMP1 (ZBP-1), das spezifisch mit der Zipcode Domäne innerhalb der 3'-UTR der β -Aktin mRNA interagiert. hnRNP-R steht damit, bei der subzellulären Sortierung und dem Transport von spezifischen mRNAs, die für die neuronale Differentiation benötigt werden, in einem funktionellen Zusammenhang mit IMP1.

Weiterhin offen ist jedoch die Frage, ob hnRNP-R auch bei der Kontrolle der Translation von mRNAs eine Rolle spielt, wie dies bereits für Zbp1 und die β -Aktin mRNA gezeigt werden konnte (Huttelmaier et al., 2005).

6.1.5 Die Rolle anderer Mitglieder der hnRNP-Familie bei dendritischen Transport und der subzellulären Sortierung von mRNAs

Andere Mitglieder der hnRNP-Proteinfamilie wurden bereits mit dem Transport und der Sortierung von mRNAs verknüpft und sind ebenfalls im Zellkern und im Zytosol lokalisiert, sodass hnRNP-R hier keine Ausnahme darstellt. Zum Beispiel wird hnRNP-A2 in sich entwickelnden Oligodendrozyten nicht nur im Zellkern, sondern auch in zellulären Fortsätzen gefunden, in denen Myelin gebildet wird. Wenn die mRNA, die das basische Myelin Protein (*myelin basic protein*, MBP) kodiert in kultivierte Oligodendrozyten injiziert wird, assoziiert sie mit kleinen granulären Strukturen, die entlang von Mikrotubuli zu subzellulären Kompartimenten transportiert werden, in denen die Myelin Proteinsynthese statt findet. Diese Beobachtung hat zur Definition von RNA Transport Partikeln geführt (Wilhelm und Vale, 1993). Später konnte das hnRNP-A2 Protein als Hauptbestandteil solcher RNA transportierenden Partikel identifiziert werden (Hoek et al., 1998).

Das hnRNP-A2 Protein ist auch in Neuronen zu finden, wo es am dendritischen Transport von spezifischen mRNAs beteiligt ist (Shan et al., 2003; Carson and Barbarese, 2005).

In hippocampalen Neuronen interagiert hnRNP-A2 mit der MAP2 mRNA und trägt zum Transport und der lokalen Translation dieser mRNA bei (Shan et al., 2003).

Dieser spezifische Translokationsmechanismus der MAP2 mRNA ist auch bei den mRNAs für CaMKII α und Arc zu finden (Kanai et al., 2004). Der für den dendritischen Transport dieser beiden mRNAs verantwortliche Proteinkomplex, konnte isoliert und alle seine Bestandteile identifiziert werden. Darunter sind Proteine wie Staufen (Ephrussi et al., 1991; Ferrandon et al., 1994), FMRPs (Bardoni et al., 2001; Kiebler und Bassell, 2006), PUR- α und PUR- β (Kelm, Jr. et al., 1997) zu finden. Dieser Komplex assoziiert mit KIF5, einem Mitglied der Kinesin-Superfamilie. Er enthält auch andere Mitglieder der hnRNP-Proteinfamilie, wie hnRNP-U und das zu hnRNP-R hoch homologe hnRNP-Q/SYNCRIP Protein.

Außerdem konnte durch RNAi Knockdown-Analysen gezeigt werden, dass PUR- α , hnRNP-U und Staufen für die dendritische Lokalisation der CaMKII α mRNA benötigt werden (Kanai et al., 2004). Diese Ergebnisse deuten auf wichtige Funktionen von Mitgliedern der hnRNP-Proteinfamilie für die subzelluläre mRNA Sortierung und den subzellulären Transport, sowie die Prozessierung im Zellkern hin.

6.1.6 hnRNP-R ist wahrscheinlich am axonalen Transport von mRNAs beteiligt

Im Gegensatz zu dendritischen mRNA Transport, ist über die Mechanismen der mRNA Translokation in Axonen, relativ wenig bekannt.

Der Knockdown von hnRNP-R in Zebrafisch Embryonen und primären Maus Motoneuronen führt zu einem axonalen Phänotyp (vgl. Abb. 5.11), während die Dendriten primärer Maus Motoneurone nicht betroffen sind (Glinka et al., 2010). Dies deutet darauf hin, dass hnRNP-R ein zentraler Bestandteil eines Komplexes sein könnte, der bestimmte mRNAs spezifisch in das axonale Kompartiment von Neuronen transportiert. Es wurde bereits gezeigt, dass RNA Transport in Axone und darauf folgende lokale Proteinsynthese wichtig für die Wachstumskegel von Neuronen sind, um während der Entwicklung den richtigen Weg von einem Zwischenziel zum Nächsten zu finden (Brittis et al., 2002).

hnRNP-R kolokalisiert mit Smn in Axonen und Wachstumskegeln von Motoneuronen. Eine reduzierte Expression von Smn in Maus Motoneuronen führt ebenfalls zu einer vorwiegend axonalen Pathogenese, wohingegen Dendriten nicht betroffen sind (Rossoll et al., 2003). Der beobachtete Phänotyp von Zebrafisch Embryonen nach einem Knockdown von hnRNP-R ähnelt sehr stark dem Knockdown von Smn in diesem Tiermodell (McWhorter et al., 2003). In primären Smn depletierten Maus Motoneuronen ist das verringerte Axonwachstum mit einer gestörten Translokation der β -Aktin mRNA in die Axonterminalen verknüpft. Nach lentiviral vermitteltem hnRNP-R Knockdown wurde weniger β -Aktin mRNA in den Filopodien und Wachstumskegeln von primären Maus Motoneuronen gefunden (Glinka et al., 2010). Es ist auch bei den Zebrafisch Experimenten anzunehmen, dass ein gestörter Transport der β -Aktin mRNA zu dem beobachteten Phänotyp beiträgt.

Trotz der Tatsache, dass hnRNP-R in vielen Geweben von Vertebraten exprimiert wird (Rossoll et al., 2002), ist der Knockdown-Effekt relativ spezifisch für das axonale Wachstum von Motoneuronen. Dies ließe sich erklären, indem eine hnRNP-R Defizienz unter normalen Umständen von anderen Proteinen kompensiert werden kann, wahrscheinlich von anderen Mitgliedern der hnRNP-Proteinfamilie, speziell vom in der Proteinsequenz sehr nah Verwandten hnRNP-Q. Überraschenderweise kann die Funktion von hnRNP-R beim axonalen Wachstum in Motoneuronen offensichtlich nicht kompensiert werden. Die Gründe dafür sind bisher nicht bekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass hnRNP-R und -Q Bestandteile unterschiedlicher Transport-Komplexe sind, die spezifische mRNAs in axonale oder dendritische Zellkompartimente leiten. Es könnte auch sein, dass die beiden nah verwandten Proteine der hnRNP-Familie zwar in beiden Zellkompartimenten vorhanden sind,

aber jeweils unterschiedliche mRNA Gruppen binden und nur die von hnRNP-R gebundenen mRNAs für axonales Wachstum und Wegfindung von Bedeutung sind.

6.1.7 *In vivo* Untersuchungen von Proteinen der hnRNP-Proteinfamilie

Die Funktion von Mitgliedern der hnRNP-Proteinfamilie beim subzellulären Transport von mRNAs in Neuronen wurde vorwiegend in Zellkultur-Systemen untersucht. Hingegen wurden die *in vivo* Funktionen dieser Proteine in Tiermodellen noch nicht näher betrachtet.

Deletionen der stark exprimierten hnRNP-C1 und -C2 Gene (Wan et al., 2001) in Mäusen ist in der frühen Embryonalentwicklung letal (Williamson et al., 2000). Ein Knockdown von hnRNP-C mittels siRNA in HeLa Zellen reduziert deren Fähigkeit, mit induziertem Stress fertig zu werden, was darauf hinweist, dass dieses Protein der hnRNP-Familie nicht nur eine Rolle in der zellulären Differenzierung und Proliferation spielt, sondern auch für das Überleben der Zellen von großer Bedeutung ist (Hossain et al., 2007). Ein Knockout des Apobec Komplementationsfaktors, der auch zur hnRNP-Proteinfamilie gehört, ist noch vor dem Einnisten der Blastozyste in die Gebärmutterschleimhaut letal (Blanc et al., 2005). Interessanterweise sterben diese Knockout-Mäuse in ähnlichen Entwicklungsstadien wie SMN^{-/-}-Mäuse (Schrack et al., 1997), denen humane SMN2 Kopien fehlen.

Das hnRNP-R Protein interagiert mit Smn, und eine Deletion der C-terminal gelegenen Interaktionsdomäne von hnRNP-R resultiert in einer stark reduzierten Bindungsaffinität von hnRNP-R an die β -Aktin mRNA (Yong et al., 2002; Rossoll et al., 2003).

Das HRP-2 Protein aus *C. elegans* ist hoch homolog mit hnRNP-R/Q. Ein Knockdown von HRP-2 in *C. elegans* führt zu Störungen der Embryogenese und der Fertilität der Fadenwürmer (Kinnaird et al., 2004). In den Knockdown Experimenten war eine hohe Sterblichkeitsrate zu beobachten und überraschenderweise konnten die Würmer keine Oozyten bilden. Wird dagegen bei adulten Fadenwürmern HRP-2 durch RNAi depletiert, ist ein Phänotyp nur schwer erkennbar, was zu der Vermutung führt, dass ein Verlust an HRP-2 Protein nur spezifische Entwicklungsprozesse beeinflusst, nicht aber die Aufrechterhaltung von bereits entwickelten Gewebestrukturen.

Die Deletion von UNC-75, einem *C. elegans* Protein mit RNA-Erkennungsdomänen (RRMs), führt zu einem spezifischen Defekt der synaptischen Funktion. Dies deutet darauf hin, dass es neben der bekannten Rolle in der nukleären RNA Prozessierung, noch eine Funktion im zytoplasmatischen Transport spezifischer mRNAs in die Synapsen besitzt (Loria et al., 2003).

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass hnRNP-R Knockdown das axonale Wachstum *in vivo* in Zebrafischen und *in vitro* in isolierten primären Motoneuronen beeinträchtigt (Glinka et al., 2010). Dies deutet auf eine Funktion des mRNA bindenden hnRNP-Rs hin, in Zusammenhang mit dem Sortieren und dem Transport von spezifischen mRNAs in das axonale Kompartiment von Motoneuronen. Die große Ähnlichkeit der Phänotypen von Smn und hnRNP-R defizienten Zebrafisch Embryonen und kultivierten Maus Motoneuronen weist darauf hin, dass die beiden miteinander interagierenden Proteine auch im selbem Signalweg in der Motoneuronentwicklung wirken. Ein besseres Verständnis der Funktionen und dem Zusammenwirken von hnRNP-R und Smn in der Entwicklung von Motoneuronen, könnte zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von SMA führen.

Smn spielt eine wichtige Rolle bei der Assemblierung von snRNP-Komplexen. Dabei fungiert es als zentraler Bestandteil eines Proteinkomplexes, Smn-Komplex genannt, mit anderen Proteinen wie Gemin2-8. HnRNP-R ist jedoch nicht in diesem Assemblierungskomplex enthalten. Es wurde auch kein hnRNP-R in aufgereinigten Spleißosomen gefunden, was eine Beteiligung am Spleißprozess unwahrscheinlich macht (Neubauer et al., 1998; Pellizzoni et al., 1999). Es wäre interessant heraus zu finden, ob durch hnRNP-R Überexpression eine Smn-Defizienz *in vivo* kompensiert werden kann, wie es bereits für snRNP-Komplexe in Zebrafisch Embryonen gezeigt werden konnte (Winkler et al., 2005).

Weitere Experimente sind nötig, um die genaue Rolle von hnRNP-R in Motoneuronen aufzuklären. Die bisherigen Ergebnisse schließen eine Funktion von hnRNP-R bei der translationalen Kontrolle von bestimmten mRNAs nicht vollständig aus. Für IMP1/ZBP1 wurde gezeigt, dass es an die Zipcode Domäne innerhalb der 3'-UTR der β -Aktin mRNA bindet und für die Translokation in distale Neuriten benötigt wird (Zhang et al., 2001; Oleynikov and Singer, 2003). Darüber hinaus konnte für dieses Protein eine Rolle in der Kontrolle der Translation der β -Aktin mRNA gezeigt werden (Huttelmaier et al., 2005). Es ist denkbar, dass hnRNP-R zusammen mit IMP1 an diesen Funktionen beteiligt ist.

6.2 Laser-Mikrodissektion von Wachstumskegeln primärer Motoneurone zur Isolierung axonaler RNA

Mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht fixierte, einzelne Wachstumskegel und distale Axone erfolgreich markiert und ausgeschnitten werden. Leider konnte die gewonnene RNA mit Standard Methoden nicht nachgewiesen werden. Die zu erwartenden RNA Konzentrationen sind alleine aufgrund der sehr geringen Biomasse einzelner Wachstumskegel wesentlich niedriger, als bei den Versuchen mit

kompartimentierten Kulturen. Es sind optimierte Protokolle für RNA-Präparationen von einzelnen Zellen publiziert, die es ermöglichen, Expressionsprofile durch quantitative real-time PCR zu erstellen (Liss, 2002; Grundemann et al., 2008). Für diesen experimentellen Ansatz müssen jedoch spezifische Primer für bestimmte Transkripte benutzt werden. mRNAs die unbekannte Proteine kodieren, lassen sich somit nicht aufspüren. Die Laser-Mikrodissektion in Kombination mit quantitativer einzelzell RT-PCR, kann bei der Funktionsaufklärung spezifischer Transkripte, die differentiell reguliert sind, hilfreich sein.

In einer kürzlich erschienen Studie wurden RNAs von Axonen und Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen der Maus und *Xenopus laevis* mittels Laser-Mikrodissektion (LMD) isoliert (Zivraj et al., 2010). Dabei wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und insgesamt 3 Runden einer linearen Amplifikation unterzogen. Obwohl in jedem Experiment 1000 Wachstumskegel gesammelt wurden, war die Ausgangsmenge der RNA vor der Amplifikation nicht messbar, wurde jedoch auf etwa 3 pg geschätzt. Dies zeigt, dass der experimentelle Ansatz, RNA aus Wachstumskegeln durch Laser-Mikrodissektion zu isolieren funktioniert, und mit Hilfe linearer Amplifikation genügend RNA für Mikroarray-Studien zu erzielen ist. Darüber hinaus ist auch bei fixierten Zellen eine ausreichende Qualität der RNA zu erreichen, sodass die Probleme mit nicht fixierten Zellen, die bei den Experimenten in dieser Arbeit aufgetreten sind, umgangen werden können. Dass nur etwa 100 Wachstumskegel isoliert wurden, bevor die nicht fixierten Zellen vollständig eingetrocknet waren, kann erklären weshalb unseren Experimenten keine RNA nachweisbar war.

Zivraj und Kollegen (2010) konnten zeigen, dass kodierende mRNAs, welche bei der Protein Synthese, der oxidativen Phosphorylierung, der Signaltransduktion und neurologischen Erkrankungen eine Rolle spielen, in Wachstumskegeln vorhanden sind, und dass einige Transkripte im Vergleich zum axonalen Kompartiment besonders stark in den Wachstumskegeln der Neurone akkumulieren. Dieser Befund unterstützt die Hypothese eines differentiellen Transports von mRNAs entlang des Axons in die Wachstumskegel stark polarisierter Zellen, wie Neurone.

6.3 Kompartimentierte Kulturen primärer Motoneurone zur Isolierung axonaler RNA

Extrazelluläre Gradienten sekretierter Zielfindungsfaktoren sind für das axonale Wachstum und neuronale Migration von großer Bedeutung (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Dickson, 2002). Oberflächengebundene Netrin-1 und BDNF Gradienten initiieren bei

kultivierten hippocampalen Neuronen die Axogenese, und beeinflussen darüber hinaus die Wachstumsrichtung der Neuriten (Mai et al., 2009).

Erst kürzlich wurde der Mechanismus der BDNF vermittelten Phosphorylierung von ZBP1 durch die Src-Kinase aufgedeckt, die nötig ist, um die β -Aktin mRNA lokal zu translatieren und somit eine Drehung des Wachstumskegels einzuleiten (Sasaki et al., 2010). Dieser Mechanismus kann erklären, warum Axone primärer Motoneuronen in kompartimentierten Kulturen entlang eines durch Diffusion eingestellten BDNF-Gradienten wachsen (vgl. 5.5.2). Mit dieser Kultur-Technik ist es möglich, eine große Zahl von primären Motoneuronen unter Bedingungen zu kultivieren, bei denen RNA Populationen aus Zellkörper nahen und distalen axonalen Kompartimenten getrennt voneinander untersucht werden können.

In einer kürzlich erschienenen Studie wurde RNA aus kompartimentierten Kulturen von nicht konditionierten, sensorischen Neuronen der dorsalen Wurzelganglien isoliert und für quantitative RT-PCR Analysen verwendet (Vogelaar et al., 2009). Die RNA wurde hierzu nicht amplifiziert, sondern es wurde gezielt nach bestimmten Transkripten in distalen Axonen verschiedener Entwicklungsstadien gesucht. Es hat sich gezeigt, dass zytoskelettale mRNAs wie β -Aktin, β -III-Tubulin, Peripherin, Vimentin und Myosin-II immer gefunden wurden. Die mRNA für das Mikrotubuli assoziierte Protein MAP2 wurde in den Axonen nicht gefunden, jedoch in Dendriten, was wiederum auf unterschiedliche Zusammensetzung von dendritischen und axonalen Transportpartikeln schließen lässt. mRNAs für Proteine, die im Zusammenhang mit dem Umbau des Zytoskeletts stehen, wie GAP-43, Calmodulin, Cofilin und Profilin waren ebenfalls immer vorhanden, während mRNAs die Zelloberflächenproteine kodieren, nicht gefunden wurden. In der Studie von Vogelaar und Kollegen (2010) lagen die Crossing-Points der β -Aktin RTq-PCR zwischen 28 und 32 und sind somit bei vergleichbaren Effizienzen (95% zu 92%; vgl. 5.4.4) der PCR Reaktionen im selben Bereich wie in dieser Arbeit für die β -Aktin RTq-PCR gezeigt. Daraus lässt sich folgern, dass sowohl die RNA Menge, die aus den kompartimentierten Motoneuronkulturen gewonnen wurde, als auch die Qualität der RNA vergleichbar ist. Einer linearen Amplifikation der isolierten RNA in folgenden Experimenten steht somit nichts im Weg.

In einer Folgestudie zu Vogelaar und Kollegen (2010) wurde RNA aus embryonalen und adulten sensorischen kompartimentierten Neuronenkulturen isoliert und nach einer linearen Amplifikation einer Mikro-Array Analyse unterzogen (Gumy et al., 2010). Auch hier konnte gezeigt werden dass in Axonen Transkripte akkumuliert sind, die zytoskelettal assoziierte Proteine kodieren, welche am axonalen Wachstum beteiligt sind, und sich die Zusammensetzung während der Entwicklung der Neurone verändert.

Ein Problem für Experimente mit kompartimentierten Neuronkulturen ergibt sich aus den hohen Zellzahlen pro Xona-Element, die benötigt werden, um die Zellkörper ausreichend nah und in hoher Dichte an die Mikrokanäle zu positionieren. Bei Versuchen mit weniger Zellen ist der Anteil an Axonen, die durch die Mikrokanäle in das axonale Kompartiment wachsen, zu gering. Eine große Menge primärer Motoneurone wird nur durch Zusammenführen mehrerer parallel präparierter Embryonen möglich. Bei wildtypischen Embryonen ist das für einen geübten Präparator ohne weiteres durchführbar. Möchte man aber transgene Maus-Linien untersuchen, so sind außer bei homozygoten Linien, nicht alle Embryonen eines Muttertieres vom gleichen Genotyp. Da die frisch präparierten Motoneurone möglichst schnell in Kultur genommen werden müssen (optimal < 1 h), ist eine Genotypisierung der einzelnen Embryonen vor dem Ausplattieren der Zellen zu zeitaufwendig. Es ist jedoch möglich, die Motoneurone unmittelbar vor dem Ausplattieren mit einem Lentivirus zu infizieren (vgl. Abbildung 5.35) und somit viral vermittelte Überexpressions- und Knockdown-Studien zu betreiben.

Es ist anzunehmen, dass die β -Aktin mRNA nicht die einzige mRNA ist, die von einem Transportkomplex an dem hnRNP-R, SMN oder IMP1 beteiligt sind, in Axone von Neuronen transportiert wird. Neben der Aufklärung, ob es sich um einen dedizierten axonalen Transportkomplex handelt und welche Komponenten genau daran beteiligt sind, müssen auch die Transkripte, die in das axonale Kompartiment transportiert werden, noch näher bestimmt werden. Dazu sind die kompartimentierten Kultursysteme, die in dieser Arbeit verwendet wurden geeignet. Mit dieser Technik lassen sich die Zusammensetzung von axonalen RNA Populationen, verschiedener Zellkompartimente genauso untersuchen, wie Änderungen in der Zusammensetzung nach Knockdown oder Knockout von Proteinen wie hnRNP-R, IMP1 oder beispielsweise SMN. Durch globale Array Analysen könnten sich neue, bislang unbekannte RNAs identifizieren lassen, die entweder selbst durch RNA Transportmechanismen transloziert werden oder an diesen Vorgängen beteiligt sind. Nach der Identifikation dieser Transkripte stellen sich weitere Fragen nach deren Regulation und Funktion im Zusammenhang axonaler Wegfindung, synaptischer Plastizität, und deren Rolle in neuronalen Pathomechanismen. Diese Technik könnte auch bei der Suche und Identifizierung von cis-wirkenden Lokalisierungs-Elementen der RNAs hilfreich sein. Bislang sind kaum Konsensus-Sequenzen identifiziert worden, die als Lokalisierungssequenz gelten. Dennoch wurde gezeigt, dass cis-wirkende Elemente in verschiedenen Zelltypen eine Lokalisierung von RNA-Reporterkonstrukten bewirken. Diese Tatsache könnte darauf hinweisen, dass allgemein

vorhandene RNA-Bindungsmoleküle am Transport der RNAs beteiligt sind (Bullock und Ish-Horowicz, 2001). Wenn die Zahl bekannter Transkripte mit cis-wirkenden Elementen steigt, wären bioinformatische vergleichende Sequenzanalysen einfacher und genauer als bislang durchführbar, da sich genauere Sequenzprofile erstellen lassen. Antworten auf diese offenen Fragen würden allgemein das Verständnis neuronaler Entwicklung und Plastizität erhöhen und eventuell neue bislang nicht näher betrachtete Moleküle in den Fokus aktueller Forschung rücken.

6.4 Herstellung eines hnRNP-R Knockout Konstruktes durch homologe Rekombination in *E. coli*

Das Grundprinzip der gezielten Mutagenese wurde bereits in den 1970er Jahren für die Hefe entwickelt und konnte später erfolgreich für Säuger etabliert werden, nachdem es gelang, pluripotente embryonale Stammzellen aus Maus Blastozysten zu kultivieren (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Bei der gezielten Mutagenese inseriert ein rekombinantes DNA Konstrukt durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen an den Genort eines Zielgens. Dabei kann es sich um ein Konstrukt handeln, bei dem keine funktionelle mRNA des Zielgens mehr transkribiert wird (Knock-out), oder es kommt zur Transkription einer veränderten mRNA (Knock-in). Es gibt vielfältige Strategien, um einen solchen Targeting-Vektoren zu klonieren. Allen Targeting-Vektoren ist gemeinsam, dass zwei lange Segmente genomischer DNA, die so genannten Homologiearme, die mutierte Zielsequenz flankieren. Sie werden für den ortsgerichteten Austausch von Genmaterial zwischen dem Donor-Konstrukt und der genomischen Zielsequenz, in einem Crossing-Over Ereignis auf einem Chromosom benötigt. Dabei werden die Sequenzbereiche, die zwischen den Homologiearmen des Targeting-Vektors liegen, in das Genom integriert. Eine positive Selektionskassette z.B. eine Neo-Kassette, welche in Prokaryoten eine Resistenz für das Antibiotikum Neomycin vermittelt und Eukaryoten immun gegen den Wirkstoff G418 macht, wird deshalb zwischen die Homologiearme eingefügt. Somit ist es im weiteren Verlauf möglich, Stammzellen zu selektieren, bei denen das Konstrukt am richtigen Genort integriert ist (homologe Rekombination). Außerhalb der Homologiearme kann eine weitere, negative Selektionskassette, wie z.B. für die Thymidinkinase des Herpes simplex Virus (HSV-tk) angehängt werden. Im Falle einer nicht homologen Rekombination wird das gesamte linearisierte Konstrukt an einem zufälligen Ort im Genom integriert (nicht homologe oder zufällige Rekombination). Damit wird auch das Gen der Thymidinkinase integriert, welches

diese Zellen für das Nukleinbasen Analoga Ganciclovir sensitiv macht und die Replikation inhibiert.

Für das Design der Homologiearme haben sich 3 Faktoren als bedeutsam herausgestellt, zum einen deren Länge. Bei klassischen Konstrukten haben sich insgesamt 7-15 Kb als geeignet erwiesen, wobei auf den „langen Arm“ mindestens 5-6 Kb und auf den „kurzen Arm“ ca. 1-2 Kb entfallen sollten. Für den kurzen Arm sollte nicht größer als 3 Kb Länge gewählt werden, um eine einfache Kontroll-PCR auf ein erfolgreiches homologes Rekombinations-Ereignis zu ermöglichen. Die Gesamtlänge der Homologiearme wird von der Aufnahmekapazität des Klonierungsvektors und dem Vorhandensein geeigneter Restriktionsschnittstellen für die Linearisierung des Konstruktes, zur Elektroporation in die Embryonalen Stammzellen beschränkt. Ein Plasmid basierter Targeting-Vektor ist im Allgemeinen max. 20 Kb lang und in der Lage, bis zu ~15 Kb im embryonalen Stammzell Genom zu deletieren (Wu et al., 2008).

Die Identität zwischen den Homologiearmen des Targeting-Konstrukts und der das Zielgen flankierenden genomischen Sequenz beeinflusst die Effektivität der homologen Rekombination ebenfalls. Daher ist es sinnvoll, die Homologiearme aus Genmaterial zu gewinnen, das zu der verwendeten Stammzell-Linie isogen ist (Deng and Capecchi, 1992). Zuletzt sind lange repetitive Sequenzabschnitte innerhalb der Homologiearme zu vermeiden. Dies kann mit BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) oder RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) getestet werden.

Die homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus hat sich als sehr effektiv herausgestellt und wird seit Jahren erfolgreich angewendet. Um geeignete rekombinante Konstrukte herzustellen, ist man zumeist auf *in vitro* Klonierungsstrategien wie, passende Restriktionsschnittstellen, Ligation und den Einsatz der PCR Technik angewiesen. Sind keine passenden Restriktionsschnittstellen vorhanden, muss eine komplexe Klonierungsstrategie, oft mit mehreren Zwischenkonstrukten, angewendet werden. Die PCR Technik impliziert immer die Gefahr, ungewollte Mutationen in die Sequenz der Homologiearme einzuführen, auch wenn mittlerweile fehlerkorrigierende „Highfidelity“ Polymerasen weit verbreitet sind. Ein weiteres Problem sind notwendige Sequenzierungen der Zwischenprodukte und des fertigen Targeting-Vektors. Dabei ist es schwierig, Polymorphismen und ungewollte Mutationen durch PCR Amplifikationen zwischen den verwendeten Stammzelllinien zu unterscheiden. Embryonale Stammzellen werden

normalerweise aufgrund ihrer Agouti Fellfarbe, aus der 129sv Linie gewonnen, für die es bisher keine vollständige genomische Sequenz verfügbar ist. Lediglich für den C57BL/6J Mausstamm ist dies der Fall. Von diesem schwarzen Mausstamm werden die Blastozysten mit den manipulierten Stammzellen injiziert, um letztlich Chimäre (Braun-schwarze) Tiere zu erhalten.

Da alle Versuche mit klassisch durch *in vitro* Klonierungsstrategien gewonnenen Knockout Konstrukten eine hnRNP-R defiziente Maus zu erzeugen bisher fehlgeschlagen sind, wurde in dieser Arbeit eine neue Methode angewendet. Dabei wird durch homologe Rekombination in *E. coli* mit dem Red/ET System, beispielsweise ein BAC Klon mit einem genomischen Fragment, welches die Sequenz des Zielgens enthält, manipuliert. Ein Teil des Zielgens wird dabei deletiert, bzw. durch ein Marker-Gen ersetzt. Letztlich handelt es sich um eine *in vivo* Technik ohne aufwändige und fehlerbehaftete Klonierungsstrategien, um auf relativ einfache und schnelle Weise ein geeignetes Targeting-Konstrukt für eine gezielte Mutagenese zu erlangen.

Der größte Vorteil dieser Technik liegt darin, sehr viel längere Homologiearme ohne ungewollte Mutationen zu erhalten, als dies mit *in vitro* Klonierungsstrategien möglich ist. Durch diese überlangen Homologiearme ist die Frequenz der homologen Rekombinationsereignisse stark erhöht, und somit auch die Zahl an Klonen mit der erwünschten hnRNP-R Deletion. Es besteht immer die Möglichkeit, dass das Zielgen in einer Region des Maus Genoms liegt, das generell nur niedrigere Rekombinationsfrequenzen ermöglicht. Dabei kann es sein, dass die DNA in diesem Bereich erheblich methyliert oder besonders dicht in Heterochromatin verpackt ist. Auch ausgedehnte Bereiche von repetitiven Sequenzen im Genom verringern die Frequenz der homologen Rekombination stark (Jensen-Seaman et al., 2004). Lange Homologiearme könnten in diesen Fällen die Wahrscheinlichkeit eines homologen Rekombinations-Ereignisses deutlich erhöhen.

Ein Nachteil des ursprünglich angewendeten Gene Bridges Protokoll für das hnRNP-R Targeting-Konstrukt ist, dass es nicht möglich ist, eine negative Selektionskassette an die Homologiearme anzuhängen und somit homolog rekombinierte Klone anzureichern. Werden in einem Experiment $\sim 10^6$ Embryonale Stammzellen mit einem linearisierten Targeting-Vektor transfiziert, überleben nur etwa die Hälfte der Zellen diese Prozedur. Davon sind nur ein geringer Teil von ca. 0,1% (= 500 Zellen) transformiert. Leider erlangt nur ~ 1 Klon von

1000, durch homologe Rekombination eine Neo-Resistenz. Alle anderen Klone sind durch zufällige Rekombinationsereignisse entstanden (Thomas und Capecchi, 1987). Auch mit überlangen Homologiearmen, die zu einer erhöhten Rekombinationsfrequenz führen, ist immer noch eine nicht unerhebliche Zahl nicht homolog rekombinierter Klone zu erwarten, die aufgrund der langen Homologiearme nicht per PCR getestet werden können. In einer Studie wurde zunächst ein exponentieller Zusammenhang der Homologie-Länge und der homologen Rekombinationsfrequenz gefunden (Thomas und Capecchi, 1987). Eine darauf folgende Studie legt einen linearen Zusammenhang nahe (Shulman et al., 1990). Bei einer weiteren Studie hat sich gezeigt, dass zwischen 1,3 und 6,8 Kb Länge der Homologiearme eine dramatische Erhöhung der Rekombinationsfrequenz auftritt (Hasty et al., 1991). Noch längere Homologien führten zu keiner weiteren Erhöhung der Rekombinationsfrequenz. Auch bei einer anderen Arbeit von Capecchi zeigte sich ein starker Zusammenhang zwischen der Homologie-Länge und der homologen Rekombinationsfrequenz (*targeting frequency*), bis zu 14 Kb und einem Plateau bei 18 Kb (Deng und Capecchi, 1992). Allerdings konzentrieren sich alle diese Studien vornehmlich auf die Mindest-, bzw. optimale Länge klassischer Targeting-Vektoren bei der circa 15 Kb Homologie-Länge als ausreichend erachtet werden. Konstrukte von mehreren 10 bis 100 Kb Länge, wie sie heute durch BAC Modifikationen möglich sind, sind nicht in diese Studien eingeflossen. Dennoch ist es nötig, eine relativ große Zahl G418 selektionierter Stammzellen auf homologe Rekombination zu testen. Im Falle des hnRNP-R Konstruktes ist eine Kontroll-PCR nicht möglich, da die Homologiearme dazu zu lang sind. Der durchgeführte quantitative Southern Blot ist zeit- und kostenintensiv. Auch ein Testen der Klone durch quantitative RT-PCR ist aufgrund der benötigten Zahl an Reaktionsansätzen unwirtschaftlich. Der zeitliche Vorteil der Herstellung des Targeting-Konstruktes geht somit in dieser Phase teilweise wieder verloren.

Bei Zebrafisch Embryonen, die mit hohen Dosen hnRNP-R Morpholinos injiziert wurden, waren erhöhte Mortalitätsraten und schwere Fehlbildungen zu beobachten, die sich wahrscheinlich aus Störungen während der Embryonal-Entwicklung ableiten. Daher ist es denkbar, dass eine hnRNP-R Knockout-Maus embryonal letal ist. Allerdings wurde weder bei den hnRNP-R Morpholino injizierten Zebrafisch Embryonen (vgl. 5.2.8), noch bei den Lentiviral supprimierten primären Motoneuronen (Glinka et al., 2010) eine Auswirkung auf das Überleben der Motoneurone beobachtet. Nicht geklärt ist die Frage nach einer evtl. ubiquitären Funktion von hnRNP-R in der embryonalen Entwicklung. Es ist sinnvoll, zunächst weitere Elektroporationen mit dem vorhandenen hnRNP-R Knockout-Konstrukt

durchzuführen und homolog rekombinierte Stammzell-Klone in Blastozysten zu injizieren, um Chimären zu generieren. Mit einer konditionalen hnRNP-R Knockout Maus wäre man in der Lage die Produktion des hnRNP-R Proteins nur in bestimmten Geweben, beispielsweise neuronalen Zelltypen abzuschalten. Es wäre auch denkbar, hnRNP-R in einem Zeitfenster zu deaktivieren, in dem die Embryonalentwicklung bereits soweit fortgeschritten ist, dass ein Fehlen von hnRNP-R nicht mehr im Tod der Embryonen endet, entsprechende Cre-Mauslinien für die Verpaarung mit einer geflochten hnRNP-R Maus vorausgesetzt. Außerdem wäre es sinnvoll, ein entsprechendes neues Konstrukt mit einer negativen Selektionskassette auszustatten, um eine Anreicherung von Klonen, bei denen es zu einer homologen Rekombination gekommen ist, zu erzielen. Das Protokoll von Wu und Kollegen (Wu et al., 2008), sieht eine *in vitro* Modifikation von BAC Klonen vor, die durch homologe Rekombination in *E. coli* manipuliert wurden. Dadurch ist es mittlerweile möglich, das Gen der Thymidinkinase des Herpes simplex Virus an die Homologiearme des Targeting-Konstrukts anzuhängen, eine Option, die zu Beginn des Projektes nicht zur Auswahl stand. Es wäre auch möglich, ein mit Tetracyclin, bzw. Doxycyclin (Tet-on, bzw. Tet-off System) reversibel induzierbares Konstrukt zu entwerfen, das einem die Möglichkeit gibt die hnRNP-R Transkription zu einem gewählten Zeitpunkt ein- oder auszuschalten (Gossen und Bujard, 1992; Gossen and Bujard, 2002).

6.5 Axonale RNA Populationen: Warum und wie werden mRNAs differentiell in Axonen und Wachstumskegeln lokalisiert?

6.5.1 Das Zusammenspiel cis- wirkender Lokalisierungs-Elemente von RNAs und trans-wirkender RNA Bindungsproteine

Die Translokalisierung von spezifischen mRNAs in periphere subzelluläre Kompartimente polarisierter Zellen ist ein hoch konservierter Mechanismus, der der Sortierung von Proteinen dient (Martin and Ephrussi, 2009). Dabei interagieren cis-wirkende Lokalisierungs-Elemente der mRNAs, oft in der 3'-UTR gelegen, mit trans-wirkenden RNA bindenden Proteinen. Auf diese Art und Weise wird eine Regulation der Genexpression mit zeitlicher und räumlicher Kontrolle erreicht. Dabei können die cis-wirkenden Elemente die Lokalisierung der RNAs durch aktiven, gerichteten Transport erzielen. Als gut verstandenes Beispiel gilt die *bicoid* mRNA von *Drosophila*, die durch in der 3'-UTR gelegene Lokalisierungssignale (*bicoid localization elements*, BLEs) an den anterioren Pol der Oocyte translokalisiert wird (Macdonald und Struhl, 1988; Macdonald et al., 1993; Ferrandon et al., 1997). Auch die

zipcode Domäne in der 3'-UTR der β -Aktin mRNA gilt als zytoplasmatische Adressierungssequenz (Lawrence und Singer, 1986; Kislauskis et al., 1994; Ross et al., 1997). Cis-wirkende Elemente können RNAs aber auch lokal stabilisieren oder für eine regulierte Degradation derselben sorgen, wodurch ebenfalls eine lokale Anreicherung bestimmter mRNAs erzielt wird. So wird die hsp83 mRNA (*heat shock protein 83*) überall im Zytoplasma der *Drosophila* Oocyte degradiert, nur nicht am posterioren Pol. Die dafür verantwortlichen Elemente liegen wiederum in der 3'-UTR der mRNA (Bashirullah et al., 2001; Tadros et al., 2007). Frei diffundierende mRNAs, wie beispielsweise von *nanos*, können an bestimmten Punkten in der Zelle lokal eingefangen und verankert werden (Forrest und Gavis, 2003). Sehr gut untersuchte Beispiele für mRNAs mit cis-wirkenden Lokalisierungselementen sind vorwiegend Transkripte, deren Proteinprodukte eine spezifische Rolle in distalen Kompartimenten besitzen, wie etwa der Transkriptionsrepressor ASH1 der Hefe. Seine mRNA wird in die Knospe einer sich teilenden Hefezelle transportiert, wobei sie ausschließlich in den Zellkern der Tochterzelle gelangt und dort das Umschalten auf den anderen Paarungstyp verhindert. In *Drosophila* Eizellen sind die Lokalisierungen von mRNAs, wie *bicoid*, *oskar* und *nanos* an die anterioren und posterioren Pole im Detail untersucht. Die definierte Lokalisation dieser mRNAs wird für die Ausbildung von Morphogengradienten benötigt, die exakten räumlichen Mustern der sich entwickelnden Embryonen unterliegen (Johnstone und Lasko, 2001). In Fibroblasten lokalisiert die β -Aktin mRNA in Lamellipodien. Die lokale Translation der β -Aktin mRNA ist hierbei für die zytoskeletal vermittelte Motilität der Zellfortsätze nötig (Condeelis und Singer, 2005). Bei der Entwicklung des Gehirns erlaubt die lokale Translation von mRNAs in axonalen Wachstumskegeln, den Zellfortsätzen auf externe Zielmoleküle zu reagieren und so den richtigen Weg zu ihren synaptischen Partnern zu finden (Lin und Holt, 2007).

Die Mechanismen der mRNA Lokalisation in bestimmte subzelluläre Kompartimente sind wahrscheinlich weiter verbreitet als bisher angenommen, und nicht nur auf mRNAs beschränkt, die für Proteine mit spezifischen Funktionen in diesen Kompartimenten kodieren. So konnte gezeigt werden, dass einige Hundert mRNAs in Neuriten von Säugerneuronen lokalisiert sind und viele Funktionen kodieren (Eberwine et al., 2002; Martin und Zukin, 2006).

6.5.2 Warum werden bestimmte mRNAs spezifisch lokalisiert?

Zu den Vorteilen, die Zellen aus der Regulation der Genexpression durch Lokalisierung von mRNAs erzielen, zählen zunächst eine räumlich begrenzte Expression im Zytoplasma. Darüber hinaus kann diese räumlich begrenzte Expression zeitlich sehr hoch aufgelöst werden. Anstatt erst ein Signal in den Zellkern zu senden, das die Transkription initiiert, anschließend die mRNA aus dem Zellkern zu exportieren, sie zytoplasmatisch zu translatieren und dann jedes einzelne Protein zum Ort des Geschehens zu transportieren, können lokale Stimuli eine sofortige Translation der bereits vor Ort befindlichen mRNAs bewirken.

Lokale Translation von mRNAs bietet auch den ökonomischen Vorteil, dass eine mRNA mehrfach abgelesen und somit vielfältige Kopien eines Proteins hergestellt werden können. Ein weiterer Nutzen besteht darin, dass durch lokale Proteinsynthese der Rest der Zelle vor schädlichen Wirkungen, die das Protein in anderen Kompartimenten entfalten könnte, geschützt ist (Martin und Ephrussi, 2009).

6.5.3 Externe Signale und lokale Proteinsynthese von spezifisch lokalisierten mRNAs

Beim Vergleich von Zellkörper- und axonalen Kompartimenten sind also große Unterschiede in der Zusammensetzung von mRNA Populationen einer polarisierten Nervenzelle wie Motoneuronen zu erwarten.

Externe Signale können die Translation von lokalen mRNAs initiieren. Bei Neuronen ist die Regulation der lokalen Proteinsynthese als Reaktion auf Neurotrophine, axonale Zielfindungsfaktoren und Neurotransmitter ein grundlegender Mechanismus, um die axonale Wegfindung und Plastizität zu regulieren. (Sasaki et al., 2010). Guidance cues und ihre Rezeptoren werden klassisch den vier Proteinfamilien Netrinen, Ephrinen, Slits und Semaphorinen zugeordnet. Spinale Axone finden bei Netrin-1 defizienten Mäusen ihren vorgegebenen Weg zur Bodenplatte nicht. Zellen, die in der Bodenplatte ansässig sind, sezernieren normalerweise dieses diffusionsfähige Protein und geben den kommissuralen Neuronen somit ein Richtungssignal, wohingegen Axone von Zellen des Augenrollnervs (*trochlear nerve*) von Netrin-1 abgestoßen werden (Serafini et al., 1996). Vom Zellkörper getrennte Axone reagieren *in vitro* auf Netrin-1 und Semaphorin3A Signale mit einer chemotrophen Antwort, die durch Inhibitoren der Proteinsynthese geblockt werden kann, wodurch gezeigt wurde, dass die lokale Proteinsynthese in Axonen für die Wegfindung benötigt wird (Campbell und Holt, 2001). Lokale axonale Translation, um eine schnelle chemotrophe Reaktion als Antwort auf externe Signale einzuleiten, wurde auch für z.B., Slit2 (Piper et al., 2006) und BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) beschrieben. So

akkumuliert β -Aktin mRNA zusammen mit dem *Xenopus* Homolog von ZBP1 (*Vg1 RNA-binding protein*, VgRBP) an jener Seite des Wachstumskegels, die in Richtung einer BDNF-Quelle gelegen ist und zu der sich der Wachstumskegel während des Wachstums wendet (Yao et al., 2006). Darüber hinaus induzieren sowohl BDNF, wie auch Netrin-1 die lokale Translation der β -Aktin mRNA in Wachstumskegeln (Leung et al., 2006; Yao et al., 2006). Werden Antisense-Morpholinos gegen die zipcode-Sequenz von VgRBP eingesetzt, wenden sich die Wachstumskegel nicht mehr zur BDNF-Quelle. Morpholinos, die eine Neusynthese von Aktin-Protein verhindern, führen ebenfalls dazu, dass die Wachstumskegel nicht zum Netrin-Gradienten auswachsen.

Diese Daten belegen, dass die β -Aktin mRNA-Lokalisierung und Proteinsynthese für eine Änderung der Wachstumsrichtung von Wachstumskegeln unabdingbar ist, und untermauern gleichzeitig eine mögliche Funktion von ZBP1/IMP1 in diesem Prozess. Tatsächlich konnte in einer kürzlich erschienenen Studie gezeigt werden, dass die erforderliche Phosphorylierung von ZBP1 durch die Src-Kinase (Huttelmaier et al., 2005; Dahm und Kiebler, 2005) von BDNF vermittelt wird und für die lokale Translation der β -Aktin mRNA und anschließender Drehung des Wachstumskegels nötig ist (Sasaki et al., 2010).

7. Literaturverzeichnis

Ahmad N, Lingrel JB (2005) Kruppel-like factor 2 transcriptional regulation involves heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and acetyltransferases. *Biochemistry* 44:6276-6285.

Appel B, Korzh V, Glasgow E, Thor S, Edlund T, Dawid IB, Eisen JS (1995) Motoneuron fate specification revealed by patterned LIM homeobox gene expression in embryonic zebrafish. *Development* 121:4117-4125.

Bardoni B, Schenck A, Mandel JL (2001) The Fragile X mental retardation protein. *Brain Res Bull* 56:375-382.

Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD (2001) Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7025-7028.

Baumer D, Lee S, Nicholson G, Davies JL, Parkinson NJ, Murray LM, Gillingwater TH, Ansorge O, Davies KE, Talbot K (2009) Alternative splicing events are a late feature of pathology in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS Genet* 5:e1000773.

Beattie CE, Melancon E, Eisen JS (2000) Mutations in the stumpy gene reveal intermediate targets for zebrafish motor axons. *Development* 127:2653-2662.

Bechade C, Rostaing P, Cisterni C, Kalisch R, La B, V, Pettmann B, Triller A (1999) Subcellular distribution of survival motor neuron (SMN) protein: possible involvement in nucleocytoplasmic and dendritic transport. *Eur J Neurosci* 11:293-304.

Birnbiom HC und Doly J (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.

Blanc V, Henderson JO, Newberry EP, Kennedy S, Luo J, Davidson NO (2005) Targeted deletion of the murine apobec-1 complementation factor (acf) gene results in embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 25:7260-7269.

Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-S9.

Brittis PA, Lu Q, Flanagan JG (2002) Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell* 110:223-235.

Brumwell C, Antolik C, Carson JH, Barbarese E (2002) Intracellular trafficking of hnRNP A2 in oligodendrocytes. *Exp Cell Res* 279:310-320.

Bullock SL, Ish-Horowicz D (2001) Conserved signals and machinery for RNA transport in *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Nature* 414:611-616.

Campbell DS, Holt CE (2001) Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32:1013-1026.

Carson JH, Barbarese E (2005) Systems analysis of RNA trafficking in neural cells. *Biol Cell* 97:51-62.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH, Jr., Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302:113-117.

Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci* 2:806-819.

Condeelis J, Singer RH (2005) How and why does beta-actin mRNA target? *Biol Cell* 97:97-110.

Conti AM, Fischer SJ, Windebank AJ (1997) Inhibition of axonal growth from sensory neurons by excess nerve growth factor. *Ann Neurol* 42:838-846.

Dahm R, Kiebler M (2005) Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature* 438:432-435.

Deng C, Capecchi MR (1992) Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 12:3365-3371.

Dickson BJ (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298:1959-1964.

Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR (2000) Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Hum Mol Genet* 9:2443-2449.

Dreyfuss G, Choi YD, Adam SA (1989) The ribonucleoprotein structures along the pathway of mRNA formation. *Endocr Res* 15:441-474.

Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:195-205.

Dreyfuss G, Matunis MJ, Pinol-Roma S, Burd CG (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62:289-321.

Dreyfuss G, Philipson L, Mattaj IW (1988) Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *J Cell Biol* 106:1419-1425.

Eberwine J, Belt B, Kacharina JE, Miyashiro K (2002) Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem Res* 27:1065-1077.

Eisen JS, Pike SH, Romancier B (1990) An identified motoneuron with variable fates in embryonic zebrafish. *J Neurosci* 10:34-43.

Ephrussi A, Dickinson LK, Lehmann R (1991) Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66:37-50.

Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 256:1555-1560.

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.

- Fan L, Simard LR (2002) Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* 11:1605-1614.
- Farina KL, Huttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH (2003) Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol* 160:77-87.
- Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70:358-368.
- Ferrandon D, Elphick L, Nusslein-Volhard C, St JD (1994) Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79:1221-1232.
- Ferrandon D, Koch I, Westhof E, Nusslein-Volhard C (1997) RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *EMBO J* 16:1751-1758.
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90:1023-1029.
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM (2004) Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10:1055-1063.
- Forrest KM, Gavis ER (2003) Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol* 13:1159-1168.
- Glinka M (2005) Charakterisierung der Wirkung von β -Aktin mRNA Bindungsproteinen beim Axonwachstum von Motoneuronen. Diplom Arbeit, Julius-Maximilian-Universität Würzburg
- Glinka M, Herrmann T, Funk N, Havlicek S, Rossoll W, Winkler C, Sendtner M (2010) The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal beta-actin mRNA translocation in spinal motor neurons. *Hum Mol Genet* 19:1951-1966.
- Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5547-5551.
- Gossen M, Bujard H (2002) Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* 36:153-173.
- Grundemann J, Schlaudraff F, Haeckel O, Liss B (2008) Elevated alpha-synuclein mRNA levels in individual UV-laser-microdissected dopaminergic substantia nigra neurons in idiopathic Parkinson's disease. *Nucleic Acids Res* 36:e38.
- Gu W, Pan F, Zhang H, Bassell GJ, Singer RH (2002) A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J Cell Biol* 156:41-51.
- Gubitza AK, Feng W, Dreyfuss G (2004) The SMN complex. *Exp Cell Res* 296:51-56.

Gumy LF, Yeo GS, Loraine Tung YC, Zivraj KH, Willis D, Coppola G, Lam BY, Twiss JL, Holt CE, Fawcett JW (2010) Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization. *RNA*.

Hadano S, et al. (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29:166-173.

Hansen TV, Hammer NA, Nielsen J, Madsen M, Dalbaeck C, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC (2004) Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24:4448-4464.

Hassfeld W, Chan EK, Mathison DA, Portman D, Dreyfuss G, Steiner G, Tan EM (1998) Molecular definition of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (hnRNP R) using autoimmune antibody: immunological relationship with hnRNP P. *Nucleic Acids Res* 26:439-445.

Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:5586-5591.

Havin L, Git A, Elisha Z, Oberman F, Yaniv K, Schwartz SP, Standart N, Yisraeli JK (1998) RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev* 12:1593-1598.

Hengst U, Deglincerti A, Kim HJ, Jeon NL, Jaffrey SR (2009) Axonal elongation triggered by stimulus-induced local translation of a polarity complex protein. *Nat Cell Biol* 11:1024-1030.

Hieronimus H, Silver PA (2004) A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* 18:2845-2860.

Hoek KS, Kidd GJ, Carson JH, Smith R (1998) hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* 37:7021-7029.

Hossain MN, Fuji M, Miki K, Endoh M, Ayusawa D (2007) Downregulation of hnRNP C1/C2 by siRNA sensitizes HeLa cells to various stresses. *Mol Cell Biochem* 296:151-157.

Huang X, Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res* 9:868-877.

Hutchinson SA, Eisen JS (2006) Islet1 and Islet2 have equivalent abilities to promote motoneuron formation and to specify motoneuron subtype identity. *Development* 133:2137-2147.

Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438:512-515.

Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007) Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 179:139-149.

Jablonka S, Karle K, Sandner B, Andreassi C, von AK, Sendtner M (2006) Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 15:511-518.

- Jablonka S, Rossoll W, Schrank B, Sendtner M (2000) The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J Neurol* 247 Suppl 1:I37-I42.
- Jablonka S, Sendtner M (2003) Molecular and cellular basis of spinal muscular atrophy. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4:144-149.
- Jensen-Seaman MI, Furey TS, Payseur BA, Lu Y, Roskin KM, Chen CF, Thomas MA, Haussler D, Jacob HJ (2004) Comparative recombination rates in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Res* 14:528-538.
- Johnstone O, Lasko P (2001) Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet* 35:365-406.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.
- Kelm RJ, Jr., Elder PK, Strauch AR, Getz MJ (1997) Sequence of cDNAs encoding components of vascular actin single-stranded DNA-binding factor 2 establish identity to Puralpha and Purbeta. *J Biol Chem* 272:26727-26733.
- Kennedy WR, Alter M, Sung JH (1968) Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset. A sex-linked recessive trait. *Neurology* 18:671-680.
- Kessler MM, Henry MF, Shen E, Zhao J, Gross S, Silver PA, Moore CL (1997) Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes Dev* 11:2545-2556.
- Kiebler MA, Bassell GJ (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 51:685-690.
- Kiledjian M, Dreyfuss G (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* 11:2655-2664.
- Kim VN, Dreyfuss G (2001) Nuclear mRNA binding proteins couple pre-mRNA splicing and post-splicing events. *Mol Cells* 12:1-10.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- Kinnaird JH, Maitland K, Walker GA, Wheatley I, Thompson FJ, Devaney E (2004) HRP-2, a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, is essential for embryogenesis and oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Cell Res* 298:418-430.
- Kislauskis EH, Zhu X, Singer RH (1994) Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* 127:441-451.
- Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G (2007) Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol* 22:990-994.
- Kong L, Wang X, Choe DW, Polley M, Burnett BG, Bosch-Marce M, Griffin JW, Rich MM, Sumner CJ (2009) Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29:842-851.

- Korinthenberg R, Sauer M, Ketelsen UP, Hanemann CO, Stoll G, Graf M, Baborie A, Volk B, Wirth B, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K (1997) Congenital axonal neuropathy caused by deletions in the spinal muscular atrophy region. *Ann Neurol* 42:364-368.
- Krecic AM, Swanson MS (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol* 11:363-371.
- Lawrence JB, Singer RH (1986) Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* 45:407-415.
- Lee MS, Henry M, Silver PA (1996) A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev* 10:1233-1246.
- Lee MS, Silver PA (1997) RNA movement between the nucleus and the cytoplasm. *Curr Opin Genet Dev* 7:212-219.
- Leeds P, Kren BT, Boylan JM, Betz NA, Steer CJ, Gruppuso PA, Ross J (1997) Developmental regulation of CRD-BP, an RNA-binding protein that stabilizes c-myc mRNA in vitro. *Oncogene* 14:1279-1286.
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, . (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80:155-165.
- Leung KM, van Horck FP, Lin AC, Allison R, Standart N, Holt CE (2006) Asymmetrical beta-actin mRNA translation in growth cones mediates attractive turning to netrin-1. *Nat Neurosci* 9:1247-1256.
- Liao B, Patel M, Hu Y, Charles S, Herrick DJ, Brewer G (2004) Targeted knockdown of the RNA-binding protein CRD-BP promotes cell proliferation via an insulin-like growth factor II-dependent pathway in human K562 leukemia cells. *J Biol Chem* 279:48716-48724.
- Lin AC, Holt CE (2007) Local translation and directional steering in axons. *EMBO J* 26:3729-3736.
- Liss B (2002) Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res* 30:e89.
- Liu Q, Siomi H, Siomi MC, Fischer U, Zhang Y, Wan L, Dreyfuss G (1996) Molecular characterization of the protein products of the fragile X syndrome gene and the survival of motor neurons gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61:689-697.
- Loria PM, Duke A, Rand JB, Hobert O (2003) Two neuronal, nuclear-localized RNA binding proteins involved in synaptic transmission. *Curr Biol* 13:1317-1323.
- Lottspeich F und Zorbas H (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akad Verlag
- Lynch M, Chen L, Ravitz MJ, Mehtani S, Korenblat K, Pazin MJ, Schmidt EV (2005) hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. *Mol Cell Biol* 25:6436-6453.

- Macdonald PM, Kerr K, Smith JL, Leask A (1993) RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* 118:1233-1243.
- Macdonald PM, Struhl G (1988) cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in *Drosophila* embryos. *Nature* 336:595-598.
- Mai J, Fok L, Gao H, Zhang X, Poo MM (2009) Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J Neurosci* 29:7450-7458.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634-7638.
- Martin KC, Ephrussi A (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* 136:719-730.
- Martin KC, Zukin RS (2006) RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci* 26:7131-7134.
- McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* 162:919-931.
- Meister G, Eggert C, Fischer U (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol* 12:472-478.
- Melancon E, Liu DW, Westerfield M, Eisen JS (1997) Pathfinding by identified zebrafish motoneurons in the absence of muscle pioneers. *J Neurosci* 17:7796-7804.
- Melki J (1997) Spinal muscular atrophy. *Curr Opin Neurol* 10:381-385.
- Merz C, Urlaub H, Will CL, Luhrmann R (2007) Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment. *RNA* 13:116-128.
- Mizutani A, Fukuda M, Ibata K, Shiraishi Y, Mikoshiba K (2000) SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *J Biol Chem* 275:9823-9831.
- Monani UR (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48:885-896.
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8:1177-1183.
- Monani UR, Pastore MT, Gavriline TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH (2003) A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 160:41-52.
- Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric

survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9:333-339.

Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309:1514-1518.

Mourelatos Z, Abel L, Yong J, Kataoka N, Dreyfuss G (2001) SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J* 20:5443-5452.

Myers PZ, Eisen JS, Westerfield M (1986) Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J Neurosci* 6:2278-2289.

Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, Ajuh P, Sleeman J, Lamond A, Mann M (1998) Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nat Genet* 20:46-50.

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-133.

Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC (1999) A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 19:1262-1270.

Norvell A, Kelley RL, Wehr K, Schubach T (1999) Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in *Gurken* localization during oogenesis. *Genes Dev* 13:864-876.

Noubissi FK, Elcheva I, Bhatia N, Shakoory A, Ougolkov A, Liu J, Minamoto T, Ross J, Fuchs SY, Spiegelman VS (2006) CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature* 441:898-901.

Oleynikov Y, Singer RH (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13:199-207.

Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di LM, DeBiasi S, Battaglia G (2000) Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet* 9:47-56.

Park JW, Kim HJ, Byun JH, Ryu HR, Jeon NL (2009) Novel microfluidic platform for culturing neurons: culturing and biochemical analysis of neuronal components. *Biotechnol J* 4:1573-1577.

Parsons MJ, Campos I, Hirst EM, Stemple DL (2002) Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* 129:3505-3512.

Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11167-11172.

- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G (1998) A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 95:615-624.
- Pinol-Roma S, Dreyfuss G (1993) hnRNP proteins: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 3:151-155.
- Piper M, Anderson R, Dwivedy A, Weinl C, van HF, Leung KM, Cogill E, Holt C (2006) Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron* 49:215-228.
- Reyes R, Haendel M, Grant D, Melancon E, Eisen JS (2004) Slow degeneration of zebrafish Rohon-Beard neurons during programmed cell death. *Dev Dyn* 229:30-41.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, . (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17:2158-2165.
- Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning 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.
- Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* 11:93-105.
- Runge S, Nielsen FC, Nielsen J, Lykke-Andersen J, Wewer UM, Christiansen J (2000) H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J Biol Chem* 275:29562-29569.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463–5467.
- Sasaki Y, Welshhans K, Wen Z, Yao J, Xu M, Goshima Y, Zheng JQ, Bassell GJ (2010) Phosphorylation of zipcode binding protein 1 is required for brain-derived neurotrophic factor signaling of local beta-actin synthesis and growth cone turning. *J Neurosci* 30:9349-9358.
- Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9920-9925.
- Sendtner M (2001) Molecular mechanisms in spinal muscular atrophy: models and perspectives. *Curr Opin Neurol* 14:629-634.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* 87:1001-1014.

- Shan J, Munro TP, Barbarese E, Carson JH, Smith R (2003) A molecular mechanism for mRNA trafficking in neuronal dendrites. *J Neurosci* 23:8859-8866.
- Shen EC, Henry MF, Weiss VH, Valentini SR, Silver PA, Lee MS (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* 12:679-691.
- Shulman MJ, Nissen L, Collins C (1990) Homologous recombination in hybridoma cells: dependence on time and fragment length. *Mol Cell Biol* 10:4466-4472.
- Shyu AB, Wilkinson MF (2000) The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* 102:135-138.
- Stohr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH, Huttelmaier S (2006) ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol* 175:527-534.
- Strausberg RL, et al. (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16899-16903.
- Tadros W, Goldman AL, Babak T, Menzies F, Vardy L, Orr-Weaver T, Hughes TR, Westwood JT, Smibert CA, Lipshitz HD (2007) SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in *Drosophila* and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev Cell* 12:143-155.
- Taylor AM, Blurton-Jones M, Rhee SW, Cribbs DH, Cotman CW, Jeon NL (2005) A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2:599-605.
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274:1123-1133.
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Tiruchinapalli DM, Oleynikov Y, Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, Singer RH, Bassell GJ (2003) Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* 23:3251-3261.
- Trevarrow B, Marks DL, Kimmel CB (1990) Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* 4:669-679.
- Vikesaa J, Hansen TV, Jonson L, Borup R, Wewer UM, Christiansen J, Nielsen FC (2006) RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J* 25:1456-1468.
- Visa N, zhanova-Ericsson AT, Sun X, Kiseleva E, Bjorkroth B, Wurtz T, Daneholt B (1996) A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell* 84:253-264.
- Vogelaar CF, Gervasi NM, Gumy LF, Story DJ, Raha-Chowdhury R, Leung KM, Holt CE, Fawcett JW (2009) Axonal mRNAs: characterisation and role in the growth and regeneration of dorsal root ganglion axons and growth cones. *Mol Cell Neurosci* 42:102-115.

- Wan L, Kim JK, Pollard VW, Dreyfuss G (2001) Mutational definition of RNA-binding and protein-protein interaction domains of heterogeneous nuclear RNP C1. *J Biol Chem* 276:7681-7688.
- Wei CC, Zhang SL, Chen YW, Guo DF, Ingelfinger JR, Bomsztyk K, Chan JS (2006) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K modulates angiotensinogen gene expression in kidney cells. *J Biol Chem* 281:25344-25355.
- Westerfield M (1995) *The Zebrafish Book*. University of Oregon, Eugene, OR, USA
- Wiese S, Herrmann T, Drepper C, Jablonka S, Funk N, Klausmeyer A, Rogers ML, Rush R, Sendtner M (2010) Isolation and enrichment of embryonic mouse motoneurons from the lumbar spinal cord of individual mouse embryos. *Nat Protoc* 5:31-38.
- Wilhelm JE, Vale RD (1993) RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol* 123:269-274.
- Will CL, Luhrmann R (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13:290-301.
- Williamson DJ, Banik-Maiti S, DeGregori J, Ruley HE (2000) hnRNP C is required for postimplantation mouse development but is dispensable for cell viability. *Mol Cell Biol* 20:4094-4105.
- Willis DE, van Niekerk EA, Sasaki Y, Mesngon M, Merianda TT, Williams GG, Kendall M, Smith DS, Bassell GJ, Twiss JL (2007) Extracellular stimuli specifically regulate localized levels of individual neuronal mRNAs. *J Cell Biol* 178:965-980.
- Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Laggerbauer B, Fischer U (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* 19:2320-2330.
- Winkler C und Moon RT (2001) Zebrafish mdk2, a novel secreted midkine, participates in posterior neurogenesis. *Dev Biol* 229:102-118.
- Winkler J und Ludolph AC Hrsg. (2004) *Neurodegenerative Erkrankungen des Alters*. Georg Thieme Verlag (Kapitel 2.4; Motoneuronenerkrankungen).
- Wu KY, Hengst U, Cox LJ, Macosko EZ, Jeromin A, Urquhart ER, Jaffrey SR (2005) Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* 436:1020-1024.
- Wu S, Ying G, Wu Q, Capecchi MR (2008) A protocol for constructing gene targeting vectors: generating knockout mice for the cadherin family and beyond. *Nat Protoc* 3:1056-1076.
- Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29:160-165.

Yao J, Sasaki Y, Wen Z, Bassell GJ, Zheng JQ (2006) An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca²⁺-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci* 9:1265-1273.

Yong J, Pellizzoni L, Dreyfuss G (2002) Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex. *EMBO J* 21:1188-1196.

Zhang H, Xing L, Rossoll W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ (2006) Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons. *J Neurosci* 26:8622-8632.

Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dichtenberg JB, Singer RH, Bassell GJ (2001) Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31:261-275.

Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ (2003) Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 23:6627-6637.

Zivraj KH, Tung YC, Piper M, Gumy L, Fawcett JW, Yeo GS, Holt CE (2010) Subcellular profiling reveals distinct and developmentally regulated repertoire of growth cone mRNAs. *J Neurosci* 30:15464-15478.

8. Anhang

dr.4457 Unigene cluster (vgl. 5.1.2):

```

gctgttgttt gagcgatggg accgtctcgt tctgtctcgt gggttcatct cgagtgcctt
tactgtgatt taccgtgagt tctgcccgtc atgaaccggg attgaccgcg ctctacagct
ccccgtgccg cccggtccac attgtcacgt aatggccgca gaggtgaacg gcagctctgt
tctgctgaag gaggaagagg agcccatgga ggtgacggcc ccgctctctg agaactatca
ggcgtctctg gatgccccgc tccccagaa ggtggccgag agcctggata acatcttcca
gaccggtgag tctgcccgag acggtctcgt ggcgtatgag gatctggacg agcgcgctct
ggatgcccgt cgggagttta atgaggaagg agctctgtca gtgctgcagc agttcaagga
gtctgatctc tcacatgtgc agaataagag tgcgttctctg tgcggcgtga tgaagaccta
caggcaacgg gagaagcagg gcaataaagt gcaggagtcc agcaaaggcc ccgacgagac
caagattaag gctctgctgg ataggaccgg atacacactg gatgtcacca ccggtcagcg
gaagtacggg gggccgccac ctgatgcagt gttctccggc ccacagcccg gcattggcac
tgaggtgttt gtgggtaaga tcccgcgtga cctgtatgag gatgagctgg ttccctctgtt
tgagaaggcg ggctccatct gggacctgag gcgggacgctc tggccacttt tatcccatat
cctcctcttg ttttaaatcc accatgaacg ttttaagaa gactctgtga ggacgctaata
catgaaatgg cttctgagc agatgtgtgt cctcgtctc ctccctctcc tctcagtaata
agtggcgtag ggactcgcgt gtaaataacg gctgtcagc agagcttctt ttctttctct
ttgtttttgc agcgggtggg aaaagaatcc accagaagga gaagcgtttt gtagcagcag
gaccgctgtt tccgtgtctg tttagcattt ctagaagtag tgggtgtgtt ttttaactga
tgtactgata ttataccctc agatgtcttc tgttttccat tgggatttgc tgggtgaggg
ttggtctggc ttaccttaag agctgcccgc gctgggtctga tgtttgtatt tataacttta
ttttattttt gttcagttcc aataaaaact gatcagagcaa cttccaaaaa aaaaaaaaaa
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

Primerlage für die Amplifikation der Zebrafisch hnRNP-R cDNA

(Touch-down PCR, vgl. 5.1.3):

Sequenz gekürzt: (...)

```

                                Sense1
ACCGGGACTGACCGCGCTCTACAGCTCCCCGTGCCA CCGGTCCACATTGTCACGTAATG GCCGCAG...
...TTCTCACAGGACTCCTACCGCCAGCAGTGGAAGTAGAGCCCCGCCCCCTGCAGGAGCAGCACCCCT
                                Antil

```

Genomische Maus hnRNP-R Sequenz (RP24-36E15, BAC Klon), mit integrierter Tn5-neo Kasette:

Sequenz gekürzt: (...)

Tn5-Promoter, Neomycin

Primer für die Herstellung des Tn5-neo PCR-Produkts (vgl. 5.2.1):

Bacmod1, Bacmod2

PCR Screen der modifizierten BAC Klone (vgl. 5.2.1):

Primer1, Neo_anti

Neo_sense, Primer2

Southern Blot Charakterisierung von ΔhnRNP-R BAC Klonen (vgl. 5.2.2):

Sonde1, vor Deletion: **SS1 und SA1**

Sonde2, nach Deletion: **SS2 und SA2**

...TTTCCCGCCTCCGCCCGCCGCTGTCCGCGGCCCGGTCCGGG**SS1**
GTTTCCCCCTGACCCCGGTGCTTGCCCCGAGGCCTGCGGTGAGGCCTGGCCCCGCTCTC
 GCCCCGGCGCCTGTGGGATGTGTTGATAACCGGGTGCGCCCGAGGGGGTGGGGTGAGCC
 GAGGGCGGGGTGCAAGTCCCAGGGTTACCTGAGCCGGGAGCAAACCTTTTACGGGAGTCGG
 AGCCGAGGGGCCGAGGTATGGGGGGTGCCTCCCGCCGATCCCCAACCTGCATGCTTCGA
 GCCGGGATTTGAAGGAAAAAATGACTACTAAGAGGCGGTGACACTTGGTTTCGAGCGGCG
 CCTGAGCTAGGTAATTCTGAGAATGTCATAGGCGCTCCAGTTTGGAAAAGCGCTTCTTTT
 TCTTACACGGTAGTAGCCATGTGGCCAGAATTTAAGACGAAAGCCAGGGGTCTCTGAA
 AGGTTTCAGTCCTTTCTCGTTACCTGTTTGGGATTTTTCCCCCCTTGCCCTTTAAAAGCA
 GAATGTGTCAGGAGTCAGTCGTAGTGATTAAAGGCTTGATACTCCCGAGCTGTGAGATAA
 CCGTTAGCTTTTCTTGGTTCTTTTTAAAAGCCCGTCTCTCAACATTTTGCTTAGAGATGTT
 CGCCACAAGTCAGGGAGAAGCTAGTACTGACTTCCCAGTCTCCCAGCGGTCTTATAAAA
 TCTTATTTAAATGACTTTATTTTGTAAATTTCTTTTTTTTGCAAAAATGTTTGTGTCAAA
 GGGTTCAGTCACGTTAGAATATTTGCTGCATCCAGAAATATGGTTTGGCTGTGTGGCAT
 TGTGTTGAATCCCCCTCTTGATCCGAAGGATTTATTTTCTAGAGTCTATTTTACCTTT
 TTTTTTTTTTAGGTTAAAGTTGACAAAATCTGAACATTTTAAAAGTTTGTATCAATG
 GTAGTCATAAATGCTTGTGCTTAATACATAACTTGTCAATTTGCTTCACGCATACTTTT
 CAAAAACACTCCACCTAACAGATGTTTCATCGAACTTCTCAGTTAATTTCTCTCTCTGTA
 ACATAGTATTCATAGGTGCAGTGTATGAAGGTCTTGTACAGAACTTTTGAGTTGTGAT
 CTTTCGTATAGTGTGTTGTGGGGGAGGAATGGGAAAAGCACAAATGTATGTCCACAGAAAAGAT
 TTTGGATTTTAGAATGCTTCTTTATAGAAGTAGGTTGTTTTAATCAGTAAAAAGGTTTCAT
 CTTACATTTTACGTGCTAGTATAGTGGTTTCTTGTGCCAGTTTGGATGTTTCTATTTTT
 TGCTAGTTCATCAGAAATTTGAGGCTTGCCTTGAGATACATCGTTAAGTACAGTCGCGTCT
 CTGTAGACATTAGAGGACTAGTGAGAGCTTTGTGATGAGAAGT**CATGCAGCTGTCAAGTC**
ATTCTCAGAGTAACACCCTTACACTCTGCTTCTACTATTGCCTTCTCTTTCTCT...
SA1

Primer1

...GTTTGTGATCT**GCTCCCCAGAACACAACGGCT**GCTTCTGTTACTCAGCAATTGTAC
 CTGCCGTAAACTCAAGTCTTCTACCCAGAGTACATGAAGTTGCTTAAGGATCCGATAC
 TTCCATGTACATTTTCTATAGTTTGACAAGATTATTACTGGAAATATAGGTCAGATGCTC
 ACAAAGGCATAAAATATTCTGGATAGTTATTAGCAGCATGTGTACAAATTAGTTGAGGT
 AAATCATGAATTGCTCTACAATCTAGTTATTTCTGGCTTAATGTAATATAGCTCCTGAAT

Bacmod1

TTTTTCAGCAGCATAATAAA**ATGGCTAATCAGGTGAATGGTAATGCGGTACAGTTAAAA**
GAAGAGGAAGAAC...

Tggacagcaagcgaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaaggttgggaagcctg
 Caaagtaaactggatggctttcttgccgccaaggatctgatggcgcaggggaatcaagatctgatcaagagacag
 gatgaggatcgcttctcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagaggctat
 tccgctatgactgggcacaacagacaatcggdgtgctctgatgccgcccgttccggctgtcagcgcagggcgcc

Neo_sense**Neo_anti**

Cggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgcoctgaatgaactgcaagacgagggcagcgcggtatcgtggc
 tggccacgacggcgcttcccttgccgagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaaggactggctgctattgg
 gcaagtgccggggcaggatctcctgtcatctcaccttgcctcctgccgagaaagatccatcatggctgatgcaa
 tgcggcggctgcatacgttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcatcgagcgcagcac
 gtactcggatggaagccggctctgtcgatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaac
 tgctcggcaggctcaaggcgcagcatgcccgcagggcaggatctcgtcgtgacctatggcgatgctgcttggcca
 atatcatggtggaaaatggccgctttctggattcatcgactgtgcccggctgggtgtggcggaccgctatcagg
 acatcagcttggctaccgctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttccctcgtgcttacg
 gtatcgcgctcccgatccgcagcgcacgccttctat**cgcttcttgacgagttcttctga---**

Bacmod2

---GCAAGGTGGTGACTATTCTGGTAACTATGGTTACAATAATGACAACCAAG**AATTTTA**
 TCAGGATACTTATGGGCAACAGTGGAAA**TAGACAAGTGAGGGCTTGAAAACGATTCTGTC**

SS2**Primer2**

AAGATCCAATTGGCTCTAGAT**TCTACATTCTTCAAACAAAATTGGCG**TAACTGTTTCATCT
 TTAAGTAGCAGTTTGTGCCATTTGTATTACAGCTGAAGAAGTCACTATTGTGTATATACT
 CAAGGCTTCTTATTTTTCTTCTTTTCTAAATGCTCTTGGACATTATTGGGCTTGCAGAGT
 TCCCTTATTCTGGGGCTACAATGCTTTTATCGTTCCAAGCTTCATCTTAGCTTCAGAACA
 AACTGTTAAATCATGATTTTGCAGAACCTTTGGTTTGGACAGTTCTGTTCTTTTGGATTT
 GGAATAGATTACATAGGAGTATGAAGTATGCTGTAAATAAAAAGTACAAGCCAGTGTCTTGT
 TCTTAGTAGTTTTAAGAAATTAAGCAAACAGACTTAAAGTTTCTTGTATTGAAGATAAC
 CTATGACTGTATGTTTTGCATTCTTAGAAGCAGGTTAACTGTGTTTTTAAATTTGTTATAA

TAAAATTACCCTGAAAGATCACGCGGGGGGCTGCCTTTAAGTAAGACTTA
 GGTGTCCTTCTGTTTTGTTTTTCTCTTTATATATAGCTTCTTTGTGCTTT
 AATGTGTAACAGCTAGTTGACAAAGGTAGTATTGACAGCTTGTAAAACCA
 AAACACTTTCCAGTTTTAAAACCCCTTATATTTGNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNAATCACACATTTGGTTGGTTA
 TGTGAAAAGGAGACTAGCAAGTATNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
 NNN
 NNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNGGTTATTAAGTTTAGAGATTCATGCTGAAGAAA
 GGTCTGTTGGTGCATACCTCCAACATGTGTGTCATATGGAAGGCCAGTGA
 GGAAGTGACACTTGCCCATCTATTAATAATTTAAATTGTCTTGTGGGTCTT
 CATTATCNN
 NNN
 NNN

I1c4436h3-sense

NNNNGTCCTCATTCTTAAAAAGATTCTAAAAAGGGGGCTAGTTCTTGAA
 AAGTGCAACTTTCACTTGAGGAGGAGAGTATTAAGGAGGAAAAGAGGCAGA
 GAAACTGAAAGGGATGAAAGGATTAGAGACTTGGGCCTTGGATTTCCAC
 CTGTCCTTTAAAGAGGAGCCGTTGGAGAAAACCCCTTCTGTTACAGGGTGG
 GAGACAGATGCAGCCATCTTGAAGATAGAGGCTGGGCTCATTGCTCTC
 AAAAAGTTTTGGAGTTCCTCTTTTCAAAAAAAAAAAAAAGTGGGGTTATG
 TGGTCTGGGGGAGAGCTGTGCTCTGTGGGCTCTTCTGGAGAACCCACC
 TGACCTCCCCGCTGCTCCCAGCCCTCACCCCTGCACCCCATCTTTTCTG
 AGCCTCACTTCTTTTCCAGGGTCTCAAGACCTTGGATCAGGACTCAGT
 TCCTGAACCTTCTATCTCCTGGACGGAGGGCTGTGCAGCCGTGGGACC
 CCATCCCTTGCAGACCTTGGAAAAAGGGGGAGAAGCTAGTACAGTGGT
 CCTGGGGTCAACCCCTACCCCGATGTTACCCCTACACCGACACCACTAGC
 TAGCTGATCTGGGACTAGAACCCCGATCATAAACTGTCAGTATCTGTCAT
 CTTTACAAGCTGTGACATCTGATTGTCCTGAAGGCTGATTGAGACTATAA
 CAAGGAGAAATAATGATGACAGGGTCTTGTTTTTTTTTTTTTTCCATTGCT
 ATTTTTTGCTTGTTTTTAAAGCCCCAGAAAATGAGTGAATCCCTTGAGTC

I1c4436h3-anti

TTTTAAAGANN
 NNN
 NNN
 NNN
 NNN
 NNN
 NNN
 NNN
 NATATTGTTTGTTTTTTTTTTATAATGTATAAAGATAAACAGGTGTTGCTG
 TTGGCTCCTGGGAGGCACTGACTCAGGGTCTAGTTCTTTTGTCTCTATCT
 GGATACACTGTTAACTTCTCCCCAAAACAGAAGCAAGGGTCTCTTAAGA
 AAAGAAAAAAGTAAAAACAAAACAAAACCCCTAACCTGTACTTAAGGTA
 CAGGCTTCTTTGGTTATTGATCGCTTGATTTGGCTAGAAATGATTAGATA
 AGATAAACACGGGGTTGAAGGAACAGGTTACTAGCCGGAAGTGTTCAGT
 GCAGCCTGAATTCTGAATTCTAGAATTGAATGTTCCCTTGAGGATTTGAC
 CAACAATGACCATGTACTTCATAGATGCGAATGCTACTAATTGCACAGCC
 AGCCTTGTAAGGCCTGTTTTTTTCTCCCCCCCCATGCCGTACAGTAAGTT
 GGGGATAAATGGGATAGGAACAAGCCTTCTCTCAAATATAAGCCACTGA
 AATCAAATAAGTGTGATGATGATGATAAATCCTGAGGTTTTCCAAAGTAGG
 TCTGGACCTCATAATTTAATGTAGTTGGAGAGAAATCTGATTGCACTGA
 GCAATCATCAGACATGAGTTGTGTTGTAAGGTTAGGTACCAGGAGCAAA
 GCCGGCCAGCAGGCAACTGTTTCAGTAACTTGGGATGGCTAGAAAGGACT
 GATCGGGTTAATCAGTGTGTTACGACCTAGGCAGGCAGTCTTATGCAAC
 TGATACTTAAGGGGCTAGAAGGCACAGAAGAACTAATGGGCAGGTTGGG
 GATTTTTGCTGGGTTTGGGGAGGGCCAAAAGGAAGTTTTTCTCTTTGCAG
 TGGCAAGCATCAAGTGTGTTTCTTGATTTTCTCTGAATTGTTGTTGTTCTG
 TGTATTCTAGTTAGACTATTATTTCTTTAGCAAAGTGAGAATTTTCGNN
 NNN
 NNN
 NNN


```

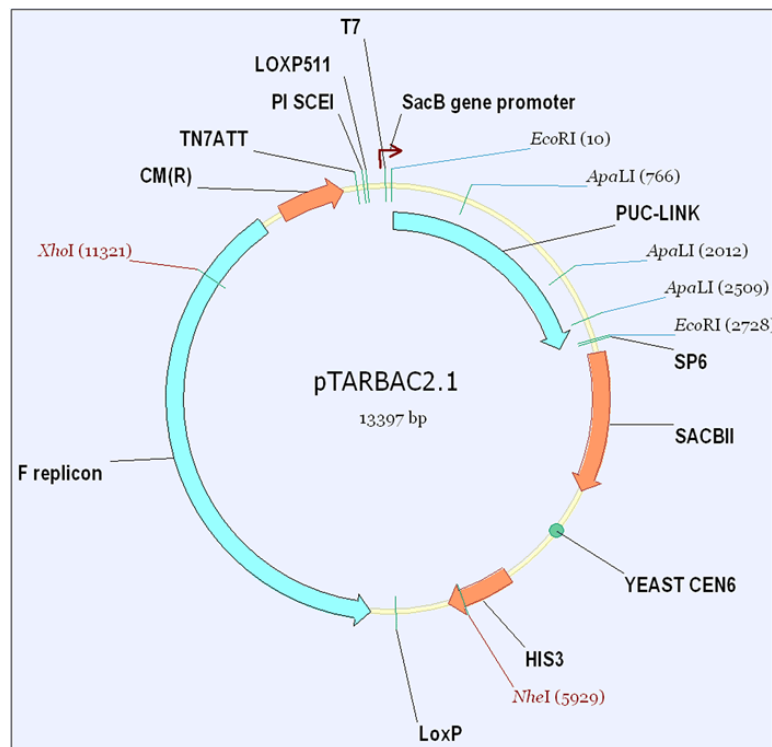
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGAAGAGAGAGAATTTTCCAAATGTTTCATTTAG
AGTTAATTTTCAGGAAATGGAAATGTTTCAGTTGCAAAATCTGAGTGGGNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNCACCACCACCTGGCGCCAGAGTTTGAAATTCATTTACTTATTTT
AAGACAGGGTCTCATTATACAGGTGCGGTGGCTTAA

```

pTARBAC2.1 BAC Vektor

Die die vollständige hnRNP-R Sequenz sowie 136,6 kb upstream vom Start-, bzw. 41,4 kb downstream vom Stop-Codon sind zwischen 2 NotI-Schnittstellen eingefügt.

Die NotI Schnittstellen, sind nicht auf der Vektorkarte verzeichnet. Sie liegen bei: 2848 und 13433 Basen



9. Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Würzburg, den 31. Januar 2011

Michael Glinka

10. Publikationen

Originalarbeiten:

Glinka M, Herrmann T, Funk N, Havlicek S, Rossoll W, Winkler C, Sendtner M (2010) The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal beta-actin mRNA translocation in spinal motor neurons. Hum Mol Genet 19:1951-1966.

Abstracts:

Glinka M, Sendtner M, Winkler C. Knockdown of hnRNP R in zebrafish causes defective axongrowth in spinal motor neurons. Poster präsentiert bei: Neuroscience Meeting of the Society for Neuroscience 2008, Washington, DC, USA, 14.11.-19.11.2008

11. Danksagung

Allen voran, gilt mein aufrichtiger Dank Prof. Dr. Michael Sendtner, der mich diese Arbeit in seinem Institut anfertigen lies und mit seinem fachlichen Wissen und persönlichen Engagement die Gestaltung wesentlich beeinflusst hat.

Dabei haben sich die Arbeitsbedingungen am Institut für klinische Neurobiologie als hervorragend gezeigt. Nicht nur wegen der optimalen Ausstattung und den nahezu unbegrenzten Möglichkeiten, sondern auch wegen der Kollegialität und Loyalität untereinander. Explizit möchte ich mich auch noch einmal für die Ermöglichung der Teilnahme an Internationalen Kongressen bedanken, die ich als sehr positive Erfahrungen behalten werde. Sicher nicht zuletzt wegen der steten Hilfe und dem Feinschliff seitens Prof. Sendtner, bei den Vorbereitungen.

Ich möchte mich bei Dr. Christoph Winkler bedanken, mit dem wir eine Kooperation bei den Zebrafisch Experimenten hatten und der mich als „Externen“, auf netteste und freundlichste Art in seine Gruppe aufgenommen hat und unzählige Injektionen gemeistert hat. Danke, auch an deine damaligen Mitarbeiter.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Erich Buchner dafür, dass er sich als Zeitgutachter meiner Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Ich möchte allen Personen und Kollegen, auch wenn sie nicht extra erwähnt sind, am Institut für klinische Neurobiologie danken, die mich während meiner Arbeit in so vielerlei Hinsicht unterstützt haben. Besonders hervorheben möchte ich Natalja Funk, die mich bei meiner Diplom Arbeit betreut hat und mir zu Beginn der Doktorarbeit eine unglaublich große Hilfe, nicht nur mit ihrem riesigen molekularbiologischen Wissen war. Vieles von dem kritischen Denken und steten Hinterfragen, das nötig ist habe ich von Dir mit bekommen. Vielen lieben Dank!

Dr. Thomas Herrmann, Dr. Carsten Drepper und Dr. Christine Mais danke ich besonders, aber nicht nur, für die kompetente Hilfe und vielerlei Tipps und Tricks im Laboralltag. Dr. Florian Bender und Nikolas Frank danke ich für die Hilfe bei den Motoneuronpräparationen, den unzähligen fachlichen Diskussionen und Niki für das „Gschmarri“ zwischendurch. Ich wünsche Dir und Deiner Familie, dass sich alles zum Guten wendet.

Bei Dr. Robert Blum möchte ich für seine Expertise bei den quantitativen Echtzeit-PCR Analysen bedanken und dafür, dass er immer Zeit hatte, wenn ich mit meinen Fragen daher kam.

Sonja Hesbacher, Zuzanna Fouskova und Simone Rink, möchte ich danken, das sie sich so vorzüglich um meine Stammzellen gekümmert haben.

Michaela Kessler, Katrin Walter und Sabrina Loos, danke ich dafür, dass sie mir immer bei allen Problemen im Labor geholfen haben und auch mal den einen oder anderen Puffer übrig hatten.

Thank you for being such nice colleagues and for all the interesting discussions we had:

Rena Rathod, Lidia Albanito, Anna Maria Musti, Bhuvaneish Thangaraj Selvaraj, Rajeeve Sivadasan and Narajan Subramanian.

Thanks Bhu, for helping me with the mousepreps when I needed “another 2 billion motis”...

Unserem Tierstall Team, allen voran Viktor Buterus, Joachim Horschig und Regine Sendtner, sowie unseren Damen vom Sekretariat, Urveen Oberoi-Lehrider und Judita Grimm, auch ein herzliches Dankeschön! Andrea Wetzel danke ich dafür das sie mich an die Danksagung erinnert hat.

Ich möchte mich bei meiner geliebten Freundin Heike, für deine Liebe bedanken und das Du immer für mich da warst. Ohne Dich an meiner Seite, wäre das Alles nichts.

Mein letzter Dank gebührt meinen Eltern. Euch habe ich am meisten zu verdanken.

