

Die Rolle von CRAF bei der adulten hippocampalen Neurogenese
The role of CRAF in adult hippocampal neurogenesis

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin



vorgelegt von
Marion Verena Pfeiffer
aus Ingolstadt

Würzburg 2013

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Sendtner

1. Betreuer: PD Dr. Rudolf Götz

2. Betreuer: Prof. Dr. Christoph Winkler

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Brand

4. Betreuer: PD Dr. Robert Blum

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Ulf R. Rapp

und

Herrn PD Dr. Rudolf Götz

Am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Meinen Eltern und Fred

„Erfahrung ist nicht das, was einem zustößt. Erfahrung ist das, was du aus dem machst, was dir zustößt.“ (Aldous Huxley)

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
1. 1.1. Einführung in die morphologische Entwicklung des Zentralnervensystems	3
1.2. Adulte Neurogenese im Gehirn	5
1.2.1. Die Chronologie der wissenschaftlichen Entwicklung	5
1.2.2. Derzeitiger Wissensstand	6
1.2.3. Regulatoren adulter Neurogenese	7
1.2.3.1. Fehlsteuerung der Neurogenese durch physiologische und patho-physiologische Mechanismen	8
1.2.4. Neuronale Stammzellen	8
1.2.4.1. Definition der neuronalen Stammzelle	8
1.2.5. Adulte Neurogenese bei Nicht-Säugetier- und Säugetiervertebraten	9
1.3. Der Hippocampus: Lage, Aufbau, Verschaltung und Funktion	11
1.3.1. Lage und Aufbau	11
1.3.2. Verschaltung	12
1.3.3. Funktion	13
1.3.4. Hippocampusentwicklung bei der Maus	15
1.4. Permanente Marker mitotischer Zellen	16
1.4.1. Verschiedene Methoden im Vergleich	16
1.4.2. ³ H-Thymidin und BrdU-Markierung	17
1.4.3. Retrovirale Markierung mitotischer Zellen	18
1.4.4. Charakterisierung mitotischer Zellen	18
1.4.4.1. Identifizierungsmarker	18
1.4.4.2. Mitotische Zellen der SVZ und SGZ und des Kortex	19
1.5. Mediatoren adulter Neurogenese	22
1.5.1. Neurobiologische Betrachtung der Zelldifferenzierung	22
1.6. Neuronale Reifungsprozesse	25
1.6.1. Faktoren die eine Zellzyklusveränderung hervorrufen können	26
1.6.2. Zellzykluslänge und neuronale Differenzierung	28
1.6.3. Zellzyklusverändernde Faktoren können neurologische Erkrankungen hervorrufen	29
1.7. Funktionelle Bedeutung adulter Neurogenese	29
1.7.1 Die Auswirkung der adulten hippocampalen Neurogenese auf das Lernen und die Gedächtnisbildung	29
1.8. Eliminierungssysteme überschüssiger neugebildeter Zellen	31
1.9. Die Familie der RAF Kinasen	33
1.9.1. Die Geschichte ihrer Entdeckung	33

1.9.2. Signaltransduktion	34
1.9.3. Aufbau und Struktur	36
1.9.4. Funktion	36
1.9.5. Aktivierung	37
1.10. Funktion der RAF Kinasen	37
1.11. Funktionen auf andere Mitglieder der mitogenen Kaskade	41
1.12. Eigene Fragestellung	42
2. Material und Methoden	43
2.1. Material	43
2.1.1. Instrumente und Geräte	43
2.1.2. Sonstiges	44
2.1.3. Chemikalien	45
2.1.4. Betäubungsmittel	47
2.1.5. Enzyme und Puffer	47
2.1.6. Kits	48
2.1.7. Oligonukleotide	48
2.1.8. Versuchstiere	48
2.1.8.1. Generierung CRAF-defizienter Mäuse	48
2.1.8.1.1. Genotypische Analyse und quantitative Auswertung der Zuchtergebnisse	49
2.1.8.2. Generierung SPC CRAF-transgener Tiere	50
2.1.8.2.1. Genotypische Analyse der Zuchtergebnisse	50
2.1.9. Versuchsbedingungen	51
2.1.9.1. Allgemeine Tierhaltungsbedingungen	51
2.1.9.1.1. Experimentelles Design	51
2.1.9.2. Tierhaltungsbedingung in einer reizreichen Umgebung	51
2.1.9.3. Standardlabortierhaltungsbedingungen	52
2.1.10. Antikörper	52
2.1.10.1. Erstantikörper	52
2.1.10.1.1. Erstantikörper für die Histologie	52
2.1.10.1.2. Erstantikörper für Western Blot	53
2.1.10.2. Zweitantikörper	53
2.1.10.2.1. Zweitantikörper für die Histologie	53
2.1.10.2.2. Zweitantikörper für Western Blot	54
2.1.11. Injektionslösungen	54
2.1.11.1. Injektionslösungen für die Anästhesie	54

2.1.12. Sonstige Reagenzien	55
2.2.2. Lösungen und Puffer	55
2.2.1. Lösungen für die Genotypisierung	55
2.2.1.1. Puffer für die horizontale Gelelektrophorese	56
2.2.1.2. Ladepuffer für horizontale Gelelektrophorese Templates	56
2.2.1.3. Lösungen für die Perfusion	56
2.2.2. Puffer und Lösungen für die Histologie	57
2.2.3. Titrierlösungen für die pH-Wert Einstellung	58
2.2.4. Puffer und Lösungen für die Proteinanalyse	58
2.2.5. Sonstige Lösungen	61
2.2.6. Färbelösungen	61
2.2.7. Eindeckmittel für dehydrierte Gewebe	62
2.2.8. Lösungen für die Zellkultur	62
2.2.9. Strukturformeln	63
2.2.3. Methoden	63
2.3.1. Immunhistologische Methoden	63
2.3.1.1. Gewebereinbettung	63
2.3.1.1.1. Gewebereinbettung in OCT™ (tissue tec®)	63
2.3.1.1.2. Gewebereinbettung in Paraffin	64
2.3.2. Immunhistochemische Färbemethoden	64
2.3.2.1. Paraffin Schnitte	68
2.3.2.2. Cryo Schnitte	71
2.3.2.3. Hämatoxylin/Eosin Färbung	72
2.3.2.4. Galloxyanin oder Nissl Färbung	72
2.3.2.5. TUNEL Assay	72
2.3.2.6. BrdU Färbung	73
2.3.3. Immuncytochemie	73
2.3.3.1. Embryoisolation	73
2.3.3.2. Primäre Kulturen postmitotischer Neurone aus dem embryonalen Telencephalon	73
2.3.3.3. Immuncytochemie kortikaler Neurone	74
2.3.3.3.1. Migrationsassay kortikaler Neurone via Transwell® Assay	75
2.3.3.3.2. Beschichtung der Zellkulturplatten	76
2.3.4. Methoden zur DNA-Amplifikation	76

2.3.4.1. PCR (Polymerase Ketten-Reaktion)	76
2.3.4.1.1. PCR-Reaktion mit der Taq-Polymerase	77
2.3.4.1.2. Herstellung der Lysate aus Mausschwanzbiopsien	78
2.3.4.1.3. PCR-Master-Mix	78
2.3.4.1.4. PCR-Programme	78
2.3.4.2. Horizontale Gelelektrophorese	79
2.3.5. Proteinbiochemische Methoden	79
2.3.5.1. Gewebeisolierung für Western Blot Analysen	79
2.3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration über die BCA™ Methode	80
2.3.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)	80
2.3.5.3.1. Herstellung von SDS-Gelen	81
2.3.5.3.2. Probenauftrag und Gelelektrophorese	82
2.3.5.3.3. Gel-Kalibrierung	83
2.3.5.3.4. Immunoblot, Färbung, Nachweis und Bestimmung der Proteine	83
2.3.5.3.5. „Strippen“/Ablösen von Antikörpern	84
2.3.6. Auswertung	84
2.3.6.1. Mikroskopie	84
2.3.6.2. Quantitative Auswertung	84
2.3.6.2.1. Definition der Auswertungsareale	84
2.3.6.2.2. Fehlerkalkulation	85
2.3.6.2.3. Quantifizierung	85
3. Ergebnisse	86
3.1. Generierung CRAF-defizienter Mäuse und quantitative Auswertung der Zuchtergebnisse mit Letalitätsstudie	86
3.2. Phänotypische Analyse CRAF-defizienter Tiere	90
3.2.1. CRAF-defiziente Embryonen	90
3.2.2. Postnatale CRAF-defiziente Mäuse	91
3.2.3. Weitere phänotypischen Merkmale postnataler CRAF-defizienter Tiere	92
3.3. Vergleich von Körper- und Gehirngewicht	93
3.3.2. Gewichtsanalysen unter Standard-Tierhaltungsbedingungen (NC)	93
3.3.3. Gewichtsanalysen unter dem Einfluss einer angereicherten Umgebung (ERV)	97
3.4. Verhaltensbeobachtungen	99
3.5. Histologische und makroskopische Gewebeanalyse CRAF-defizienter postnataler Tiere	102

3.5.1. Kleinhirn	102
3.5.2. Andere Organe	104
3.6. Histologische Analyse embryonaler Entwicklungsstufen	111
3.7. Kann der Phänotyp CRAF-defizienter Tiere durch eine Verpaarung mit SPC CRAF-transgenen Tieren gerettet werden?	113
3.7.1. Phänotypische Analyse SPC CRAF-transgener Tiere	113
3.8. Proteinbiochemischer Nachweis der RAF Kinasen im postnatalen Gehirn	118
3.9. Histologische und morphologische Charakterisierung von Gehirnpräparaten	120
3.9.1. Histologische Analyse durch Nissl und H&E Färbung	121
3.10. Experimentelles Design zur Determinierung des NSC-Pools	125
3.10.1. IHC Auswertung der BrdU-Zellmarkierung zum Zeitpunkt P10	125
3.10.2. IHC Auswertung der BrdU-Zellmarkierung zum Zeitpunkt P30	130
3.10.3. Zellzyklusanalysen der 24h BrdU Applikation	132
3.11. Bestimmung der Körnerzellschichtdicke durch NeuN	134
3.12. Experimentelles Design für die neuronale Determinierung des NPC-Pools	135
3.12.1. IHC Auswertung der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation	136
3.12.1.1. Langzeitstudien mit multipler BrdU Applikation bei Standardlabortierhaltung	136
3.12.1.1.1. Zellzyklusanalyse der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation	137
3.12.1.2. Langzeitstudien mit multipler BrdU Applikation in einer angereicherten Umgebung	138
3.12.1.3. Gegenüberstellung der unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen	139
3.12.2. IHC Auswertung der Langzeitstudie mit einmaliger BrdU Applikation	140
3.12.2.1. 2h BrdU chase-Phase für die NPC Determinierung der Langzeitstudie	141
3.12.2.2. Differenzierungsanalyse der einmaligen BrdU Applikation nach sechs Tagen	142
3.12.2.2.1. Zellzyklusanalyse sechs Tage nach einmaliger BrdU Applikation	143
3.12.2.3. Differenzierungsanalyse zwölf Tage nach einmaligen BrdU Applikation	144
3.12.2.3.1. Zellzyklusanalyse zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation	146
3.12.2.3.2. Zellschicksalsanalyse zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation	147
3.12.2.4. Gegenüberstellung der Zellschicksalsanalysen	150
3.12.3. Zelltodanalyse im DG und Hilus bei jungen adulten Tieren	150
4. Diskussion	153
4.1. Phänotypische Analyse CRAF-defizienter Mäuse	154
4.1.1. Phänotyp-Analyse bei CRAF Mutation aus der Literatur	154
4.1.2. Gegenüberstellung der bisherigen Ergebnisse aus der Literatur zu unseren	156

Phänotyp-Analysen	
4.1.3. Adulte CRAF-defiziente Tiere	159
4.1.4. Weitere Parallelen zu anderen Knockout-Studien	160
4.2. Phänotypische Analyse SPC CRAF transgener Nullmutanten	161
4.3. Verhaltensauffälligkeiten bei postnatalen und adulten Nullmutanten	161
4.4. Histologische Analyse der Körnerzellschicht während der postnatalen gyrus dentatus Entwicklung	163
4.4.1. Immunhistologische Identifizierung der Nissl-Zellkluster	164
4.4.2. Zellzyklusabnormalitäten und Proliferationsveränderungen	164
4.4.3. Kurzzeit-Experimente zeigen Veränderungen in der postnatalen NPC- Nischenverschiebung	165
4.4.4. Langzeit-Experimente bestätigen die fehlerhafte Reorganisation der tertiären Matrix bei CRAF-defizienten Tieren	165
4.4.5. Zellschicksalsdeterminierungen bestätigen Proliferationsunterschiede bei CRAF- defizienten Tieren	166
4.4.6. Zellschicksalsanalysen zeigen eine verlangsamte neuronale Reifung	167
4.4.7. Beeinflusst CRAF den Zellzyklus und damit das Schicksal der proliferierenden NPCs?	168
4.4.8. Parallelen zu anderen Knockoutstudien bzgl. der histologischen Befunde	169
4.5. Ausblick	170
5. Literaturverzeichnis	172
6. Danksagung	200
7. Abkürzungsverzeichnis	202
8. Eigene erworbene Qualifikationen	208
9. Curriculum Vitae	210
10. Erklärung	211

Zusammenfassung

Der *gyrus dentatus* im Hippocampus ist die primäre Zielregion kortikaler Afferenzen des Entorhinalen Cortex. Im Laufe seiner Entwicklung erlangt der *gyrus dentatus* durch die Etablierung einer neurogenen Nische (tertiäre Matrix) die Fähigkeit fortwährender postnataler Neurogenese. Diese wird durch eine Vielzahl von Mediatoren wie Transkriptionsfaktoren gesteuert, die die Proliferation und Zelldifferenzierung, aber auch das Überleben der hippocampalen neuronalen Vorläuferzellen (NPCs, *neural progenitor cells*) kontrollieren. In Säugetieren steuern die homologen RAF Kinasen ARAF, BRAF und CRAF die mitogene Kaskade, die bei der adulten Neurogenese von elementarer Bedeutung ist.

In dieser Studie wurde untersucht ob die Nullmutation von CRAF eine Auswirkung auf die postnatale und adulte hippocampale Neurogenese hat.

Unsere Analysen von BRAF- und CRAF-defizienten Mäusen zeigen in der frühen Embryonalentwicklung gemeinsame Funktionen beider Kinasen, weshalb das Fehlen einer Kinase bis zu bestimmten embryonalen Entwicklungszeitpunkten durch die jeweils andere Kinase kompensiert werden kann. Letalitätsstudien zeigen jedoch, dass BRAF und CRAF bei späteren Entwicklungsstadien jeweils unabhängig für das Überleben von Tieren relevant sind. CRAF Nullmutanten werden nicht nach der erwarteten *Mendelschen Frequenz* geboren und nahezu 70% der Tiere sterben bereits kurz nach der Geburt. Die maximale beobachtete Lebenserwartung adulter CRAFko Tiere lag bei postnatal Tag 55. CRAFko Mäuse haben eine reduzierte Körpergröße, veränderte Hautfarbe und einen *eye-open-at-birth*-Phänotyp. Verhaltensexperimente in unserer Arbeitsgruppe zeigten an heterozygoten CRAF Mäusen einen Einfluss von CRAF auf das Angst - und Lernverhalten, was einen Einfluss von CRAF auf die Neurogenese-vermittelte hippocampale Funktion andeutete. Tatsächlich konnte hier die Expression von CRAF im postnatalen Gehirn von Mäusen immunhistologisch wie auch proteinbiochemisch nachgewiesen werden. Im Hippocampus zeigte sich, dass ein Funktionsverlust von CRAF zu einer erhöhten Anzahl mitotisch aktiver NPCs führt, die massive Zellzyklusveränderungen aufweisen. Zudem wurde eine fehlerhafte Reorganisation der tertiären Matrix beobachtet. NPCs CRAF-defizienter Tiere befinden sich vermehrt im Hilus und bleiben in der Entwicklung zu reifen Körnerzellen im *D Zell*-Vorläuferstadium stecken. Weitere Analysen zeigen, dass diese fehlplatzierten NPCs teilweise über apoptotische Signalwege eliminiert werden. Als Resultat dieser Entwicklungsstörung ist der *gyrus dentatus* CRAF-defizienter Tiere verkleinert und es kann eine verlangsamte neuronale Differenzierung NPC-abgeleiteter Neurone beobachtet werden. Diese Befunde zeigen erstmals einen CRAF-spezifischen Einfluss auf die Regulation elementarer, zellulärer Eigenschaften neuronaler Vorläuferzellen des Hippocampus.

Abstract

The hippocampal *dentate gyrus* is the primary target region of cortical afferents originating in the entorhinal cortex. During its evolutionary development, the *dentate gyrus* has achieved the ability of continuous postnatal neurogenesis by establishing a neurogenic niche (tertiary matrix). This process is regulated by multiple mediators such as transcription factors that control proliferation, cell differentiation and survival of hippocampal neural precursor cells (NPCs). Mammals express three homologous RAF kinases ARAF, BRAF and CRAF which regulate the mitogenic cascade, an essential element of adult neurogenesis.

In this study we analysed if the nullmutation of CRAF interferes with postnatal and adult hippocampal neurogenesis.

Our analysis of BRAF and CRAF-deficient mice reveals common functions of both kinases during early embryogenesis. In this developmental phase, lack of one kinase may be compensated by the other kinase. This phenomenon ends at later embryonic developmental stages. Lethality studies show independent roles of BRAF and CRAF in survival during later developmental stages. CRAF null-mutants are not born in *mendelian frequency* and almost 70% of all CRAF mutants die within a short time window after birth. The oldest analysed CRAFko mice survived until postnatal day P55. CRAFko mice show a decreased body size, altered skin colour and possess an *eye-open-at-birth*-phenotype. Previous behavioural experiments by our group revealed the influence of CRAF in anxiety-like behaviour and specific learning paradigms, indicating an effect of CRAF on neurogenesis-dependent hippocampal functions. Indeed, this study confirmed the expression of CRAF with immunohistological and biochemical methods in postnatal mouse brain tissue. In the hippocampus, the *loss-of-function* mutation of CRAF leads to increased numbers of mitotically activated NPCs which exhibit drastic cell-cycle abnormalities. In addition, CRAF-deficient mice carry malformations in the organisation of their tertiary matrix. NPCs of CRAF-deficient mice are mainly located in the hilus where their maturation towards the neuronal lineage persists in the *D-cell* stage. A detailed analysis shows that these misplaced NPCs are - at least partially - eliminated by apoptosis. Due to this developmental defect the *dentate gyrus* of CRAF-deficient mice is smaller and the neuronal differentiation of NPC-derived neurons is delayed. These results show for the first time a CRAF-specific effect on the regulation of basic cellular functions of neuronal precursors in the hippocampus.

1. Einleitung

1.1. Einführung in die morphologische Entwicklung des Zentralnervensystems

Nach Befruchtung der Eizelle und Durchlaufen der Gastrulation besteht der Embryo aus den drei Keimblättern Entoderm, Mesoderm und Ektoderm. Aus dem Entoderm (syn. Endoderm), dem innersten Keimblatt, entstehen die inneren Organe, aus dem Mesoderm Muskeln, Bindegewebe und Blutgefäße. Das äußerste Keimblatt, das auch als Ektoderm bezeichnet wird, ist für die Bildung von Epidermis und Nervensystem verantwortlich. Ab dem embryonalen Entwicklungszeitpunkt E7.5 beginnt bei der Maus, durch Wechselwirkungen von Mesoderm und Ektoderm, die neuronale Induktion, die zur Bildung des Neuroepithels führt (Gilbert, 1997).

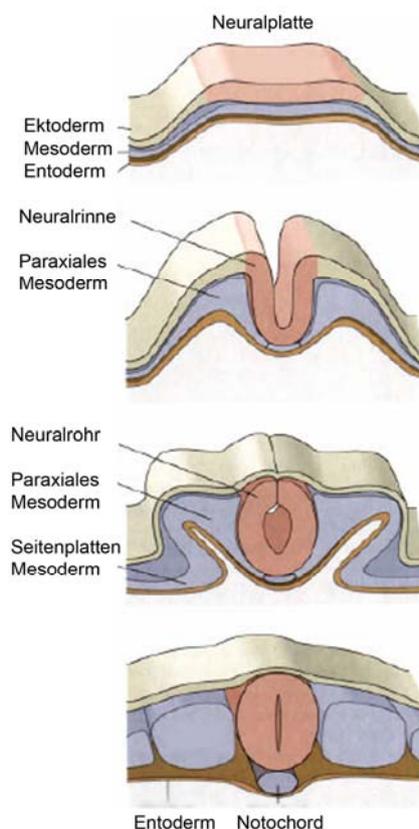


Abb.1.1. Entwicklung des Nervensystems aus dem Ektoderm (verändert nach: Einführung in Bau und Funktion des ZNS, H.-J. Wagner, Anatomisches Institut, Universität Tübingen).

Durch Faltung der Neuralplatte (Abb.1.1.) entstehen aus dem rostralen Teil des tubulären Neuralrohrs die drei Gehirnbläschen (Abb.1.2.), während aus dem kaudalen Abschnitt des Neuralrohrs das Rückenmark gebildet wird. Zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt teilt sich dieses in die drei Wachstumszonen Rhombencephalon (Rautenhirn), Mesencephalon (Mittelhirn) und Prosencephalon (Vorderhirn) auf. Aus dem Prosencephalon entwickeln sich das Telencephalon (Großhirn) mit seinen beiden Hemisphären, dem auch die Hippocampusformation zugeordnet wird, und das Diencephalon (Zwischenhirn). Der innere

Bereich des Telencephalons, der zum Neuralrohr gehört, wird auch als Lateraler Ventrikel (LV) oder Ventrikulärzone (VZ) bezeichnet und ist Ursprungsort der neuralen Vorläuferzellen (NPCs). Aus dem anterioren Teil des Rhombencephalons, dem Metencephalon (Nachhirn) entwickeln sich Pons (Brücke) und Cerebellum (Kleinhirn), während das Myelencephalon (Markhirn) Ursprung für die Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark) ist (Rauber und Kopsch, 1987) (Abb.1.2.).

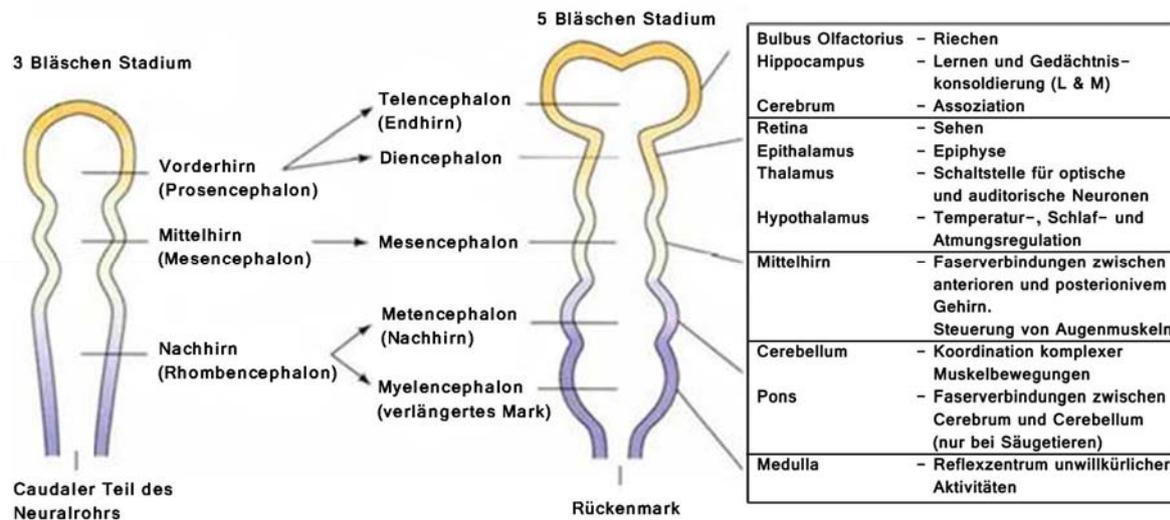


Abb.1.2. Entwicklung der einzelnen Strukturen des ZNS bei Vertebraten. Am rostralen Abschnitt des Neuralrohrs entstehen die drei primären Gehirnbälchen (Vorderhirn, Mittelhirn und Hinterhirn), die sich weiter zu sekundären Vesikeln (Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Myelencephalon) entwickeln, während aus dem kaudalen Abschnitt des Neuralrohrs das Rückenmark gebildet wird. Die Tabelle rechts spiegelt die daraus resultierenden adulten Gehirnregionen und ihre Hauptfunktionen wieder (verändert nach Gilbert et al., 1997, Rauber et al., 1987).

Das embryonale Telencephalon besteht aus einem dorsalen und einem ventralen Teil. Während aus dem ventralen Bereich die Amygdala entsteht, lässt sich das dorsale Telencephalon nach Entstehung des cerebralen Kortex weiter in Archikortex, Neokortex, Paleokortex und limbischen Kortex unterteilen (Abb.1.3.). Bei Säugetieren ist das Cerebellum an der Ausführung komplizierter motorischer Bewegungsabläufe beteiligt.

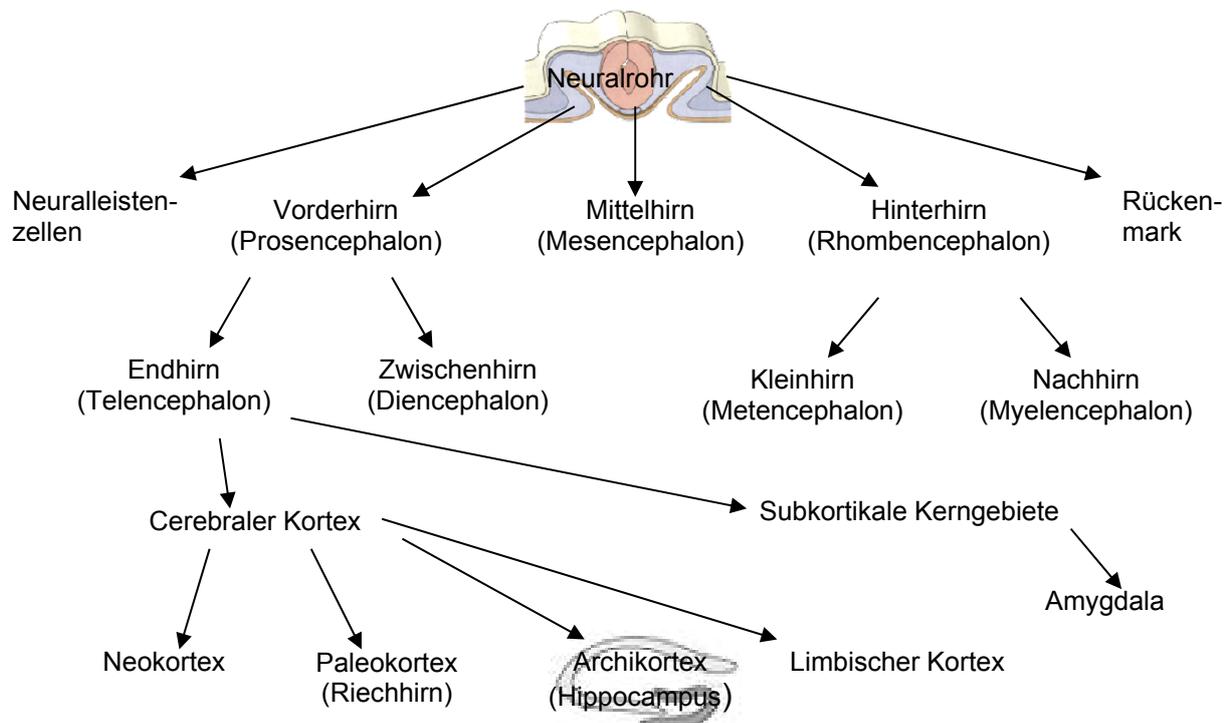


Abb.1.3. Die Kompartimentierung des Gehirns während der Embryonalentwicklung (verändert nach Price und Willshaw, 2000, Einführung in Bau und Funktion des ZNS, H.-J. Wagner, Anatomisches Institut, Universität Tübingen, Seri et al., 2004).

1.2. Adulte Neurogenese im Gehirn

Die Chronologie der wissenschaftlichen Entwicklung

Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts angenommen wurde, dass im ZNS von Säugetieren Neurone ausschließlich während der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung entstehen (Ramon y Cajal, 1913, His, 1904), ließen Studien Anfang der 60er Jahre, durch die Einführung neuer technischer Methoden zur Darstellung sich teilender Zellen, Zweifel an der Theorie der fehlenden Regenerationsfähigkeit des adulten Gehirns entstehen (Altman und Das, 1965). Die Möglichkeit der Differenzierung zwischen „alten“, also bereits während der Embryogenese entstandenen, und „neuen“, d.h. im adulten System hinzukommenden Nervenzellen, gelang erstmals durch Joseph Altman bei Ratten mit Hilfe der [³H]-Thymidin-Auto-radiographie (Altman und Das, 1965, Kaplan, 1977). Durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA sich teilender Zellen konnte sowohl der Ort wie auch der Zeitpunkt der adulten Neurogenese bestimmt werden. Doch erst mit der Einführung der Elektronenmikroskopie konnten Kaplan et al. (1977) dem von Altman postulierten Konzept der adulten Neurogenese im Gehirn neue Beachtung zukommen lassen. *In vitro* Kulturen von caudalen Endbereichen der SVZ (Subventrikuläre Zone) (Palmer et al., 1995), des Striatums (Palmer et al., 1995), des Kortex (Palmer et al., 1999), des optischen Nervs, sowie des Septums, Corpus Callosums, Spinalrohrs, der Retina und des Hypothalamus (Palmer et al., 1995, 1999, Weiss et al., 1996a, Shihabuddin et al., 1997, Tropepe et al., 2000, Lie et al., 2002) konnten zeigen, dass neurale Vorläuferzellen

zumindest limitierte Selbsterneuerungspotentiale besitzen und zu differenzierten neuronalen Zelltypen wie Astroglia, Oligodendroglia und Neuronen ausdifferenzieren können (Guillemont, 2007). Das Interesse an der Neuentstehung von Nervenzellen im adulten Gehirn fand nicht nur große Aufmerksamkeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie, sondern wurde auch auf dem Gebiet der Verhaltensforschung weiterverfolgt. So gelang es Nottebohm et al. in seinen Untersuchungen an Kanarienvögeln einen Zusammenhang zwischen der Neubildung von Neuronen im dorsomedialen Striatum erwachsener Tiere und dem Erlernen neuer Lieder nachzuweisen (Goldmann und Nottebohm, 1983). Durch die Einführung des synthetisierten Thymidinanalogons BrdU (5-Bromo-3'-Deoxyuridin) in den 90er Jahren, das ähnlich dem [³H]-Thymidin während der S-Phase der Mitose von der Zell-DNA aufgenommen wird, konnte die Autoradiographie durch diese neue Methode der Zellmarkierung ersetzt werden. Die BrdU-markierten Zellen konnten durch immunhistochemische Färbetechniken visualisiert werden und Gage et al. waren die Ersten, die diese Methode in der konfokalen Mikroskopie benutzten, um die adulte Neurogenese bei Nagetieren genauer zu untersuchen (Kuhn et al., 1996, Kempermann et al., 1997).

Derzeitiger Wissensstand

Auf dem Gebiet der Molekularbiologie konnte durch *in vitro* Analysen neuraler Vorläuferzellkulturen gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren wie der epidermale Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“ EGF) und der Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 („fibroblast-growth factor 2“ FGF-2) notwendig sind, um diese Zellen in ihrem mitotischen undifferenzierten Zustand zu erhalten (Reynolds und Weiss, 1992, Palmer et al., 1995, Craig et al., 1996, Zheng et al., 2004). Aber auch *in vivo* bestätigte sich die mitogene Effizienz der beiden Wachstumsfaktoren an Vorläuferzellen (Craig et al., 1996, Kuhn et al., 1997). Nakatomi et al. (2002) nutzten dieses Wissen und zeigten an einem „CA1 Ischämie“ Rattenmodell, dass auch in nicht adult-neurogenen Regionen des Hippocampus durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren die Möglichkeit gegeben ist, verstärkt Neurogenese zu induzieren. Nach dem derzeitigen Wissensstand über die bereits von Altman et al. (1965) postulierten Regionen adulter Neurogenese übernehmen die neu gebildeten Nervenzellen der SVZ des Seitenventrikels und die *gyrus dentatus* (DG) Neurone des Hippocampus zwei völlig verschiedene Aufgaben. Während im adulten olfaktorischen System die Neurogenese als Austausch von Neuronen fungiert, werden im adulten DG neue Neurone in das bestehende System addiert (Imayoshi et al., 2008, Frankland und Miller, 2008 Fig.1). Weiterhin ist bekannt, dass verschiedene Faktoren wie Alter, Bewegung und Stress die Neurogenese beeinflussen.

1.2.1. Regulatoren adulter Neurogenese

Die Neubildung von Nervenzellen im hippocampalen DG ist keinesfalls statisch, sondern unterliegt der Regulation durch physiologische und pathologische Einflüsse. Zu den physiologischen Regulationsmechanismen zählen Alter, Stress, Umwelt- und Umgebungsreize, sowie körperliche Aktivität. Neue Nervenzellen werden zwar zeitlebens gebildet, doch nimmt die Anzahl mit zunehmendem Alter ab (Kuhn et al., 1996, Klempin und Kempermann, 2007, Mirescu und Gould, 2006, Molofsky et al., 2006). Dabei korreliert der altersabhängige Rückgang der Neurogenese teilweise mit dem Anstieg des Corticosteroidspiegels. So konnte bei alten Ratten, denen die Nebenniere entfernt worden war, eine Neurogeneserate beobachtet werden, die der von Jungtieren entsprach (Cameron et al., 1999). Stress hingegen verringert die Anzahl neugebildeter Nervenzellen bei Nagetieren und Primaten (Gould et al., 1998, 1999, Minuer et al., 2007, Mirescu und Gould, 2006, Ohl et al., 1999, Tanapat et al., 1998). Dabei konnten Gould et al. (1992) als Erste eine Unterdrückung der subgranulären Zellteilung nach Corticosteroid-Applikation nachweisen. Dieses Steroidhormon wurde vor allem in gestressten Tieren, aber auch in depressiven humanen Patienten in einer erhöhten Konzentration gefunden (Gould et al., 1992). Nachdem sowohl akuter als auch chronischer Stress zu einem Anstieg des Glucocorticoidspiegels führen, ist anzunehmen, dass ein erhöhter Corticosteroidlevel sowohl im Alter wie auch bei Stress die Neurogenese erniedrigt. Welchen Einfluss die Umgebung auf die Neuentstehung von Nervenzellen hat, konnte bereits durch Nottebohm et al. gezeigt werden. Anhand seiner Untersuchungen konnte die saisonale Veränderung der Neurogeneserate bei Kanarienvögeln visualisiert werden (Nottebohm, 1989, 2002a, Nottebohm et al., 1990, Scharff et al., 2000). Eine reizreiche Umgebung ermöglicht nicht nur motorische Lernerfahrungen, sondern steigert zusätzlich die Neurogeneserate bei adulten Tieren (Barnea et al., 1994, Kempermann et al., 1997, 1998, 2002, Nilsson et al., 1999, van Praag et al., 1999). Weiterhin führt körperliche Aktivität zu einer Steigerung der Neurogeneserate (van Praag und Christie et al., 1999, van Praag et al., 1999), die abhängig vom genetischen Hintergrund einer natürlichen Variation unterliegt (Kempermann et al., 2006). Dabei nimmt der genetische Hintergrund vor allem Einfluss auf die Zellproliferation, die Differenzierung und das Zellüberleben (Kempermann und Gage, 2002, Smith et al., 2007). Die adulte Neurogenese unterliegt aber auch pathologischen Regulationsmechanismen, zu denen epileptische Anfälle (Parent et al., 1997, 2002a, b, c, Jessberger et al., 2007), globale und fokale cerebrale *Ischämien* ebenso wie mechanische Verletzungen des Gehirns (Jin et al., 2001, Zhang et al., 2001) gehören. Auch unter diesen Einflüssen kommt es zu einer vermehrten Neubildung von Nervenzellen (Parent et al., 2002a).

1.2.1.1. Fehlsteuerung der Neurogenese durch physiologische und patho-physiologische Mechanismen

Durch pathologische Veränderungen im Gehirn, wie es beispielsweise bei *Epilepsie* der Fall ist, kann die adulte Neurogeneserate signifikant erhöht werden (Laplagne et al., 2006). Bei einem epileptischen Anfall wird die Proliferationsrate der SVZ und der SGZ (Subgranuläre Zone) erhöht (Jessberger und Parent, 2007, Parent et al., 2002c). Dabei kann die SGZ-Neurogeneserate bis zu fünf Wochen nach einem Anfall erhöht bleiben, danach jedoch wieder rapide abfallen. Während die Zellteilung der Neuroblasten angeregt wird, zeigen neugeborene Neurone eine spezifische Morphologie (Jessberger et al., 2007). Dennoch gelingt diesen neugebildeten Neuronen die funktionelle Integration in das neuronale Netzwerk. Auch beim Schlaganfall kommt es zu einer Neurogeneseinduktion in den neurogenen Zonen (Parent et al., 2002d), wobei SVZ-Vorläuferzellen nach einer *Ischämie*, gelenkt von Blutgefäßen, bis zur verletzten Stelle wandern (Review Zhao et al., 2008). Man nimmt an, dass diese Rekrutierung von NSCs (Neuronale Stammzellen) auch bei humanen Infarktpatienten erfolgt. Neurodegenerative Erkrankungen wie *Alzheimer*, *Parkinson* oder *Chorea Huntington* haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Neurogenese. Die Autopsie von *Alzheimer* Patienten zeigt eine erhöhte Proliferationsrate in der SGZ, während bei *Chorea Huntington* Patienten eine vermehrte Proliferation in der SVZ beobachtet wurde. *Parkinson* Patienten zeigen in beiden neurogenen Zonen eine Proliferationsabnahme (Zhao et al., 2008). Neben den therapeutischen Möglichkeiten bei Fehlsteuerungen im ZNS bieten NSCs auch die Chance, mehr über die Entstehung von Hirntumoren zu lernen, da Hirntumorzellen viele Gemeinsamkeiten mit NSCs haben (Oliver und Wechsler-Reya, 2004).

1.2.2. Neuronale Stammzellen

Definition der neuronalen Stammzelle

Die Grundlage für die Entstehung von Nervengewebe im embryonalen und adulten Gehirn sind multipotente Stammzellen. Diese wiederum entstehen aus einer übergeordneten Population, den pluripotenten Stammzellen. Verfolgt man diesen Stammbaum weiter nach oben, so bildet die Zygote als totipotente Stammzelle den Ursprung des entstehenden Organismus. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, das bedeutet, dass sie die Fähigkeit besitzen, jede Zelle eines Organismus bilden zu können. Sie sind allerdings nicht mehr in der Lage, den Trophoblasten der Plazenta zu generieren, was sie von totipotenten Zellen unterscheiden lässt. Neurale Stammzellen des ZNS sind wie die meisten Stammzellen eines Organismus multipotent, d. h. sie können in alle neuroektodermalen Linien des ZNS, auch in die verschiedenen neuronalen und glialen Subtypen differenzieren (Gage et al., 1995b, Weiss et al., 1996b, McKay, 1997, Gage 2000). Weitere Haupteigenschaft dieses Zelltyps ist die Selbsterneuerbarkeit mit der theoretisch unlimitierten Möglichkeit durch symmetrische

Zellteilung Nachkommen zu produzieren, die nicht-unterscheidbar zu ihresgleichen sind. Aber auch durch asymmetrische Zellteilung wird die Stammzellpopulation aufrechterhalten. Linien-spezifische Vorläuferzellen sind dagegen für eine bestimmte Differenzierungslinie bestimmt, und können entweder zu Neuronen, Astroglia-, Glia- oder Oligodendroglia-Zellen werden. Ob adulte NSCs jedoch zu demselben Zelltyp gehören wie die Zellen, aus denen während der embryonalen Entwicklung ein ganzes Nervensystem gebildet wird, ist noch nicht geklärt. Adulte Stammzellen sind multipotent und den pluripotenten embryonalen Stammzellen schon hinsichtlich ihres Differenzierungs- und Proliferationspotentials unterlegen. Adulte Neurogenese beinhaltet den vollständigen Ablauf der Ereignisse, die auch während der neuronalen Entwicklung durchlaufen werden. Beginnend mit der Zellteilung der Vorläuferzellen und endend bei der Entstehung überlebensfähiger reifer Neurone, die funktional in das bestehende neuronale Netzwerk integrieren, ist Neurogenese keinesfalls eine lapidare Definition von „proliferierenden Vorläuferzellen“. Denn ohne ihre detaillierte molekulare Charakterisierung wären die zellulären Reparatureigenschaften im ZNS, die diese Zellen besitzen, kaum von medizinischem Nutzen.

1.2.3. Adulte Neurogenese bei Nicht-Säugetier- und Säugetiervertebraten

Adulte Neurogenese findet man nicht nur in Säugetieren, sondern auch bei einigen Nicht-Säugetier Vertebraten. Eidechsen beispielsweise haben ähnlich dem DG der Säuger den *medialen cerebellären Kortex*, einen Bereich postnataler Neurogenese, der Regeneration nach Verletzung ermöglicht (Lopez-Garcia et al., 1992). Molche können ganze Körperteile wie Schwanz, Bein, Kiefer und Augengewebe regenerieren und neuronal verschalten (Brockes, 1997). Bei Goldfischen findet zeitlebens eine retinale Neurogenese statt (Johns und Easter, 1977). Operativ entfernte Retinabereiche können so auch im adulten Entwicklungsstadium vollständig regeneriert werden (Hitchcock et al., 1992). Auch wenn einige Nicht-Säugetiere wirklich beeindruckende Regenerationen neuronaler Gewebe durchzuführen vermögen, ist es nicht eindeutig geklärt, welche Relevanz dieses Phänomen bei Säugern hat. Möglicherweise sind selektive evolutionäre Prozesse Grundlage dafür, dass die Gliedmaßenregeneration bei Säugern verloren ging (Götz et al., 2002, Rakic, 2002). Auch Vögel, deren Gehirne ähnlich komplex denen der Säugetiergehirne sind, haben Regionen postnataler Neurogenese (Nottebohm et al., 1990, Goldman, 1998, Nottebohm, 2002a und b). Gerade bei Singvögeln werden, saisonal bedingt, fortlaufend neue Neurone in das *high vocal center* (HVC) eingebaut (Goldman und Nottebohm, 1983, Nottebohm, 1985, Kirn et al., 1991, Alvarez-Buylla et al., 1998), ein Gehirnbereich, der mitunter für das Lernen des Gesangs notwendig ist (Nottebohm und Arnold, 1976, Simpson und Vicario, 1990).

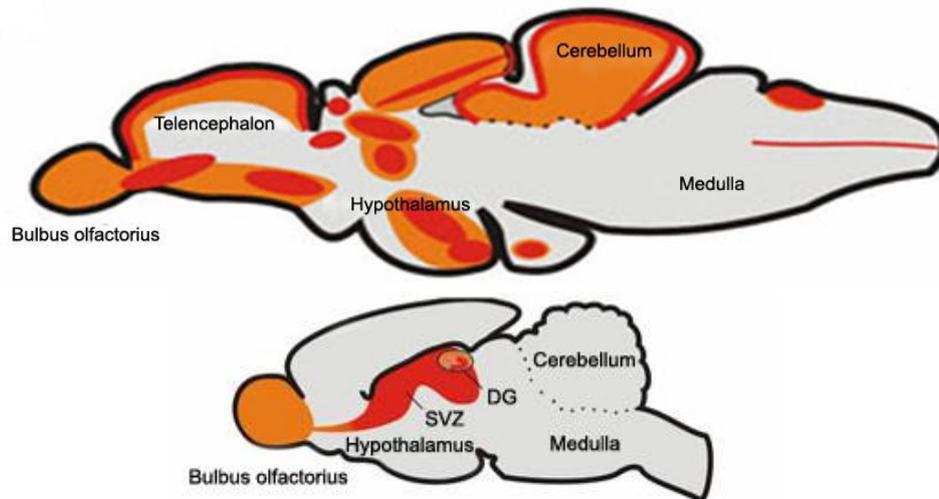


Abb.1.4. Orte adulter Neurogenese. Vergleich von Säugetieren und Nicht-Säugetier Vertebraten. Zebrafischgehirn (oben), Nagetiergehirn (unten). Proliferationszonen sind rot, neurogene Zonen orange markiert (verändert nach: <http://www.sfb655.de/projekte/a3/2009>).

Neurologische Literaturstudien belegen, dass im adulten ZNS NPCs und Stammzellen vorkommen, die in der Lage sind, neue Neurone, Astrocyten und Oligodendrocyten zu bilden. Die Analyse mehrerer Studien belegt, dass im Hippocampus der Ratte täglich mindestens mehrere hundert Zellen produziert werden (Bayer, 1982, Seri et al., 2004). Durch den Proliferationsmarker BrdU markiert, können diese in den folgenden Wochen weiter beobachtet werden. Etwa die Hälfte der neugebildeten Zellen wandert nach ihrer Entstehung an der Grenzschicht zwischen Hilus und GCL (Granule Cell Layer) in die Körnerzellschicht des DG ein. Hier erfolgt auch ihre neuronale Differenzierung. Weitere 15% der neugebildeten Zellen werden zu Gliazellen. Bei den verbleibenden 35% der Zellen konnte keine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp erfolgen (Gage et al., 1998). NPCs proliferieren in „Klustern“ (Palmer et al., 2000). Im Proliferations-stärkeren olfaktorischen System ist die Proliferation hauptsächlich in der Subependymalschicht des Seitenventrikels lokalisiert, das ein Residuum der Wand des Neuralrohrs darstellt. Die Migration der neugebildeten Zellen erfolgt über den RMS (Rostral Migratory Stream) in einer Astrozytenscheide in den *bulbus olfactorius* (OB), wobei undifferenzierte NPCs sich mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen (z.B. PSA-NCAM) bewegen (Rousselot et al., 1995, Lim et al., 1999, Lledo und Saghatelian, 2005, Lois et al., 1996, Doetsch et al., 1997). Die zu bewältigende Distanz dieser Migrationsbewegung beträgt dabei mehrere Millimeter bis Zentimeter (Kaneko et al., 2010), wofür die Zellen Spezies-spezifisch zwischen sieben und 14 Tage benötigen. Die Differenzierung erfolgt im OB, wobei im olfaktorischen System nahezu 96% der neugebildeten Zellen ihr granuläres neuronales Zellschicksal erreichen (Kuhn et al., 1997). Kaneko et al. (2010) konnten zeigen, dass migrierende SVZ-Neurone aktiv an der Bildung ihrer Migrationsroute über die Sekretion des Slit1 Proteins beteiligt sind.

Der Slit1 Rezeptor Robo wird von Astrozyten exprimiert und über den Slit-Robo Signalweg konnten Zusammenhänge mit der Bildung der „Astrocyten Tunnel“ festgestellt werden, die für eine schnelle und direkte Migration im adulten Gehirn benötigt werden (Kaneko et al., 2010).

1.3. Der Hippocampus: Lage, Aufbau, Verschaltung und Funktion

Lage und Aufbau

Als zentrale Schaltstelle des limbischen Systems, dem auch die Amygdala angehört, befindet sich der Hippocampus im medialen Teil des Großhirns (Telencephalon) und bildet den Archikortex (Abb.1.3.). Der Hippocampus besteht strukturell aus mehreren Regionen, die auch als Hippocampus-Formation bezeichnet werden. Zu ihr gehören DG, hippocampus proper (bestehend aus den Teilregionen CA1 & CA3, Cornu ammonis, Ammonshorn), Subiculum, Präsubiculum, Parasubiculum und enthorinaler Kortex, wobei der DG die eigentliche Signaleingangsstelle definiert (Caviness, 1973, Stanfield und Cowan, 1979, Stanfield et al., 1979, Altman und Bayer, 1990a und b, Swanson, 1983). Während die Hippocampus-Formation bei der Maus schon frühzeitig ab dem embryonalen Entwicklungszeitpunkt E10-E18 entsteht (bei der Ratte zwischen E16 und E21) (siehe Abb.1.7.), bildet sich der DG erst später (Bayer, 1980b, Rajnicek et al., 1997, Reznikov, 1991). Die Körnerzellschicht-Formation („GCL“) wird ab dem embryonalen Entwicklungszeitpunkt E19 bis in die frühe postnatale Entwicklung hinein gebildet (Piatti et al., 2006). Ab dem postnatalen Entwicklungszeitpunkt P20 ist der proliferative Bereich des DG auf die SGZ lokalisiert (Piatti et al., 2006). Der DG ist histologisch betrachtet dreischichtig aufgebaut. Er besteht aus dem relativ zellarmen *Stratum moleculare* (Molekularschicht, ML), dem von Körnerzellen dicht besiedelten *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht, GCL) und dem polymorph strukturierten Hilus, der einen hohen Anteil an Mooszellen und verschiedenen Interneuronentypen aufweist (Abb.1.5.). Die Molekularschicht kann weiter in eine äußere- (OML) und eine innere Molekularschicht (IML) unterteilt werden. Zytoarchitektonisch ist der Hippocampus relativ einfach strukturiert. Zwei C-förmige Strukturen, die zum einen durch das Körnerzellband des DG und zum anderen durch das Pyramidenzellband des *Stratum pyramidale* gebildet werden, sind sein charakteristisches Merkmal. Die Dendriten der beiden Hauptzelltypen des Hippocampus liegen in den jeweils angrenzenden zellärmeren Schichten. Apikale Pyramidenzellendriten bilden das *Stratum radiatum* und das *Stratum lacunosum-moleculare*, während basale Pyramidenzellendriten das *Stratum oriens* auskleiden. Die Körnerzellendriten bilden das *Stratum moleculare* des DG. In der IML liegen die proximalen Körnerzellendriten, in der OML die distalen Dendriten (Amaral und Witter, 1989, 1985). Der Hippocampus ist über extrinsische Verbindungen mit anderen Gehirnregionen und über intrinsische Verbindungen

innerhalb seiner eigenen Formation synaptisch verbunden. Innerhalb der Hippocampus-Formation verlaufen die Projektionen unidirektional (Amaral und Witter, 1989).

Verschaltung

Hauptafferenz in den Hippocampus sind die Axone der Neurone des enthorinalen Kortex (EC), die den *Tractus perforans* bilden (Abb.1.5.) (Aubert et al., 1994). Die kortikalen glutamatergen Afferenzen aus dem EC projizieren über diesen, durch das Subiculum, in die OML des DG auf die distalen erregenden Körnerzellendriten. Es gibt aber außerdem noch GABAerge Neurone, deren Projektionen in diesem Afferenzgebiet verlaufen. Die proximalen Körnerzellendriten der IML werden hingegen durch glutamaterge Signale aus dem Hilus und dem kontra- bzw. ipsilateralen Hippocampus angeregt (Blackstad 1956, 1958, Swanson et al., 1981). Hierdurch ergibt sich ein schichtenspezifisches Innervationsmuster innerhalb der Molekularschicht des DG. Der *Tractus perforans* ist aber nicht nur die wichtigste kortikale Afferenz des DG über die Körnerzellendriten, sondern trägt auch zur Innervation des *Hippocampus proper* im *Stratum lacunosum* sowie des Subiculum bei (Geddes et al., 1985). Innerhalb der Körnerzellschicht befindet sich der Hilus. In ihm verlaufen die unmyelinisierten Axone der Körnerzellen aus dem DG kommend als sogenannte „Moosfasern“ (Abb.1.5.).

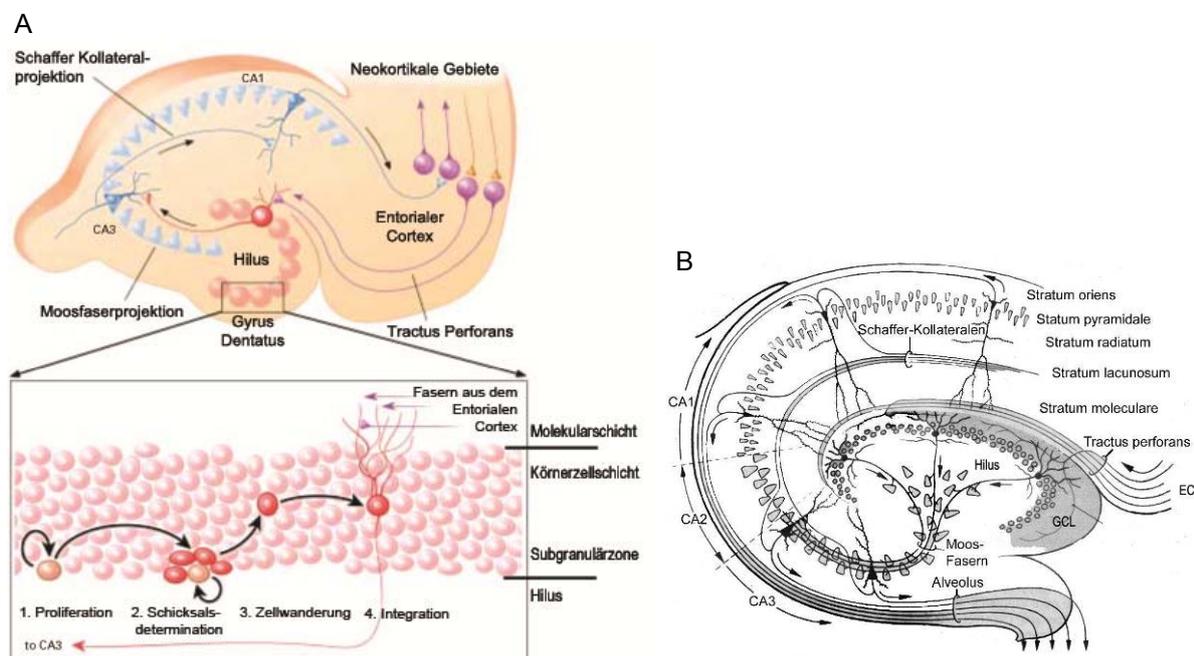


Abb.1.5. (A) Schematischer Aufbau des DG. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Lokalisierung der proliferierenden Vorläuferzellen in der tertiären Matrix ab dem postnatalen Entwicklungszeitpunkt P10. Während ihrer Reifung durchwandern die unreifen Vorläuferzellen die Körnerzellschicht um in das bestehende neuronale Netzwerk zu integrieren. (Verändert nach Lie et al., 2004, Kempermann et al., 2002, Seri et al., 2004, Zhao et al., 2008). (B) Schematische Darstellung des hippocampalen Verschaltungsprinzips innerhalb der Hippocampus-Formation (verändert nach Thieme Taschenatlas der Anatomie, Nicoll und Schmitz, 2005).

Sie projizieren hauptsächlich auf die ebenfalls erregenden glutamatergen apikalen Pyramidenzellendriten der CA3 Region des Hippocampus. Doch bevor jede Moosfaser die CA3 Region erreicht, bildet sie im Hilus mehrere dünnere Kollaterale aus (Claiborne et al., 1986). Moosfasern bilden im Hilus auch synaptische Kontakte mit Mooszellen, Korbzellen und anderen Zellen (Seroogy et al., 1983). Sobald die Moosfasern den Hilus verlassen, erstreckt sich ein Großteil als suprapyramidales Bündel in das *Stratum lucidum* der CA3 Region (Claiborne et al., 1986), während sich eine kleinere Anzahl von Axonen in der Nähe des DG als infrapyramidales Bündel innerhalb der Pyramidenzellschicht und im *Stratum oriens* befindet (Tashiro et al., 2007 Fig.2b). Suprapyramidale Moosfasern sind mit den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in der CA3 Region synaptisch verschaltet. Infrapyramidale Moosfasern bilden hingegen hauptsächlich mit den basalen Dendriten synaptische Kontakte aus (Blackstad et al., 1970). Dabei kann eine Moosfaser mit bis zu 37 Synapsen mit einer einzelnen CA3 Pyramidenzelle in Kontakt stehen (Chicurel und Harris, 1992). Jedoch bildet eine Moosfaser in ihrem Verlauf nur Kontakte zu 11-18 Pyramidenzellen. Die Pyramidenzelle erhält ihrerseits Informationen von bis zu 50 Körnerzellen (Claiborne et al., 1986). Der Moosfasertrakt bildet zusammen mit der Verschaltung von DG Körnerzellen und CA3 Pyramidenzellen eine „trisynaptische Bahn“ (Andersen et al., 1971). Die Pyramidenzellen der CA3 und CA1 Region sind dabei über die glutamaterge „Schaffer-Kollateralprojektion“, die den CA2 Sektor durchqueren, miteinander verbunden (Abb.1.5). Die CA1 Pyramidenzellaxone verlassen dann den Hippocampus entweder direkt durch den Alveus und die Fimbria, oder aber über Kollateralprojektionen mit den Pyramidenzellen im Subiculum zusammen mit den CA1 und CA3 Axonen über die Fimbria zum EC, und schließen so den Schaltkreis. Durch diese Verschaltung ergibt sich aus dem überwiegend unidirektional intrinsisch verlaufenden Erregungsausbreitungs-Prinzip im Hippocampus ein trisynaptisches Bahnkonzept, das folgendermaßen konzipiert ist: Über glutamaterge Afferenzen aus dem EC werden die DG Körnerzellen aktiviert, die über Moosfasern die CA3 Pyramidenzellen aktivieren und dann schließlich über Schaffer-Kollateralen die CA1 Pyramidenzellen erregen (Amaral und Witter, 1989, 1995, Frotscher 1988).

Funktion

Der EC sendet aber auch Axone in die CA1-Region, und die CA1-Pyramidenzellen wiederum in das Subikulum. Das Subikulum ist der Übergangsbereich zwischen CA1 und enthorinalem Kortex. Dadurch dass die CA1 Pyramidenzellen ihre Informationen zurück zum Subiculum und zum EC senden, schließt sich der Schaltkreis. Auf diesem Weg gelangen Informationen aus einem bestimmten Rindengebiet zum EC, durchqueren dabei die Hippocampusformation und gelangen schließlich wieder in ihr Rindengebiet zurück. Bei der

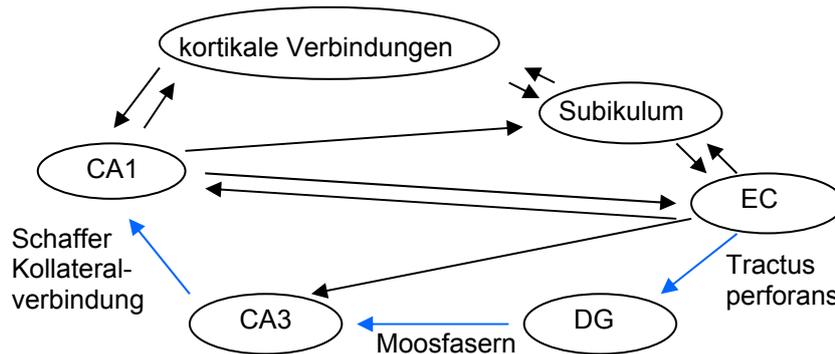


Abb.1.6. Schematische Darstellung der Verschaltung im Hippocampus und mit den kortikalen Gebieten. Die blauen Pfeile markieren den trisynaptischen Schaltkreis (verändert nach Amaral und Witter 1995).

Durchquerung finden jedoch Veränderungen statt, die eine Informationsspeicherung im Langzeitgedächtnis ermöglichen. Auch wenn noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wie diese Information beim Durchqueren des Hippocampus verändert wird, konnten aktivitätsabhängige plastische Veränderungen am *Tractus perforans* beobachtet werden, die heutzutage als Langzeitpotenzierung bezeichnet werden (Bliss und Lomo, 1973). Da spezielle Glutamat-Rezeptoren (NMDA), die bei der Langzeitpotenzierung involviert sind, im Bereich der Schaffer-Kollateralen liegen, ist diese Region, die sich zwischen CA1 und CA3 des Hippocampus befindet, besonders bei der molekularen Erforschung von Lernprozessen von großem Interesse. Besonders bei Säugetieren konnte dem Hippocampus eine entscheidende Rolle beim Lernen und der *deklarativen Gedächtnisbildung* zugeordnet werden (Kaltschmidt et al., 2006, Jessberger et al., 2009). Das wohl bedeutendste Beispiel für die Involvierung des Hippocampus bei der Speicherung von Informationen in das Langzeitgedächtnis lieferten Scoville und Milner (1957) durch den *Epilepsie* Patienten H. M.. Um ihn von seiner schweren Krankheit zu therapieren, wurden ihm neurochirurgisch beide medialen Strukturen des Temporallappens entfernt. Doch nach diesem operativen Eingriff litt der Patient H. M. an einer schweren *anterograden Amnesie* und konnte sich nicht mehr an Geschehnisse erinnern, die nach seiner Operation passierten. Sein Erinnerungsvermögen an Ereignisse die vor dem Eingriff lagen, blieb hingegen unbeeinträchtigt. Zu der Gedächtniskonsolidierung, also der Überführung von Informationen aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis kommt dem Hippocampus im Tierreich noch die Aufgabe der räumlichen Orientierung hinzu. Durch die Einführung neuer technischer Methoden zur Visualisierung sich teilender Zellen konnten alte Neurone, die bereits während der Embryogenese entstanden sind, von neugebildeten Nervenzellen unterschieden werden. Im Hippocampus von Säugetieren, der zu den evolutionär ältesten Strukturen des Gehirns zählt, werden täglich tausende neuer granulärer Neurone geboren (Lledo et al., 2006, Seri et al., 2004). Ein quantitativ höheres Proliferationspotential befindet sich jedoch im

olfaktorischen System (SVZ/RMS/BO) von Nagetieren, in dem täglich über 30.000 Neuroblasten die SVZ verlassen um in den RMS einzuwandern (Lledo et al., 2006). Darüber hinaus hat der Hippocampus eine wichtige neuropathologische Bedeutung bei der Entstehung verschiedener Krankheiten, die mit strukturellen Veränderungen des Hippocampus konsolidieren. Beispiele hierfür wären *Epilepsie* (Houser, 1990, Tauck und Nadler, 1985) oder Demenzerkrankungen (Geddes et al., 1986, Represa et al., 1988). Durch ein verbessertes Verständnis der molekularen Kontrolle der Hippocampusentwicklung wären weitere Erkenntnisse über die Physiologie sowie die Entstehung krankhafter Veränderungen möglich. Neuere Studien konnten zeigen, dass ein spezifischer Neurogeneseblock, hervorgerufen durch die Inhibition des *Wnt* Signalwegs (Jessberger et al., 2009), zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernens bei Ratten (Wasserlabyrinthversuch) (Jessberger et al., 2009) und Mäusen (Barnes-Labyrinth) führt (Imayoshi et al., 2008). Zusätzlich konnte ein verändertes Angst-Verhalten (Lernen) beobachtet werden (Imayoshi et al., 2008). Im Gegensatz dazu führt ein Neurogeneseblock im olfaktorischen System bei anschließend durchgeführten Riechtests kaum zu olfaktorisch-bedingten Verhaltensänderungen (Imayoshi et al., 2008).

Hippocampusentwicklung bei der Maus

Bei der Maus entsteht der Hippocampus ab dem embryonalen Entwicklungszeitpunkt E14.5 (Bagri et al., 2002) (E18-E22 bei der Ratte, Altman und Bayer 1990b). Die ersten Körnerzellen die den DG besiedeln, haben ihren Ursprung im medialen Pallidum der neuroepithelialen SVZ (primäres Neuroepithel) (Altman und Bayer, 1990b). Das primäre Neuroepithelium des DG stellt dabei eine Subdomäne des kortikalen Neuroepithels dar und hat einen eigenen Bauplan. Nach der Nomenklatur von Altman und Bayer (1990b) wird diese Ansammlung von proliferierenden Zellen als *sekundäre Matrix* bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich in der Anlage des DG neben unreifen Interneuronen auch Cajal-Retzius- und radiale Gliazellen (Pleasure et al., 2000). Das Fasergerüst der radialen Gliazellen (RG) stellt dabei eine C-förmige Struktur ähnlich einem Hufeisen dar (Alcantara et al., 1998, Del Rio et al., 1997, Rickmann et al., 1987). Durch die Ausdehnung der RGs von der SVZ des Neuroepithels in Richtung Pia, schreitet die DG Entwicklung voran. Die radialen Gliafasern dienen den migrierenden mitotischen Vorläuferzellen und postmitotischen unreifen Neuronen dabei als Wegweiser, um sich im dorsalen (suprasympyramidalen) Blatt des DG zu positionieren und schließlich zu reifen Körnerzellen zu differenzieren (1. Migrationswelle) (Altman und Bayer, 1990a und b, Pleasure et al., 2000, Yuasa et al., 2002, Rakic et al., 1972). Postnatal platzieren sich einwandernde NPCs verstärkt auch innerhalb der späteren Hilusregion des DG (2. Migrationswelle). Im Gegensatz zu pränatal eingewanderten Zellen der 1. Migrationswelle behalten die Zellen der

2. Migrationswelle ihre Fähigkeit neue NPCs zu bilden, wenn sie den DG erreicht haben. Diese neue, zusätzlich gebildete neurogene Nische im Hilus des DG wird nach Altman und Bayer als *tertiäre Matrix* bezeichnet (Altman und Bayer 1990b). Über 80% der Körnerzellen werden im adulten DG aus dieser *tertiären Matrix* in den ersten vier Lebenswochen (postnatal) gebildet. Durch die Entstehung einer eigenen *RG Matrix* mit radial orientierten Fasern wandern die neugeborenen Zellen nun an diesen, aus dem Hilus kommend, entlang in die sich ausbildende Körnerzellschicht ein, um hier zu reifen Körnerzellen auszudifferenzieren. Um den postnatalen Entwicklungszeitpunkt P10 kommt es dann zu einer Reorganisation der *tertiären Matrix* wie auch der RG Zellen. Die Position der proliferierenden Vorläuferzellen verschiebt sich dabei aus dem Hilus in die sich bildende SGZ, die sich an der Grenze zwischen innerer Körnerzellschicht und Hilus befindet (Abb.1.5). Ab der zweiten Hälfte des ersten Lebensmonats bis in die späte adulte Entwicklungsphase hinein ist die SGZ nun der Ort postnataler Neuroneogenese im DG (Altman und Das, 1965, Altman und Bayer, 1990a und b). In der SGZ werden nun kontinuierlich bis in die adulte Phase hinein, jedoch in abnehmender Anzahl, neue Nervenzellen geboren. Sie durchwandern die kurze Distanz zur Körnerzellschicht um sich schließlich in das neuronale Netzwerk funktionell zu integrieren (Li und Pleasure, 2004).

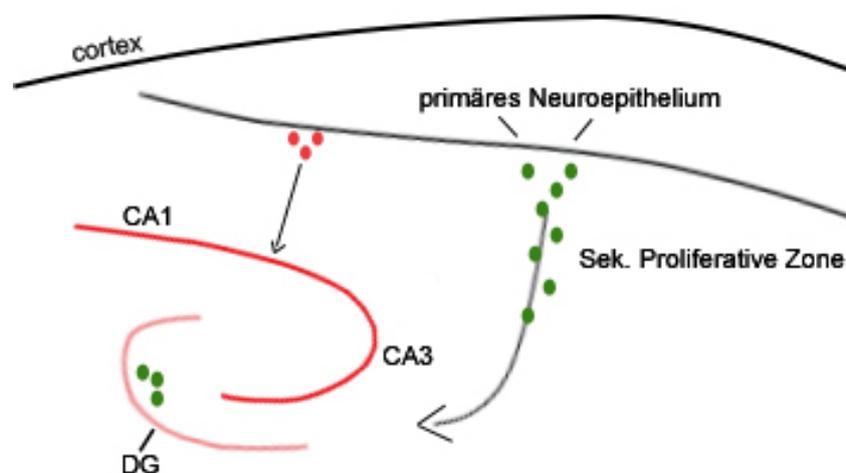


Abb.1.7. Hippocampaler Transversalschnitt zur schematischen Darstellung der Hippocampusentwicklung bei der Maus. Das mediale Pallidum der ventrikulären Zone ist Ursprungsort der Vorläuferzellen des DG (grüne Vorläuferzellen). Der Hippocampus proper bildet sich aus einer benachbarten Region (rote Vorläuferzellen). Neuroblasten des primären Neuroepitheliums verlassen ihre Nischenregion und bilden eine sekundäre proliferative Zone aus. Um den Entwicklungszeitpunkt P10 entsteht durch Umstrukturierung der Körnerzellprogenitoren die *tertiäre Matrix* in der SGZ des DG. Aus ihr gehen zeitlebens neue Körnerzellen hervor.

1.4. Permanente Marker mitotischer Zellen

Verschiedene Methoden im Vergleich

1.4.1. ^3H -Thymidin und BrdU-Markierung

Thymidin-Analoga als permanente Marker sich teilender Zellen und zur Weiterverfolgung derer Nachkommen wurden bereits Mitte der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts in Form von Tritiumwasser Thymidin verwendet. Dieses in frühen Zellzyklusanalysen verwendete S-Phasen-Label mitotischer Zellen wurde mittels Autoradiographie detektiert (Altman und Das, 1965, Cameron et al., 1993). Neuere Studien werden vorzugsweise mit dem Thymidinanalogon Bromodeoxyuridine (BrdU) durchgeführt. Dieser S-Phasen-Marker kann im Gegensatz zu ^3H -Thymidin immunocytochemisch detektiert werden und ermöglicht dadurch auch den Einsatz in Mehrfachfärbungen (Doppelt-, und Dreifachfärbungen) mit zelltypspezifischen Markern (Kuhn et al., 1996, Parent et al., 1997, Nilsson et al., 1999, Seri et al., 2001, Seki, 2002, Kempermann et al., 2003, 2004, Magavi et al., 2005, Plümpe et al., 2006, Steiner et al., 2006, Kronenberg et al., 2007, von Bohlen und Halbach, 2007, Zhang et al., 2007, Ehninger und Kempermann, 2008). Ob die BrdU-Markierung jedoch ausschließlich proliferierende Zellen identifiziert, oder auch Zellen, die sich in DNA-Reparaturvorgängen befinden, kann eigentlich nur durch Langzeitstudien evaluiert werden (Cooper-Kuhn und Kuhn, 2002, Palmer et al., 2000). Unter pathologischen Bedingungen gibt es einige Anzeichen dafür, dass „sterbende“ Neurone wie auch Nervenzellen nach einer Verletzung in

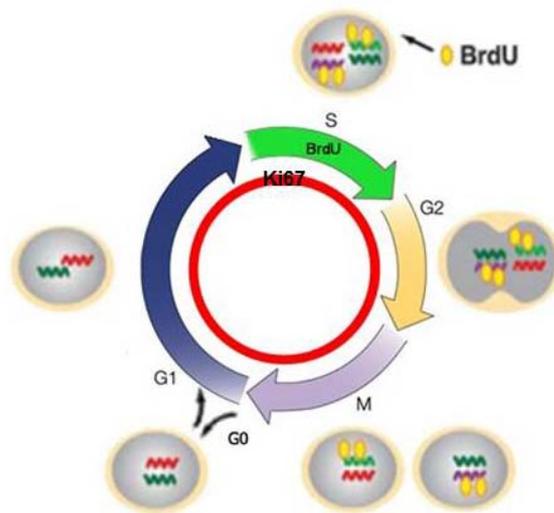


Abb.1.8. Der Zellzyklus (nach Leonhardt, 1990, Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen, S.54, Abb.35). Phasen des Zellzyklus: Mitose, G1-Phase, S=Synthesephase, G2-Phase, G0-Phase. PMZ=postmitotische Zelle. Während der S-Phase des Zellzyklus kann das dem Thymidin in seiner Strukturformel analoge BrdU in die DNA sich teilender Zellen eingebaut werden (beides sind Desoxyribosen, die sich lediglich im Basenrest unterscheiden; Thymidin hat einen Thyminbasenrest, während BrdU einen Uridinrest mit Brom an der Stelle 5 im Ring besitzt). BrdU nimmt dabei kompetitiv den Platz des Thymidins in der DNA ein (verändert nach Ming und Song, 2005, Baldwin et al., 2003).

eine Art „abortiven Zellzyklus“ eintreten (Breunig et al., 2007, Yang et al., 2003, Kuan et al., 2004), der ebenfalls eine S-phasenspezifische BrdU-Inkorporation ermöglicht. Doch da diese letztlich „kranken“ Neurone nicht über einen längeren Zeitraum überleben (Kuan et al., 2004), haben Langzeitexperimente, bei denen die markierten Zellen das BrdU-Label für einige Zeit mit sich tragen und so ihre terminale Differenzierung analysiert werden kann, kein Problem der Verwechslung. Eine weitere Möglichkeit bietet die Differenzierungsanalyse BrdU-markierter Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei ein früher Analysenzeitpunkt kurz nach der BrdU-Applikation (2h/24h) liegen sollte, während spätere Analysen (6 Tage/12 Tage) auch die Möglichkeit der Differenzierung und Reifung mit erfassen sollten. Über die Morphologie und Lokalisierung der unreifen bzw. differenzierten Zellen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, im Zusammenhang mit weiteren Differenzierungsmarkern, wäre die Gefahr der Misinterpretation „abortiv“ markierter Zellen nahezu ausgeschlossen.

1.4.2. Retrovirale Markierung mitotischer Zellen

Die retrovirale Markierungstechnik gibt mitotischen Zellen nicht nur eine permanente Kennzeichnung, sondern ermöglicht auch deren vollständige morphologische Analyse, beispielsweise durch die zusätzliche Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) oder anderer Reportergene. Auch elektrophysiologische Untersuchungen können nach einer solchen Virusinfektion gezielt durchgeführt werden (Ahn und Joyner, 2005, Carleton et al., 2003, Jessberger und Gage, 2009, Jessberger et al., 2008, Laplagne et al., 2006, 2007, Ming und Song, 2005, Tashiro et al., 2006, van Praag et al., 2002, Zhao et al., 2006, 2008). Retroviren tragen ein Reportergen mit sich, das eine vollständige Zellteilung für seine Integration benötigt. Sie sind dadurch noch exakter als spezifische S-Phasen Marker. Leider sind diese Markierungseffizienzen wesentlich geringer als eine Kennzeichnung durch BrdU, so dass quantitative Analysen bei geringem Zellteilungspotential schwierig sind (Gage, 2000). Aber auch spezielle Genkonstrukte in transgenen Tieren ($CreER^{T2}$) ermöglichen eine promotorspezifische induzierbare Markierung proliferierender Zellen (siehe Ahn und Joyner, 2005). Ein Beispiel hierfür sind *Nestin-CreER^{T2}* Tiere (Lagace et al., 2007). Nach Tamoxifen-Applikation exprimieren 97% der SGZ NPCs das determinierte fluoreszierende Protein (Lagace et al., 2007).

1.4.3. Charakterisierung mitotischer Zellen

Identifizierungsmarker

Eine Identifizierung über den zellulären Phänotyp durch spezifische Marker und morphologische Eigenschaften ergibt ein breites Spektrum an Charakterisierungsmöglichkeiten. *NeuN*, ein in Vertebraten Neuronen-spezifisches nukleäres Protein („neuronal nuclei“), das zur Charakterisierung postmitotischer Neurone verwendet wird,

findet ebenso wie die Astrocytenmarker *GFAP*, *BLBP* (Schmid et al., 2006, Steiner et al., 2006, Anthony et al., 2005), *Vimentin*, *musashi* (Seri et al., 2004) und *S100 β* , die zugleich fortschreitenden Zellzyklus und Differenzierung determinieren, in standardisierten immunhistologischen Detektionssystemen große Anwendung. *Nestin* ist gegenwärtig der populärste Vorläuferzellmarker für *in vivo* Studien (Emsley et al., 2005). Bei transgenen Tieren, die beispielsweise GFP unter dem NPC-Promotor *Nestin* exprimieren, ist jedoch nur die Analyse der Zellen möglich, die diesen Promotor hochreguliert haben. Zellen, deren *Nestin*-Promotor nicht hochreguliert ist, erhalten keine NPC-Markierung über GFP (Yamaguchi et al., 2000, Filippov et al., 2003, Lledo et al., 2006). Für die Klassifizierung „unreifer“ Neurone, werden Marker wie *Doublecortin*, *PSA-NCAM*, *CRMP4*, *Calretinin* (Brandt et al., 2003, Lledo et al., 2006, Seki et al., 1993, Seri et al., 2004) oder *beta-III-Tubulin* verwendet, während für die Identifizierung von Vorläuferzellen im adulten Gehirn *Nestin* (Lendahl et al., 1990, Yamaguchi et al., 2000), *SOX2* (D'Amour und Gage, 2003), *BLBP* (Rousselot et al., 1997, Steiner et al., 2006) und *GFAP* (Doetsch et al., 1999) Verwendung finden. Damit das Zellschicksal einer BrdU-markierten Zelle letztlich genau beschrieben werden kann, reicht es nicht aus, nur einen der oben genannten Differenzierungsmarker zu verwenden (Magavi und Macklis, 2002a und b). Für die genauere Differenzierungsanalyse des neurogenen Schicksals einer Zelle können zusätzliche postmitotische Marker wie *Prox1*, *Calbindin* und der Neurotransmitter *GABA* im hippocampalen DG und das dopamin-assoziierte Enzym *Tyrosin Hydroxylase* für den OB hinzugezogen werden. Langzeitstudien, die eine fortgeschrittene neuronale Differenzierung nach markierter Zellteilung ermöglichen, bieten unter der Verwendung verschiedener Identifizierungsmarker gute Determinierungsgrundlagen (Magavi et al., 2000, Arvidsson et al., 2002, Magavi und Macklis, 2002a, Parent et al., 2002b, Kronenberg et al., 2003, Chen et al., 2004). Sie geben jedoch keinen Aufschluss über die Zellschicksalsdeterminierung und die funktionelle Integration in das bestehende neuronale Netzwerk (Arvidsson et al., 2002, Parent et al., 2002b, Brown et al., 2003, Kronenberg et al., 2003, Chen et al., 2004). Über Funktionalität und neuronales Schicksal geben letztlich lediglich elektrophysiologische Studien (Song et al., 2002b, van Praag et al., 2002, Ming und Song, 2005, Kaltschmidt et al., 2006, Roth-Alpermann et al., 2006, Schrenk-Siemens et al., 2008) und retrograde Markierungen von Axonen (Stanfield und Trice, 1988, Hastings und Gould, 1999, Markakis und Gage, 1999, Magavi et al., 2000, Scharff et al., 2000, Catapano et al., 2002, Chen et al., 2004, Seri et al., 2004, Zhao et al., 2006, Suh et al., 2007, Zhao et al., 2008) eindeutigen Aufschluss.

Mitotische Zellen der SVZ, SGZ und des Kortex

Während neugeborenen Neurone in der adulten SVZ über eine weite Distanz (bis zu 5mm, Lois et al., 1996, Zhao et al., 2008) (Spezies spezifisch sogar bis zu einigen Zentimetern,

Kaneko et al., 2010) durch den RMS wandern müssen, um granuläre oder periglomeruläre Neurone, zwei verschiedene Interneuronentypen des olfaktorischen Systems, zu werden (Review Ge et al., 2007, Lledo und Saghatelian, 2005), ist der Weg neugeborener granulärer-Neurone aus der SGZ in die Körnerzellschicht des adulten DG von wesentlich kürzerer Distanz. Zellmigrationsbewegungen im olfaktorischen System werden nicht durch radiale Gliazellen oder Axonfasern gelenkt. Junge SVZ-Neurone wandern in „Glia-Röhren“ (Kaneko et al., 2010) in Form von „Ketten-Migrationsbewegungen“ (Lois und Alvarez-Buylla, 1994, Lois et al., 1996, Doetsch und Alvarez-Buylla, 1996, Wichterle et al., 1997). Die Migrationsgeschwindigkeit wird dabei über das Level an GABA gesteuert, an dessen Modulation Astrocyten mitwirken (Review Ge et al., 2007). Bei der neuronalen Migration und deren Positionierung während der Kortikogenese spielt das extrazelluläre Matrix Protein *Reelin* eine entscheidende Rolle (Review Zhao und Frotscher, 2010). Defekte in der neuronalen Migration sind bei vielen neuronalen Erkrankungen wie *Lissencephalie*, *Epilepsie* und *mentale Retardierung* involviert (Review Zhao und Frotscher, 2010). *Reeler*-Mäuse zeichnen sich über ihre charakteristische schwankende Bewegung, sowie Tremor und Ataxie aus. Mikroskopische Befunde zeigen dabei schwerwiegende Fehlschichtungen v.a. im Kortex, ein Phänomen, das sich hauptsächlich im Krankheitsbild *Lissenzephalie* wiederfindet. *Reelin* wird von den Cajal-Retzius Zellen der marginalen Zone des Kortex gebildet (Review Zhao und Frotscher, 2010). Zellmigrationsbewegungen in der SGZ werden auch über das Protein *DISC1* gesteuert, wobei eine geringere *DISC1* Expression größere Migrationsdistanzen hervorruft (Duan et al., 2007).

Adulte Neurogenese ist keinesfalls ein Zufallsprozess, sondern unterliegt strengen physiologischen und pathologischen Regulatorien. Beginnend mit der Proliferation der NSCs, ihrer Differenzierung und Schicksalsbestimmung, endet sie mit der „Charakterisierung mitotischer Zellen“ beim Überleben und der neuronalen Reifung, die bis zur synaptisch integrativen Verschaltung analysiert werden kann (Zhao et al., 2008). Dabei können zwei Arten von neuralen Vorläuferzellen anhand spezieller morphologischer Merkmale und Expression spezifischer einzigartiger molekularer Markerzusammensetzungen identifiziert werden (Zhao et al., 2008). Während *Typ 1* hippocampale Vorläuferzellen radiale Fortsätze besitzen, mit denen sie die Granuläre Zellschicht gänzlich durchziehen und sich damit bis in die innere Molekularschicht verzweigen (*Typ 1* sind radiale Astrozyten, Seri et al., 2004) und *Nestin*, *GFAP* sowie *SOX2* positiv sind (Fukuda et al., 2003, Garcia et al., 2004, Kemperman et al., 2004, Steiner et al., 2006, Suh et al., 2007), unterscheiden sie sich morphologisch und funktionell von reifen Astrocyten. Hippocampale Vorläuferzellen vom *Typ 2* dagegen verfügen nur über kurze dendritische Fortsätze und sind *GFAP*-negativ (Brandt et al., 2003, Kempermann et al., 2004, Steiner et al., 2006). *Typ 1-* (Kempermann et al., 2004, Seri et al., 2001, 2004, Steiner et al., 2006) oder *B-Zellen*

(Doetsch et al., 1999) sind frühe Vorläuferzellen mit Astrozyten-ähnlicher Morphologie und Stammzell-ähnlicher Eigenschaft (Brandt et al., 2003, Kempermann et al., 2004). *Typ 2* oder *D1-Zellen* (Seri et al., 2001, 2004) sind bereits Linien-determiniert und werden auch als intermediäre Vorläuferzellen bezeichnet. *D-Zellen* kommen vorwiegend in „Zellklustern“ von

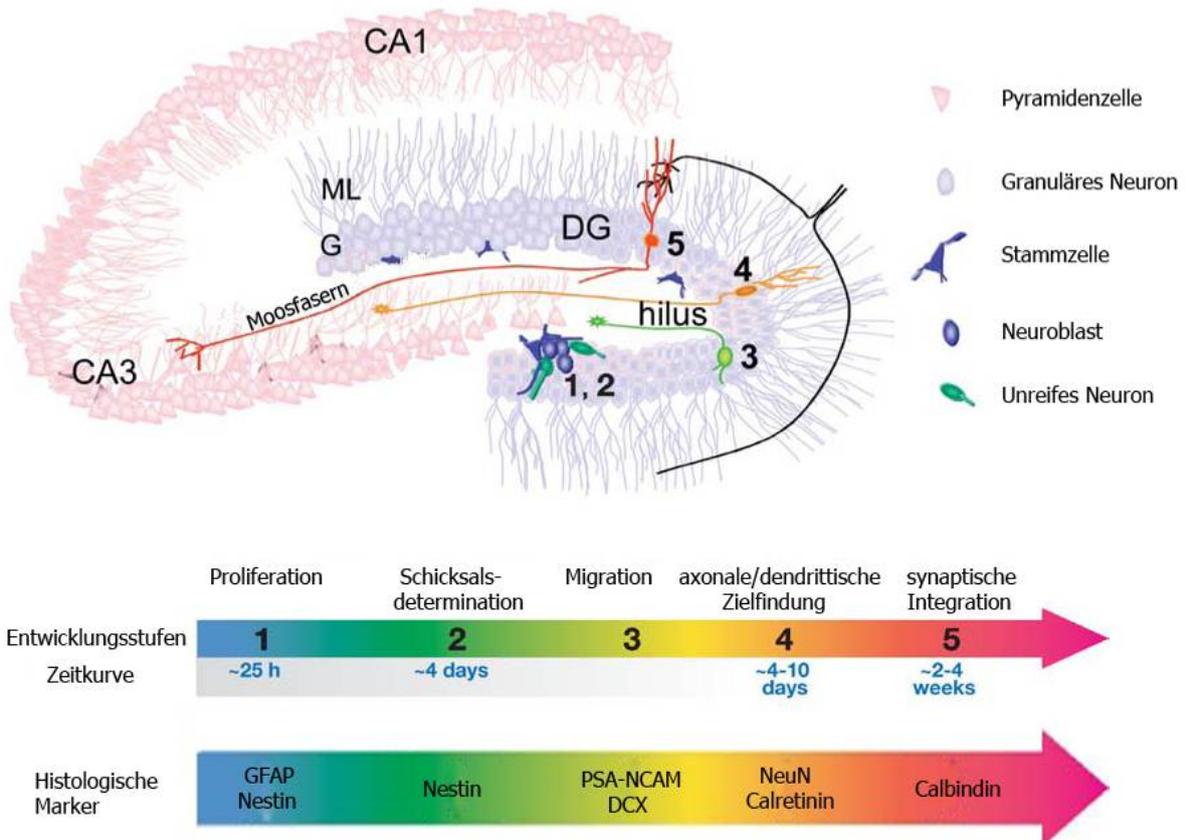


Abb.1.9. Neuronale Differenzierungsstufen. Die Zellstadien sind farblich den jeweiligen histologisch determinierten Reifungsstufen zu bestimmten zeitlichen Abschnitten zugeordnet (verändert nach Ming und Song, 2005).

zwei bis vier Zellen vor (Palmer et al., 2000, Seri et al., 2004) und entsprechen den bereits in der Literatur beschriebenen kleinen, dunkel gefärbten Vorläuferzellen (Altman und Das, 1965, Cameron et al., 1993, Kaplan und Bell, 1984). Während *D1-Zellen* von runder Struktur sind und sich durch BrdU markieren lassen, befinden sich *D2-* und *D3-Zellen* im postmitotischen Stadium und sind aufgrund dessen nicht über BrdU-Incorporationen detektierbar (Seri et al., 2004). *D-Zellen* exprimieren typische Marker unreifer Neurone wie *PSA-NCAM*, *DCX*, *TUC4*, *NeuroD* und sind *NeuN*, *Calbindin* sowie *GFAP* negativ (Seri et al., 2004). Offensichtlich existieren also verschiedene Bezeichnungen für NPCs und unreife Neurone. Dabei entsprechen die unterschiedlichen Nomenklaturen der Differenzierungsstufen gemeinsamen Merkmalen, die durch die Expression bestimmter Marker und morphologischer Besonderheiten einander zugeordnet werden können.

1.5. Mediatoren adulter Neurogenese

Neurobiologische Betrachtung der Zelldifferenzierung

Die DG-Neurogenese und der Charakter neuronaler Vorläuferzellen wurde v.a. im adulten Gehirn bereits intensiv untersucht (Alvarez-Buylla und Lim, 2004, Kempermann et al., 2004, Lledo et al., 2006, Ming und Song, 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass die proliferierenden Vorläuferzellen der SGZ im DG GFAP-exprimierende Zellen sind, die sowohl elektrophysiologische wie auch morphologische Merkmale von Astrozyten aufweisen (Seri et al., 2001, Filippov et al., 2003). Diese GFAP-positiven Vorläuferzellen haben eine vergleichbare Morphologie mit den radialen Gliazellen der embryonalen Ventrikularzone. Sie besitzen u.a. bestimmte Eigenschaften neuronaler Stammzellen (Doetsch et al., 1999, Alvarez-Buylla et al., 2002, Fukuda et al., 2003, Seri et al., 2001). Diese mitotisch-aktiven, RG-ähnlichen Vorläuferzellen führen durch asymmetrische Zellteilungsprozesse zu transient amplifizierenden NPCs, die schließlich aus dem Zellzyklus austreten, um zunächst zu postmitotisch unreifen Neuronen zu differenzieren (Kronenberg et al., 2003, Kempermann et al., 2004). NSCs unterscheiden sich von den mitotischen aktiven NPCs durch ihre fortwährende Fähigkeit zur Selbsterneuerung und ihre unbegrenzte Proliferationsaktivität, während NPCs nicht zur Selbsterneuerung fähig sind und nur limitierte Proliferationskapazitäten haben. Analog der Multipotenz der Stammzellen können auch NPCs multipotent sein, d.h. auch sie können Gliazellen und Nervenzellen bilden. Mit der Bezeichnung Neuroblast oder NPC werden mitotisch aktive Vorläuferzellen auf ein neuronales Zellschicksal determiniert, was bedeutet, dass ihr weiteres Schicksal auf eine Differenzierung in Richtung Nervenzelle festgelegt ist. Sie sind dadurch nicht mehr multipotent (Reynolds und Rietze, 2005). Über die Kontrolle und Entwicklung der Vorläuferzellen der frühen postnatalen Neurogenese, die eine Art Übergangsstadium zwischen embryonaler und adulter Neurogenese darstellen, ist bislang relativ wenig bekannt. Ihre korrekte Entwicklung ist jedoch Voraussetzung für die Etablierung der adulten neurogenen Nische. Auch für die mitotisch-aktiven Vorläuferzellen der hilären *tertiären Matrix* im jungen postnatalen Hippocampus konnten Übereinstimmungen zu Astrozyten- und RG-Merkmalen nachgewiesen werden (Rickmann et al., 1987, Sievers et al., 1992). Ein großer Teil dieser mitotischen Vorläuferzellen differenziert zu proliferierenden Neuroblasten und postmitotisch unreifen Neuronen, die dann in die Körnerzellschicht einwandern (Namba et al., 2005). Eine wesentlich kleinere Anzahl mitotisch aktiver Vorläuferzellen differenziert im Hilus und in der Körnerzellschicht zu Astrozyten. Eine Subpopulation davon wandert anschließend in die SGZ des DG ein. Aus ihr bilden sich dann durch weitere Differenzierungsprozesse radiale Gliazellen, die die potentiellen Stammzellen der adulten Neurogenese darstellen (Namba et al., 2005).

Hippocampale Astrocyten sind wichtige Mediatoren der Neurogenese in der SGZ. Sie unterstützen die neuronale Differenzierung der hippocampalen Vorläuferzellen und sind wegweisend an der Integration der neugebildeten Neurone beteiligt (Song et al., 2002, Seri et al., 2004). Bei adulten hippocampalen Vorläuferzellen (AHPs) konnte die Überexpression von *Wnt3* eine Zunahme der Neurogenese *in vitro* und *in vivo* hervorrufen (Lie et al., 2005). Durch Blockierung des *Wnt* Signals wurde die AHP Neurogenese *in vitro* vermindert und die Neurogenese *in vivo* nahezu vollständig inhibiert (Lie et al., 2005). Proliferierende Zellen und neurale Vorläuferzellen stehen in engem Kontakt mit den Blutgefäßen, wodurch Faktoren, die aus den Blutgefäßen stammen, direkten Einfluss auf adulte neuronale Vorläuferzellen nehmen könnten (Alvarez-Buylla und Lim, 2004, Palmer et al., 2000). Dies konnte vor allem für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) gezeigt werden. *VEGF* begünstigt die Zellteilung sowohl in der SVZ als auch in der SGZ (Cao et al., 2004) und ist verantwortlich für die erhöhte Neurogeneserate bei adulten Mäusen, die in einer „angereicherten Umgebung“ (enriched environment, ERV) leben. In dieser „angereicherten Umgebung“ wird die Gelegenheit zur freiwilligen Reizaufnahme begünstigt, und dadurch die Neubildung von Neuronen auch im adulten System wiederbelebt (van Praag et al., 2005, Kempermann, 2008, Zhao et al., 2008). Die Neurogeneserate der SVZ und SGZ sinkt mit zunehmendem Alter. Dies konnte v.a. durch die Neurosphärenkulturen von Molofsky et al. (2006) für SVZ-Vorläuferzellen in alten Tieren gezeigt werden.

Auch Neurotransmitter nehmen Einfluss auf das Zellschicksal der hippocampalen Vorläuferzellen. Adulte NSCs residieren in einer Mikroumgebung, die wie ein Netzwerk in neuronaler Verschaltung miteinander verbunden ist. In dieser adulten neurogenen Nische stimulieren glutamaterge Signale, die vorwiegend aus dem EC kommen, und GABAerge Signale der Interneurone des DG die NPCs bei ihrer Differenzierung und Reifung (Review Ge et al., 2007, Kumamoto et al., 2012). Dabei ist die Funktionalität des NMDA Rezeptors, ein Glutamat Rezeptor, nicht entscheidend für die Entstehung neuer DG-Neurone. Auch wenn sich seine Aktivität im hippocampalen Proliferationslevel wiederzuspiegeln scheint (Jang et al., 2007), konnte die für ihn essentielle Rezeptoruntereinheit NR1 nicht in *in vivo* proliferierenden Zellen immunhistologisch detektiert werden (Deisseroth et al., 2004, Nacher und McEwen, 2006). Im Gegensatz zu dem nur schwer zu erfassenden Wirkungsmechanismus des Glutamats konnte eine direkte Wirkung des Neurotransmitters GABA auf *Typ-2*-Vorläuferzellen im adulten DG gezeigt werden. Als Folge der Depolarisation kommt es zum Kalziumioneneinstrom und zur Hochregulation des neuronalen Differenzierungsfaktors *NeuroD*, was darauf hindeutet, dass ein direktes GABA-Signal differenzierungsfördernd für *Typ-2* hippocampale Vorläuferzellen ist (Tozuka et al., 2005). Unterstützend zeigte Deisseroth et al. (2004), dass durch Kalziumionen-Antagonisten

die neuronale Differenzierung abnimmt, wohingegen sie durch Agonisten verstärkt werden konnte.

In der SVZ sind die Wachstumsfaktoren EGF und FGF2 nicht nur potentiell für den Erhalt von NSCs *in vitro* notwendig, sondern wirken zudem auch proliferationsfördernd. Während FGF2 für den Erhalt des Stammzellpools im olfaktorischen System wichtig ist (Kuhn et al., 1997, Zheng et al., 2004), wirkt EGF differenzierungshemmend in Richtung Neuroblastenstadium (Doetsch et al., 2002). Obwohl die FGF2-Infusion kaum Auswirkung auf die SGZ-Proliferation junger adulter Mäuse (drei Monate) hat, führt eine Deletion von *fgfr1* (FGF-Rezeptor-1) im ZNS zu einer Erniedrigung der SGZ-Neurogeneserate (Jin et al., 2003, Zhao et al., 2007). Ebenso scheint der endogene Ligand des EGFR (EGF-Rezeptor) TGF α eine wichtige Rolle bei der Neurogenese zu spielen (Enswere et al., 2004). EGF-Rezeptoren sind überwiegend auf transient-amplifizierenden Zellen zu finden, die sich in einer Art Zwischenstadium zwischen NSCs und Neuroblasten befinden (Doetsch et al., 2002, Höglinger et al., 2004, Hagg, 2005). Aber auch extrinsische Signale wie Sonic hedgehog (SHH) und neurotrophe Faktoren wie BDNF (brain-derived neurotrophic factor) sind positive Schlüsselregulatoren der adulten Neurogenese (Lie et al., 2004 Fig. 2). *p75*-defiziente Mäuse haben einen kleineren OB und eine geringere SVZ-Neurogeneserate (Zhao et al., 2008). *BDNF*^{+/-} Mäuse und transgene Tiere, die eine dominant negative Form des TrkB-Rezeptors (an den BDNF bindet) exprimieren, zeigen ein vermindertes Zellüberleben der NSCs (Zhao et al., 2008). Die Wirkungsweise des Notch1 Signals konnte vor allem bei der Aufrechterhaltung des Stammzellpotentials und der Selbsterneuerung der neuralen Vorläuferzellen in der SVZ-Nische gezeigt werden (Hitoshi et al., 2004). Der ciliare neurotrophe Faktor CNTF unterstützt dabei das Selbsterneuerungspotential der neuralen Vorläuferzellen *in vitro* durch einen Anstieg der Notch1 Expression, während endogenes CNTF im Gehirn der Maus möglicherweise direkt über den CNTF α Rezeptor auf das Überleben und die Proliferation der GFAP-exprimierenden neuralen Stammzellen einwirkt (Hagg, 2005). TGF α , FGF2 und CNTF werden im ZNS von Astrozyten gebildet (Hagg, 2005). So könnten Astrozyten möglicherweise manipulatorisch, über eine gezielte Expression von FGF2 und CNTF bei neuralen Stammzellen sowie über TGF α bei Vorläuferzellen, Einfluss auf die Proliferation in der neurogenen Nische nehmen (Hagg, 2005). Neben den bisher bekannten intrazellulären Signalwegen, die den Wachstumsfaktoren, Neurophinen und Morphogenen nachgeschaltet sind, gibt es eine Vielzahl weiterer intrazellulär wirkender Mediatoren, die regulatorischen Einfluss auf die adulte Neurogenese nehmen. Darunter sind auch Transkriptionsfaktoren wie TLX und Bmi-1, die an der Erhaltung des „NSC-Pools“ mitbeteiligt sind (Molofsky et al., 2003). TLX nimmt eher proliferations-regulierenden Einfluss (Ferri et al., 2004, Shi et al., 2004), während Bmi-1 den neuronalen Alterungsprozess durch die Unterdrückung von p53-Signalen inhibiert. Pax6

wirkt pro-neural differenzierungsfördernd auf SVZ-Progenitoren, Olig2 begünstigt hingegen eine Differenzierung in Richtung Glioma (Jackson et al., 2006).

1.6. Neuronale Reifungsprozesse

In welchem Zeitrahmen die neuronale Reifung im adulten Hippocampus erfolgt, wird kontrovers diskutiert. Erste neuronale Differenzierungsmarker wie *NeuN* wurden bereits 24h nach der Zellmarkierung proliferierender NPCs über Kollokalisierungsstudien ermittelt (Kempermann et al., 2003, 2004, Seri et al., 2004, Duan et al., 2008). Auch *Prox1*, ein Marker für postmitotische Neurone, ist bereits nach 24h nachweisbar (Duan et al., 2008). Ming und Song (2005) konnten in ihren Studien zeigen, dass für die neuronale Determinierung ca. vier Tage benötigt werden (Abb.1.9.), wobei die axonale Zielfindung zwischen vier und zehn Tagen in Anspruch nimmt. Diese Erkenntnis vertreten auch Chechneva et al. (2005), die einen Zeitraum von ca. sechs Tagen für die Differenzierung zu unreifen Neuronen beschreiben. In den Studien von Bischofberger (2007) werden zwei Wochen für die Entstehung junger Neurone benötigt, die zu diesem Zeitpunkt aber immer noch PSA-NCAM und DCX positiv sind. Erst nach insgesamt sechs Wochen zeigt Bischofberger (2007) eine synaptische Integration, einhergehend mit der Expression von *NeuN*. Andere Studien beschreiben jedoch weitaus kürzere Zeitfenster für die neuronalen Reifungsprozesse. Junge granuläre Neurone, die eine hohe intrazelluläre Chloridionen-Konzentration aufweisen, werden durch GABA-Signale depolarisiert. Bereits zwei bis vier Wochen nach ihrer neuronalen Entstehung antworten sie auf das GABA-Signal mit Hyperpolarisation und der Bildung dendritischer Ausläufer (Fig. 4, Zhao et al., 2008). Glutamat Rezeptoren wurden bereits in ca. zwei Wochen alten Neuronen gefunden (Lledo et al., 2006). Erste Anzeichen reifer Neurone waren sogar nach vier Wochen sichtbar, wobei weitere physiologische wie morphologische Veränderungen folgten (Ge et al., 2007, Toni et al., 2007, Zhao et al., 2006). Nach vier bis sechs Wochen war die *LTP*-Amplitude (Langzeit Potenzierung) größer, und auch die Dichte an „*mushroom spines*“, die bei der Gedächtnisbildung von Bedeutung sind, nahm zu. Die initiale Depolarisierung durch GABA ist entscheidend für die Reifung der neugeborenen granulären Neurone. Studien mit einem Knockdown des Chloridionenkanals NKCC1 zeigten eine fehlerhafte neuronale Reifung (Ge et al., 2006). Durch das Protein *DISC1* werden Dendritenwachstum und physiologische Reifungsprozesse der NSCs des DG kontrolliert (Duan et al., 2007). Viele neugeborene Neurone sterben jedoch bereits einige Wochen nach ihrer Geburt (Gould et al., 1999a). Ursächlich verantwortlich für die Eliminierung der neugebildeten Neurone sind mitunter Umwelteinflüsse (Kee et al., 2007, Tashiro et al., 2007), aber auch neurotrophe Faktoren wie BDNF üben überlebens-unterstützende Funktionen auf die neugeborenen hippocampalen Vorläuferzellen aus.

Faktoren die eine Zellzyklusveränderung hervorrufen können

CyclinD-CDK4 und *CyclinD-CDK6* sind Kinasen, die mit dem Wiedereintritt ruhender Zellen in den Zellzyklus assoziiert sind (Abb.1.10.A). Beim Übergang aus dem Ruhestadium in den Zellzyklus wird *CyclinD1* hochreguliert. In Kombination mit *CDK4* und *CDK6* kann das Schlüsselsubstrat *pRb* (retinoblastoma Protein) phosphoryliert werden, das sich infolge seiner Phosphorylierung von dem Transkriptionsfaktor *E2F* dissoziiert. Nun kann *pRb* weitere Zielgene der Zellzyklusprogression aktivieren (Abb.1.10.B) (Coller, 2007). *p21* ist ein

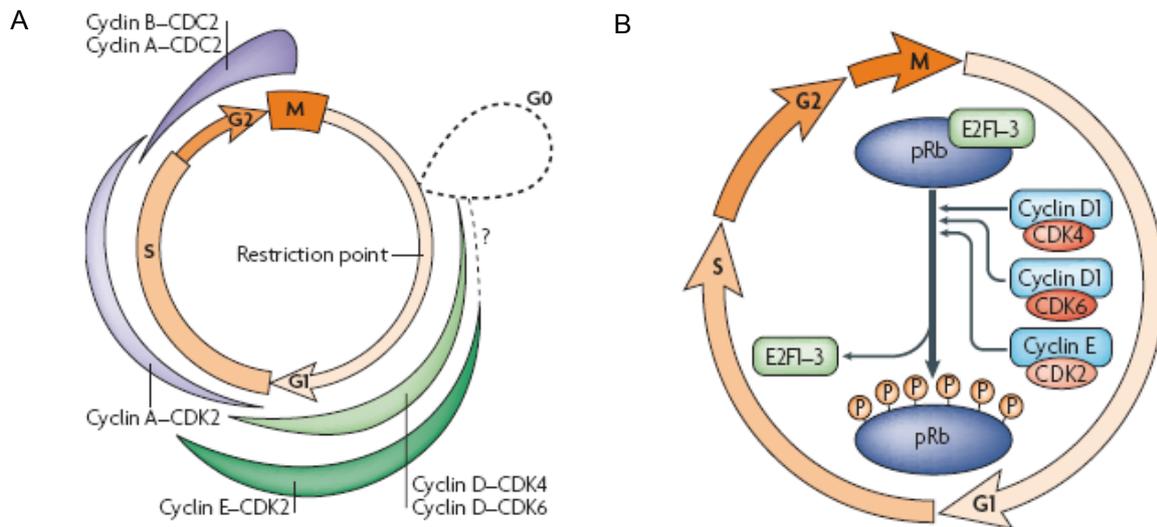


Abb.1.10. (A) Schematische Darstellung des Zellzyklus mit der G0-Phase als Ruhestadium der Zellzyklusprogression. Cyclin D1 reguliert in Kombination mit CDK4 und CDK6 den Wiedereintritt in den Zellzyklus. (B) Das Retinoblastoma Protein (pRb) ist ein zentrales Glied der Zellzyklusprogression. Die Phosphorylierung von pRb über CyclinD1-CDK4, CyclinD1-CDK6 und CyclinE-CDK2 Komplexe ermöglicht über die Dissoziation von E2F den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus (Coller, 2007).

Protein, dessen Rolle bislang vor allem in der Kontrolle des Wachstumsarrests untersucht wurde. *p21* scheint aber auch beim Zellzyklusarrest und bei der Induktion der *p53*-abhängigen Apoptose involviert zu sein (Bukholm et al., 2000). Dabei inhibieren *p21*, *p27* und *p57* das Spektrum der *CDKs* (Viallard et al., 2001) und damit die Zellzyklusprogression (Bunz et al., 1998). An Fibroblasten konnte bereits gezeigt werden, dass *RAF* durch *p21*-Induktion einen „G1-spezifischen Zellzyklusstop“ hervorrufen kann (Sewing et al., 1997). Dabei findet die Induktion von *p21* durch *RAF* teilweise auf Transkriptionsebene statt: *p21* bindet an den *CDK4*-und *CDK2*-Komplex und inhibiert dadurch die *CyclinD* und *CyclinE* abhängigen Kinaseaktivitäten. Es kommt zu einem „G1-Zellzyklusstop“ (Abb.1.11.). Die Induktion von *p21* durch die Aktivierung von neuronalen Wachstumsfaktoren (NGF), *RAS* oder *RAF* wird auch von einem Wachstumsarrest begleitet (Sewing et al., 1997).

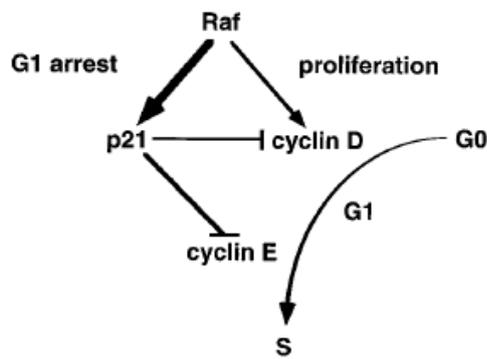


Abb.1.11. Über die Aktivierung von RAF werden Signale aktiviert, die ein Fortschreiten der G1/S Phase des Zellzyklus inhibieren. Während eine moderate RAF Aktivierung ausreicht um CyclinD zur Phosphorylierung von Rb zu induzieren und dadurch den Eintritt in die S-Phase zu ermöglichen, bewirkt eine starke RAF Aktivierung einen p21 vermittelten G1-Zellzyklusstop (Sewing et al., 1997).

Auch *Notch*-Signale nehmen Einfluss auf die embryonale Vorläuferzellendifferenzierung (Chitnis et al., 1995, Dorsky et al., 1997, Furukawa et al., 2000, Gaiano et al., 2000, Henrique et al., 1997, Lanford et al., 1999, Lütolf et al., 2002, Morrison et al., 2000, Muskavitch, 1994, Nieto et al., 2001, Scheer et al., 2001, Tanigaki et al., 2001, Wakamatsu et al., 2000). *In vitro* Experimente konnten dabei zeigen, dass *Notch1* möglicherweise eine Rolle in der Regulierung der Neuritenbildung bei postmitotischen Neuronen spielt (Stump et al., 2002). Bei jungen postnatalen Mäusen wurden *Notch1*-Transkripte in der SVZ und der VZ gefunden (Stump et al., 2002). Durch sein Expressionsmusters könnte *Notch1* hierdurch die Stammzellen des postnatalen Gehirns markieren (Stump et al., 2002). Für die Aktivierung der *Notch*-Kaskade werden *Hes*-Gene benötigt (Stump et al., 2002). *Hes1* wurde bei P4 Tage alten Mäusen weder in der SVZ noch im DG detektiert. Dafür konnte aber die Expression von *Hes5* zu diesem Zeitpunkt in der SVZ und VZ gezeigt werden. Im adulten Hippocampus wurden „Zellkluster“ *Hes5*-exprimierender Zellen in der SGZ lokalisiert, die ein ähnliches Erscheinungsbild wie die postnatal detektierten *Notch1* „Zellkluster“ aufweisen (Stump et al., 2002). Auch im postnatalen Kleinhirn konnte die Expression von *Notch1* in der Purkinjezellschicht nachgewiesen werden (Stump et al., 2002). Gaianos Experimente an Mäusen zeigten, dass *Notch*-Signale die Neurogenese inhibieren, während sie den Erhalt neuraler Vorläuferzellen (z.B. rA) fördern (Gaiano et al., 2000). Eine instruktive Unterstützung der Gliogenese durch *Notch* konnte von Tanigaki et al. (2001) an adulten hippocampalen Vorläuferzellen gezeigt werden (Miller et al., 2007).

Im embryonalen Gehirn ist die Expression des *Notch* Effektorgens *Hes1* für den Erhalt neuraler Vorläuferzellen verantwortlich, wobei anhaltende und hohe Level der *Hes1* Expression die Proliferation und Differenzierung inhibieren (Shimojo et al., 2008). Die *Hes1* Proteinexpression wurde vor allem in aktiv-proliferierenden Zellen gefunden. Eine Inhibition der Proliferation äußerte sich bei fortwährender *Hes1*-Expression in einer G1-Verzögerung, was darauf hindeutet, dass *Hes1* in seiner Expression zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus herunterreguliert wird und im Laufe der neuronalen Differenzierung schließlich vollkommen untergeht (Shimojo et al., 2008). *Hes1*-exprimierende Zellen zeigten sich

dementsprechend auch positiv für den mitotischen Zellzyklusmarker Ki67 (Shimojo et al., 2008). Die gesamte Größe des Gehirns wird durch den Aufbau des Zellzyklus determiniert. Bei Mäusen, denen der allgegenwärtige Zellzyklusinhibitor *p27Kip1* fehlt, wurde ein stark vergrößertes Gehirn gefunden (Ohnuma et al., 2003). *p27Kip1* gilt als spezifischer *CDK*-Inhibitor, der ab einem bestimmten Level Zellzyklusabbruch und Zelldifferenzierung hervorruft (Ohnuma et al., 2003). Experimente an Oligodendrozyten konnten bereits zeigen, dass die Zellen durch eine Zunahme von *p27Kip1* bereits nach wenigen Zellzyklusdurchläufen beschleunigt differenzieren. *P27Xic1* werden gliogene Eigenschaften zugesprochen. Als Mitglied der *Cip/Kip* Familie der *CDK*-Inhibitoren inhibiert es die Zellteilung in der *Xenopus* Retina und induziert so die Differenzierung von Müller Glia Zellen aus den Retinoblasten (Ohnuma et al., 1999).

Ebenso wie *p27Xic* führt auch die *Notch*-Aktivierung zu einem Zellzyklus-Abbruch (Ohnuma et al., 2003). Der Restriktionspunkt definiert dabei eine Schlüsselstelle am Ende der G1-Phase des Zellzyklus (Abb.3.3.A). Zellen, die diesen kritischen Punkt überwunden haben durchlaufen nahezu ausnahmslos den kompletten Zellzyklus (Ohnuma et al., 2003). Für die weitere Differenzierung müssen die proliferierenden Zellen die G1-Phase des Zellzyklus vor dem Restriktionspunkt verlassen, um in die G0-Phase einzutreten. Eine Blockierung des Zellzyklus in der G1-Phase durch Überexpression bestimmter *CDK*-Inhibitoren ist demnach differenzierungsfördernd, während eine G1-Phasen-Zellzyklusprogression differenzierungsinhibierend wirkt (Ohnuma et al., 2003).

Der Transkriptionsfaktor *Emx2* wird in adulten Stammzellen des DG exprimiert. Durch die Inhibition von *Emx2* erhöht sich die Population symmetrisch teilender Stammzellen, während sie durch eine *Emx2* Aktivierung verringert wird. Der Transkriptionsfaktor *Sox2* wird ebenfalls von neuronalen Stammzellen exprimiert. Durch eine konstitutive *Sox2* Expression wird das Vorläuferstadium der NSCs erhalten, während eine *Sox2* Inhibition die Differenzierung durch Zellzyklusabbruch bewirkt (Ohnuma et al., 2003).

Zellzykluslänge und neuronale Differenzierung

Auch die Studien von Calegari et al. betrieben Nachforschungen bezüglich eines kausalen Zusammenhangs zwischen der Zellzykluslänge von proliferierenden NPCs und der neuronalen Differenzierung im murinen Gehirn. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Übergang von Proliferation zur Differenzierung mit einer Expansion der G1-Phase des Zellzyklus assoziiert ist (Calegari et al., 2003, 2005). Eine verkürzte G1-Phase inhibiert demzufolge die Neurogenese und induziert gleichzeitig die Expansion neuronaler Vorläuferzellen (Lange et al., 2009). 2003 veröffentlichten Calegari und Huttner ihre „Zellzykluslängen-Hypothese“ in der sie die Länge der G1-Phase allein für die Induktion der neuroepithelialen Differenzierung verantwortlich machten. In ihren neuronalen Stammzellstudien konnten sie weiterhin zeigen, dass die Überexpression von *CDK4* und *CyclinD1* die

G1-Phase verkürzt und dadurch die Neurogenese inhibiert. Die hierdurch hervorgerufene Expansion von intermediären Vorläuferzellen führte zu einer dickeren SVZ und vergrößerten Oberfläche des postnatalen Kortex (Lange et al., 2009). 2011 konnten sie ihr Modell dann schließlich auch am adulten Hippocampus zeigen (Artegiani et al., 2011).

Zellzyklusverändernde Faktoren können neurologische Erkrankungen hervorrufen

Dryk1 ist essentiell für die Neuroblastenproliferation und scheint den Übergang zwischen Proliferation und Differenzierung bei neuroepithelialen Zellen zu definieren (Ohnuma et al., 2003). In einem Mausmodell für das *Down Syndrom* konnte gezeigt werden, dass *Dryk1A* ein kausaler Faktor des *Down Syndroms* ist, der durch Überexpression eine fehlerhafte neuronale Entwicklung hervorruft (Altafaj et al., 2001). Ein fehlerhaftes *Emx2* Signal kann Auslöser für *Schizophrenie* und *fokale Dysplasien* sein, durch die *Epilepsien* auftreten können (Ohnuma et al., 2003). *In vitro* Experimente an *Emx2*-Knockoutmäusen zeigen Reifungsdefekte an Körnerzellen, die zusammen mit einer cytoarchitektonischen Fehlentwicklung des DG beobachtet wurden (Savaskan et al., 2002). Durch das Fehlen von Moosfaserprojektionen bei *Emx2*-Nullmutanten konnte auch gezeigt werden, dass *Emx2* essentiell für die terminale Differenzierung der granulären Neurone ist und bei der korrekten Ausführung hippocampaler Verbindungen benötigt wird. Zhang et al. (2006) beobachtete bei adulten Ratten nach einem Hirnschlag eine Expansion neuronaler Vorläuferzellen in der SVZ, die durch eine Reduktion der Zellzykluslänge infolge einer verkürzten G1-Phase und den Zellzykluswiedereintritt hervorgerufen wurde. Durch die Aufrechterhaltung der Proliferation der NPCs werden in der SGZ des adulten DG täglich mehrere tausend neuronale Vorläuferzellen gebildet (Bayer et al., 1982a,b, Cameron et al., 2001, Kaplan et al., 1985, Lledo et al., 2006), wobei nur wenige dieser Zellen schließlich zu reifen und funktionellen Neuronen differenzieren (Biebl et al., 2000). Der Prozess der postnatalen Neurogenese erfordert eine genau determinierte und fein abgestimmte Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der NPCs auf der einen Seite und der Eliminierung überzähliger oder fehlerhafter Nervenzellen über apoptotische Eliminierungsprozesse auf der anderen Seite (Kaplan et al., 1985). Dies ist essentiell um die strukturelle und funktionelle Integrität der Gehirnstrukturen gewährleisten zu können.

1.7. Funktionelle Bedeutung adulter Neurogenese

1.7.1. Die Auswirkung der adulten hippocampalen Neurogenese auf das Lernen und die Gedächtnisbildung

Aufgrund seiner unterschiedlichen Verschaltung entlang der dorso-ventralen Axen ist der dorsale Hippocampus dem Lernen und der Gedächtnisbildung zugeordnet, während dem ventralen Teil das emotionale Verhalten zukommt (Bannermann et al., 2004). Es konnte ein

Zusammenhang zwischen der hippocampalen Neurogenese und dem räumlichen Lernen im *Morris-Wasserlabyrinth* hergestellt werden, der bislang allgemeine Gültigkeit hat. Außerdem haben Umweltreize Auswirkungen auf die SGZ-Neurogenese (Review: Olson et al., 2006). Durch „freiwilliges Laufen“ kann ein positiver Effekt auf die Zellproliferation beobachtet werden, während das Zellüberleben ein bis drei Wochen alter unreifer Neurone in einer „angereicherten Umgebung“ begünstigt wurde (Kempermann et al., 1997, 1998a und b, Nilsson et al., 1999, van Praag et al., 1999, Kee et al., 2007, Tashiro et al., 2007). „Freiwillige Bewegung“ und eine „angereicherte Umgebung“ haben eine positive Wirkung auf das räumliche Lernen (Kempermann et al., 1997, 1998, van Praag et al., 1999, 2005) und das Wiedererkennungsgedächtnis (NOR „*novel object recognition task*“, Bruel-Jungermann et al., 2005). Im Gegensatz zur körperlichen Ertüchtigung und „angereicherten Umgebungsbedingungen“ wirken Alter und Stress eher negativ-regulierend auf die SGZ-Neurogeneserate (Klempin und Kempermann, 2007, Kuhn et al., 1996, Mirescu und Gould, 2006). Andere Studien belegen, dass eine „angereicherte Umgebung“ (ERV) das Verhalten von Mäusen verändern kann, ohne dabei die hippocampale Neurogenese zu beeinflussen. Da neugeborene Neurone den ERV-Effekt nicht vermitteln können, ist ein Anstieg der Neurogeneserate eher unwahrscheinlich (Meshi et al., 2006). Welche Funktion die Neurogenese beim Lernen hat, wurde zuerst von Shors et al. (2001) untersucht. Sie konnten zeigen, dass beim Reiz-Reaktionslernen, einer Form der klassischen Konditionierung, das Lernen trotz MAM-induzierter Neurogenesedezimierung (Methylazoxymethanol Acetat, DNA methylierendes Agens) unbeeinträchtigt ist, solange der bedingte (konditionierte) Stimulus zeitgleich mit dem unbedingten (unkonditionierten) Stimulus erfolgt. Durch MAM-Behandlung, ein Toxin für proliferierende Zellen, wurde die Anzahl adult neugebildeter Zellen im DG der Ratten verringert (Shors et al., 2001). Ebenso zeigen konditionelle *tlx*-Knockoutmäuse (*TLX/NR2E1* reguliert adulte neuronale Stammzellproliferation), deren hippocampale Neurogenese in hohem Maße reduziert ist, keinen Defekt bei der kontextbezogenen Angst-Konditionierung (siehe Anagnostaras et al., 2001) (Zhang et al., 2008), während durch Bestrahlung von Versuchstieren und bei Ganciclovir-behandelten *GFAP-tk* (Thymidin Kinase) transgenen Mäusen (Nukleinbasenalogon zu Guanin, Virostatikum) ein verändertes Reiz-Reaktionslernen beobachtet wurde (Saxe et al., 2006, Winocur et al., 2006). Dazu ist hinzuzufügen, dass MAM-Behandlung gezielt nur wirklich junge Zellen tangiert, während durch Bestrahlung und bei transgenen *GFAP-tk* Mäusen junge Zellen und reife neugeborene Neurone betroffen sind. Demzufolge wäre es möglich, dass unreife und reife neugeborene Neurone unterschiedliche Funktionen beim Lernprozess haben. Während zwei Monate alte Mäuse durch Röntgenstrahlung im räumlichen Lernen im *Barnes-Labyrinth* beeinträchtigt sind, jedoch im *Morris-Wasserlabyrinth* keine Veränderung zeigen (Raber et al., 2004), liefern vergleichbare Experimente an drei Monate alten Tieren

gegenläufige Ergebnisse (Rola et al., 2004). Andere Studien, bei denen die Neurogeneserate von Mäusen und Ratten reduziert oder sogar eliminiert wurde, zeigen wiederum keine Veränderungen im räumlichen Lernen (Madsen et al., 2003, Meshi et al., 2006, Saxe et al., 2006, Shors et al., 2002, Snyder et al., 2005), mit Ausnahme einer veränderten Langzeitretention des Erinnerungsvermögens bei Röntgenstrahl-behandelten- und *tlx* transgenen Mäusen (Snyder et al., 2005). Zudem zeigen adulte induzierbare *tlx*-Knockoutmäuse Lerndefekte im *Morris-Wasserlabyrinth*. Im *Acht-Arm-Radial-Labyrinth* führte die Eliminierung der hippocampalen Neurogenese zu einem verbesserten Kurzzeitgedächtnis (Saxe et al., 2007). Schwierigere Tests, wie der *DNMS*-Test (delayed non-matching-to-sample), scheinen bei längeren Test-Beispiel-Phasen unter Neurogeneseablation schwerwiegender in ihrer Ausführung betroffen zu sein, als einfachere Tests (Winocur et al., 2006, Bruel-Jungerman et al., 2005, Madsen et al., 2003). Zeitnah der Röntgenstrahlbehandlung konnte ein Fehlverhalten in der räumlichen Orientierung beobachtet werden (Madsen et al., 2003). Eine MAM-Behandlung eliminierte die verbesserte Objektwahrnehmung, die durch die angereicherte Umgebung induziert worden war (Bruel-Jungermann et al., 2005). Um jedoch genaue Aussagen über die Charakteristik von unreifen und reifen Neuronen machen zu können, beziehungsweise um den „Turnover“ reifer Neurone zu determinieren, sind elektrophysiologische Ableitungen im trisynaptischen exzitatorischen Schaltkreis (DG → CA3 → CA1) ausschlaggebend (Abb. 1.6.).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der *MAPK* Signalweg an speziellen Lernprozessen essentiell beteiligt ist (Atkins et al., 1998, Selcher et al., 1999, Selcher et al., 2001). Ein Mitwirken der *RAF* Kinasen beim Lernen und der Gedächtnisbildung (L&M), demonstrierte Chen et al. (2006) am Beispiel *BRAF*. Diese geflochtenen *BRAF* Mäuse haben eine Deletion im *Exon 12*. Das so erzeugte offene Leseraster führt zu einer Nullmutation des *BRAF* Proteins. Diese Studien zeigen nicht nur, dass *BRAF* bei der Aktivierung von *ERK* im Hippocampus eine Rolle spielt, sondern auch seine entscheidende Mitwirkung an der synaptischen Plastizität, und dadurch eine Korrelation zum L&M hat. Während die *ERK*-Aktivität unter normalen Konditionen in den Pyramidenzellen des Hippocampus relativ niedrig ist, kann Verhaltenstraining eine *BRAF* vermittelte *ERK*-Aktivitätszunahme bewirken (Atkins et al., 1998, Blum et al., 1999). Da *CRAF* ausschließlich im Soma der Neuronen exprimiert wird, und *BRAF* im Soma und in den Neuriten zu finden ist (Morice et al., 1999), ist ein vermeintliches Mitwirken von *BRAF* bei der hippocampalen neuronalen Plastizität naheliegend.

1.8. Eliminierungssysteme überschüssiger neugebildeter Zellen

Durch die lebenslange Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn stellt sich gleichzeitig die Frage nach dem Zellschicksal dieser adulten Vorläuferzellen. Kaplan et al.

(1985) beobachtete im Gehirn von Ratten eine Zunahme von 7.5 Millionen Zellen im olfaktorischen GCL zwischen dem dritten und 31. Lebensmonat. In der Körnerzellschicht des DG wurde eine Zunahme von etwa 375.000 Zellen zwischen dem ersten und 13. Lebensmonat detektiert (Bayer, 1982a, Bayer et al., 1982b). Umgerechnet ergeben diese Zahlen eine Zunahme von etwa 9.000 Zellen in der SVZ und etwa 1.000 Zellen in der SGZ pro Tag. Ohne exakte Quantifizierungsdaten über eine tägliche Neuproduktion an Zellen zu haben, gibt es einige Studien die belegen, dass die Zahl der Zellneubildungen die insgesamt Zellzunahme deutlich übertrifft (Kaplan et al., 1985, Bayer, 1982a, Bayer et al., 1982b). Schlussfolgernd determiniert diese zahlenmäßige Differenz einen Eliminierungsprozess, dessen Grundsatzgedanke die Vermeidung einer Überproduktion an Nervenzellen ist. Diese Eliminierung könnte, wie es bei der Embryonalentwicklung der Fall ist, über apoptotische Signalwege verlaufen. Interaktionen mit reifen Zielzellen sind überlebenswichtig für die Vorläuferzellen, wobei gerade die Integration in das bestehende neuronale Netzwerk über eine korrekte synaptische Verschaltung und die damit einhergehende Konkurrenz um neurotrophe Faktoren eine große Entscheidungsrolle für das Zellüberleben darstellt. Dass neurotrophe Faktoren wie NGF, BDNF, NT-3 und CNTF das Zellüberleben bestimmter (PNS) Neurone fördern, beschreibt der Review von Oppenheim (1991) ausführlich. Grundsätzlich muss beim Zelltod zwischen *Nekrose*, einem pathologischen Prozess (Trump et al., 1965), und *Apoptose*, einem Zelltodprozess unter normalen physiologischen Bedingungen (Kerr et al., 1972), unterschieden werden. Die *Apoptose* agiert über zwei Hauptsignalwege (Hengartner, 2000). Erfolgt die *Apoptose* über den sogenannten mitochondrialen Hauptweg, so ist die apoptotische Induktion Folge einer Reaktion auf extra- oder intrazelluläre Ereignisse wie oxidativer Stress oder Beschädigung der DNA (Rich et al., 2000, Ravagnan et al., 2002). Über die Freisetzung mitochondrialer apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c erfolgt dann eine Aktivierung von *Caspasen*. Zusätzlich zu den beiden oben genannten *Apoptose*-Induktoren wurde in postmitotischen, unreifen neuronalen Populationen eine Form des Zelltods festgestellt, die *Caspase* aktivierungsunabhängig ist (Earshaw et al., 1999, Wang et al., 2000, Review Oppenheim et al., 2001). Schlüsselfunktion hier nimmt *AIF* (Apoptosis-inducing factor), eine mitochondriale Oxidoreduktase ein (Cande et al., 2002, Cregan et al., 2002). Charakteristische apoptotische Merkmale bei diesem Signalweg sind Aggregation des Chromatins sowie nukleäre und cytoplasmatische Kondensation, gefolgt vom Zerfall der Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen, die dann phagozytiert werden. Ein weiteres Charakteristikum biochemischer Natur ist die Degradierung der DNA (Wyllie, 1980). Während der *Apoptose* wird die DNA in 50-200 kb große Fragmente zerlegt, die später internukleosomal gespalten werden. Die so entstandenen Fragmente dienen oftmals als Nachweis (TUNEL) des apoptotischen Zelltods (Gavrieli et al., 1992, Blaschke et al., 1996).

1.9. Die Familie der RAF Kinasen

Die Geschichte ihrer Entdeckung

1983 gelang es Ulf Rapp erstmals durch Klonierung der Oncogen transformierenden Komponente des Maus Sarcoma Virus (3611-MSV) *v-RAF* zu isolieren (Rapp et al., 1983a). Zeitgleich konnte Klaus Bister das Homologe *v-mil* (Sutrave et al., 1984) aus dem Vogel Retrovirus *MH2* identifizieren (Jansen et al., 1983). Die Familie der *RAF* Kinasen besteht bei Wirbeltieren aus drei Genen, die sich in ihrer Expression, Regulation und dem Mitwirken im *RAS-RAF-MEK-ERK* Signalweg unterscheiden (Baccarini, 2005). Ihr gemeinsames Substrat im *RAF-RAF-MEK-ERK* Signalweg ist *MEK*. *RAF* Kinasen sind evolutionär hoch konserviert und werden in Eukaryoten wie *C.elegans* (*lin-45*), *Drosophila melanogaster* (*D-RAF*), *Xenopus laevis*, Huhn, Maus, Ratte und Mensch exprimiert. Alle weiteren Eukaryoten besitzen nur ein *RAF* Homolog, das in seiner Sequenz mehr Übereinstimmungen zu dem in Säugetieren gefundenen *BRAF*, als zu *ARAF* oder *CRAF* aufweist. *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* besitzen kein *RAF* Homologon, auch wenn andere *MEK*-Kinasen bei diesen Spezies gefunden werden. (Mercer et al., 2003). ***CRAF*** oder *RAF-1* wurde 1983 als erstes Kinasemitglied entdeckt (Rapp et al., 1983a, Mark und Rapp, 1984) und ursprünglich als transformierende Komponente des Maus-Retrovirus (MSV 3611) isoliert (Zebisch et al., 2006). Das onkogene *v-RAF* ist jedoch im Vergleich zu *CRAF* aminoterminal verkürzt und trägt eine fusionierte Virussequenz (Rapp et al., 1983b). *CRAF* wird in der Maus ubiquitär exprimiert (Storm et al., 1990), wobei die höchste Expression in der quergestreiften Muskulatur, im Cerebellum und im fötalen Gehirn zu finden ist. Das 3.4 kb große *CRAF* Transkript codiert für ein 74 kD Protein. ***BRAF*** wurde 1988 entdeckt und kommt vorwiegend in neuronalen Geweben, im Hoden und im embryonalen Gewebe vor (Barnier et al., 1995, Wojnowski et al., 2000). Die Anzahl und Größe der *BRAF* Transkripte ist abhängig von dem betrachteten Gewebe und bewegt sich zwischen 2.6 bis 12 kb. *BRAF* gilt als Haupt-Aktivator der *MEK/ERK* Phosphorylierung (Wellbrock et al., 2004) und in *BRAF* defizienten Oligodendrozyten wurde ein schwächeres *p-ERK* Signal zusammen mit einer fehlerhaften Oligodendrozyten Differenzierung gefunden (Galabova-Kovacs et al., 2008). In primären embryonalen Neuronenkulturen übernimmt *BRAF* eine positive Überlebensrolle (Wiese et al., 2001) und das Ausschalten von *BRAF* in den neuronalen Vorläuferzellen führt zu Wachstumsveränderungen, Funktionsstörungen der Hypophyse und vorzeitigem Tod (Galabova-Kovacs et al., 2008). Begleiterscheinungen der Eliminierung von *BRAF* und *CRAF* sind ein stark reduziertes Axonwachstum *in vitro* und kutane terminale Axon-Verzweigungen *in vivo* (Zhong et al., 2007). Bei 20% der humanen Krebserkrankungen wurden *BRAF*-Mutationen gefunden (COSMIC). ***ARAF*** wurde 1986 entdeckt und wird postnatal überwiegend in den urogenitalen Geweben exprimiert (Pritchard et al.,

1996, Luckett et al., 2000). Das 2.6 kb große *ARAF* Transkript codiert für ein 68 kD Protein und ist somit das kleinste Protein dieser Familie.

Signaltransduktion

Die *Serin/Threonin* spezifischen *RAF* Kinasen sind wesentlicher Bestandteil des *RAS-RAF-MEK-ERK* Signalwegs, der an der neuronalen Plastizität durch Regulation von Zellproliferation, Differenzierung, Zellüberleben und Axonwachstum mit beteiligt ist (Hindley und Kolch, 2002). *RAS* und *RAF* sind zudem proto-Oncogene. Der *RAS-RAF-MEK-ERK* Signalweg ist ein sehr komplexer Signaltransduktionsweg, dem mehrere Komponenten angehören. Die Aktivierung der *RAF* Kinasen wird durch eine Vielzahl von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren stimuliert. Dazu gehören u.a. Faktoren wie PDGF, EGF, TGF β , NGF, Insulin, IGF, FGF und CSF-1, die an ihren spezifischen Tyrosin Kinase Rezeptor (RTK) binden. Aber auch Zytokine und Interleukine assoziieren mit Tyrosinkinase. Neben dem EGFR gibt es auch andere Zell-Oberflächenrezeptoren wie Trk A/B, FGFR oder PDGFR, die über *GRB2* diesen Signalweg aktivieren können. Nach Stimulation durch extrazelluläre Liganden, die an spezifische Zelloberflächenrezeptoren binden, erfolgt die Aktivierung der Tyrosin-Kinaseaktivität der cytoplasmatischen Rezeptordomäne durch Phosphorylierung von Tyrosinen, wodurch der Rezeptor die eigentliche Aktivierung erhält. Das „Docking-Protein“ *GRB2* kann jetzt mit seiner SH₂ Domäne an die Phosphotyrosine des aktivierten Rezeptors und gleichzeitig mit seiner SH₃ Domäne an SOS, einen Guanin Nukleotidaustauschfaktor, binden. Durch die Interaktion des *GRB2-SOS* Komplexes mit dem aktivierten (phosphorylierten) Rezeptor wird SOS aktiviert und ermöglicht nun den Austausch von inaktivem *RAS-GDP* zu aktivem *RAS-GTP*, wodurch *RAS* selber aktiviert wird (Baccarini et al., 2005) (Abb.1.12.). Das GTP-gebundene, aktivierte *RAS* fungiert nun als eine Art Adapter, bindet *RAF* mit hoher Affinität und rekrutiert es aus dem Cytosol an die Zellmembran, wo *RAF* schließlich aktiviert wird (Moodie und Wolfman, 1994, Hindley und Kolch, 2002). *RAS* entfaltet *RAF*, wodurch weitere Phosphorylierungen folgen. *RAS* stimuliert zudem *RAF*-aktivierende-Kinasen über die *Rho* Familie der kleinen *GTPasen*. Biochemische Analysen zeigen gemeinsame, wie auch unterschiedliche Funktionsebenen der *RAF* Isoformen. (Erhardt et al., 1995, Galabova-Kovacs et al., 2008, Marais et al., 1997). Da der *RAS-RAF-MEK-ERK* Signalweg auch bei Fehlsteuerungen im menschlichen Organismus, besonders bei Krebs, involviert ist, und bei 15% der humanen Krebserkrankungen Mutationen des *RAF*-Aktivators *RAS* detektiert wurden (Davis et al., 2002, Wan et al., 2004), ist es von großer Bedeutung, die Aktivatoren und Effektoren dieser Signalkaskade in ihrer genauen Wirkungsweise zu erforschen. Ein verändertes *RAS*-Signal wurde auch bei humanen Entwicklungsstörungen wie „*NCFC*“ (*Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous* Syndrom) beobachtet (Review Schubbert et al., 2007). Patienten mit diesem Krankheitsbild zeigen ein retardiertes Wachstum (*LEOPARD* Syndrom) und

Entwicklungsstörungen, die sich bei *NF1* (*Neurofibromatose Typ 1*) und *Noonan* zusätzlich in einer Lernbehinderungen äußern (Review Schubbert et al., 2007). Beim *LEOPARD* Syndrom werden zudem Taubheit, Pigmentveränderungen der Haut und Hypogonadismus diagnostiziert (Review Schubbert et al., 2007). „*RASopathien*“ werden durch Keimbahnmutationen bestimmter Gene verursacht, die für verschiedene Komponenten des *RAS/MAPK* Signalwegs kodieren (Review Tidyman und Rauen, 2009). *Noonan* und *LEOPARD* sind allelische Fehlsteuerungen, die durch verschiedene heterozygote „*missense*“ Mutationen in den selben Genen verursacht werden, zu denen u. a. auch *RAF 1* (*CRAF*) gehört, während bei 75% der Mutations-positiven *CFC* (*Cardio-Facio-Cutaneous*) Patienten heterozygote *BRAF* Mutationen gefunden wurden (Review Tidyman und Rauen, 2009). Dabei betrifft die Mehrzahl der *BRAF* Mutationen die Cystein-reiche Domäne im Exon 6 und die Kinase Domäne. Auch bei der Mehrzahl der *RAF 1* Mutationen ist die *CR2* und *CR3* Region betroffen (Review Tidyman und Rauen, 2009). Primäre Krebserkrankungen des ZNS machen in den USA pro Jahr hingegen weniger als 2% aller neu hinzukommenden gesamten Krebserkrankungen aus. Da es sich in den meisten Fällen jedoch um bösartige Tumore handelt, ist die Todesrate sehr hoch (Kesari und Stiles, 2006, Jackson et al., 2006).

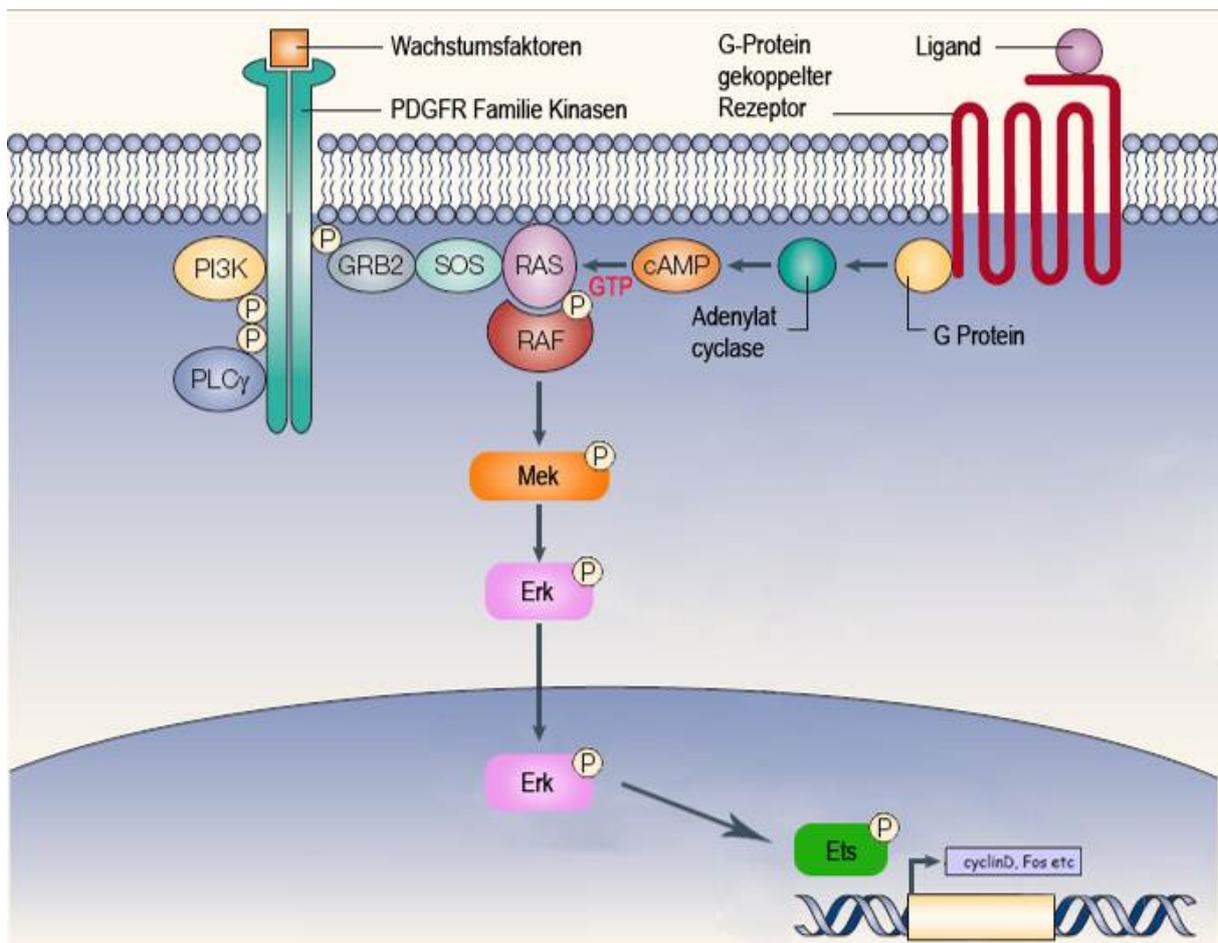


Abb.1.12. Signaltransduktion durch die PDGFR-Familie Kinasen. (verändert nach Dibb et al., 2004).

Aufbau und Struktur

Alle drei *RAF* Kinasen zeigen den gleichen architektonischen Aufbau, der aus drei hoch konservierten Regionen (CR) besteht. Die CR1 Region beinhaltet die *Ras*-Bindedomäne (RBD) und eine Cystein-reiche Domäne (CRD). Die CR2 Region besteht aus vielen Serin-Resten, die an der Negativ-Regulierung der Kinase-Aktivität mit beteiligt sind. Die CR3 Region beinhaltet die Kinase-Domäne, die katalytische Funktionen übernimmt, und hat Serin, Threonin und Thyrosin Reste, die bei der Kinase-Aktivierung involviert sind. Während sich die CR1 Region am N-terminalen Ende befindet, ist die CR3 Region am C-terminalen Ende lokalisiert. Am C-Terminus befinden sich viele Phosphorylierungsstellen, die für die Kinase-Aktivierung essentiell sind. Auch die hoch konservierten Serin und Threonin Reste, die für die Aktivierung von *A-*, *B-*, und *CRAF* notwendig sind und deshalb als „Aktivierungssegment“ bezeichnet werden, befinden sich am C-Terminus in der CR3 Region (Baccarini, 2005). Strukturell unterscheiden sich die *RAF*-Isoformen hauptsächlich am N-terminalen Ende der CR1-Region (Daum et al., 1994). Die CR3 Region ist innerhalb der *RAF*-Familie, wie auch im Vergleich mit anderen Serin/Threonin Kinasen hoch konserviert (Hagemann und Rapp, 1999). Sie besteht im Wesentlichen aus einer ATP-bindenden Region, einer Aktivierungsregion und elf Subdomänen. Einige Phosphorylierungsstellen sind hochkonservierter Bestandteil aller drei Isoformen, was auf gemeinsame Regulationsmechanismen schließen lässt. Andere Phosphorylierungsstellen sind nicht in allen *RAF* Isoformen identisch und kandidieren somit für unabhängige Regulationsmöglichkeiten (Chong et al, 2003).

Funktion

In vitro Studien zeigen, dass alle drei *RAF* Isoformen an aktiviertes, also mit *GTP* beladenes *RAS* binden können (Vojtek et al., 1993, Moodie et al., 1994), während *in vivo* Untersuchungen *CRAF* für die *RAS*-Bindung und somit für die *RAF*-Aktivierung determinieren (Luo et al., 1997). Durch Überexpression der CR1 Domäne wird die normale *CRAF* Funktion gehemmt (Kolch et al., 1991, Bruder et al., 1992). Die Hauptaufgabe des Zinkfingermotivs der CR1 Region ist die Interaktion mit *Ras*. Mutationen von *CRAF*, bei denen das Zinkfingermotiv ausgetauscht wurde, konnten nur minimal durch den Wachstumsfaktor *EGF* aktiviert werden (Luo et al., 1997). Die CR2 Region übernimmt hauptsächlich regulatorische Funktionen. Deletionen (Ishikawa et al., 1988) bzw. Mutationen (Heidecker et al., 1990) in diesem Sequenzbereich gehen mit der onkogenen Aktivierung von *CRAF* einher. Neben der Autophosphorylierungsstelle T268 (Morrison et al., 1993) befindet sich in der CR2 Region der Serin-Rest S259, der für die Aktivierung von *CRAF* (Dhillon et al., 2002b) und die Bindung von 14-3-3 Proteinen eine entscheidende Rolle spielt.

Aktivierung

Der initiale Prozess der *RAF* Aktivierung erfolgt an der RBD durch die Interaktion von aktiviertem GTP-gebundenem *RAS* (Wan et al., 2004). Die sich ebenfalls in der CR1 Region befindende CRD Domäne rekrutiert *RAF* schließlich für die weitere Aktivierung an die Membran (Chong et al., 2003). Die Rolle der Serin/Threonin-reichen CR2 Domäne ist weniger gut erforscht. Es scheint jedoch ein Zusammenhang zwischen der CR2 Phosphorylierung und der Lokalisierung von *RAF* zu bestehen (Chong et al., 2003). Die Deletion der N-terminalen regulatorischen Domäne (CR1 und CR2) führt zu einer konstitutiv aktivierten Form der *RAF* Gene, wie sie auch bei *v-RAF* gefunden wurde (Chong et al., 2003). Mutationen im Bereich der Kinasedomäne resultieren bei *BRAF*, infolge der Deregulation, in einer onkogenen Konversion und bewirken eine Zelltransformation (Stanton und Cooper, 1987, Heidecker et al., 1990, Daum et al., 1994, Schrama et al., 2008).

1.9.1. Funktion der *RAF* Kinasen

Der *MEK/ERK* Signalweg mit seiner Diversität an Substraten, die membranständig, cytosolisch und nukleär sind (Chen et al., 2001), wurde in Überexpressionsstudien als Downstreameffektor von aktiviertem *RAF* genutzt, um die Funktionen dieser Kinase bei der Proliferation, Differenzierung und dem Zellüberleben zu beschreiben (Baccarini, 2005). Um die genaue Funktion jeder Isoform dieses Kinasetriplets zu bestimmen, benutzte man verschiedene *RAF*-defiziente Maussysteme. Dabei zeigte sich, dass die Letalität entscheidend vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängt. Während *ARAF* die schwächste spezifische *MEK*-Aktivität besitzt (Prichard et al., 1995, Wu et al., 1996) und transformierende Geneigenschaften zeigt, wenn es beispielsweise durch Überexpression aktiviert in die mitogene Kaskade eingreift (Huleihel et al., 1986, Troppmair et al., 1994), können neuere Arbeiten eine spezialisierte Funktion von *ARAF* beim *ARF6* regulierten endocytotischen Membrantransport aufzeigen (Nekhoroshkova et al., 2009). ***ARAF***-defiziente Tiere erreichen im C57Bl/6 Inzucht-Hintergrund postnatale Entwicklungsstadien bis zum Zeitpunkt P21. Diese Tiere sind phänotypisch auffällig und durch ihre signifikant reduzierte Körpergröße und das verminderte Körpergewicht von ihren Geschwistertieren gut zu unterscheiden. Ein zusätzliches Charakteristikum ist ihr abnormales Verhalten, insbesondere in der Bewegungsmotorik (Ataxie), das mitunter in einem *Epilepsie*-ähnlichen Phänotyp resultieren kann. Zusätzlich zu den neurologischen Störungen haben diese Tiere auch gastrointestinale Defekte wie ein Megacolon (Chen et al., 2001). Im Gegensatz zu den C57Bl/6 Mäusen erreichen 50% der *ARAF*-defizienten Tiere im 129/OLA Hintergrund adulte Entwicklungsstufen und zeigen nur einige neurologische Defekte (Pritchard et al., 1996). ***BRAF***-defiziente Mäuse sterben bereits im Uterus während der embryonalen Entwicklungsstufe E10.5-E12.5. Todesursache sind vaskuläre Defekte, verursacht durch

den massiven Zelltod differenzierter Endothelzellen. Weiterhin können neurologische Abnormalitäten des Neuroepithels gezeigt werden (Wojnowski et al., 1997). Während *in vitro* Studien zeigen, dass für das Überleben embryonaler motorischer und sensorischer Neurone *BRAF*, im Gegensatz zu *CRAF*, essentiell notwendig ist und *BRAF*-defiziente Neurone auch in Gegenwart von neurotrophen Faktoren nicht überleben können, kann kein signifikanter Unterschied in der Gesamtzahl der Motoneurone bzw. der sensorischen Neurone zwischen *BRAF*-defizienten Tieren und wildtypischen Kontrolltieren festgestellt werden (Wiese et al., 2001). Dieses Experiment zeigt, dass *BRAF* und *CRAF* in primären Neuronenkulturen nicht die gleiche Funktion ausüben und demonstriert zudem die essentielle *BRAF*-spezifische Überlebensmediation für sensorische und Motoneurone während der Entwicklung (Wiese et al., 2001). Für den konditionellen Knockout von *BRAF* in den postnatalen exzitatorischen Neuronen des Großhirns nutzen Chen et al. (2006) das *Cre-LoxP* System unter dem *αCamKII* Promotor. Dieser Promotor ist erst postnatal aktiv und so können Chen et al. (2006) durch das Floxen von Exon 12, dem ersten Exon, das für die *BRAF* Kinase Domäne kodiert, eine spezifische postnatale *BRAF* Nullmutation in den exzitatorischen Neuronen des Großhirns erzeugen. Die Deletion von Exon 12 führt zu einer Rasterverschiebung des offenen Leserahmens und erzeugt so die *BRAF* Nullmutation. Die *BRAF* *ko* Mäuse exprimieren kein *BRAF* Protein mehr (Chen et al., 2006). Sie zeigen Defizite in der ERK-Aktivierung und im Hippocampus bei der Lang-Zeit Potenzierung. Außerdem werden Beeinträchtigungen im Hippocampus-abhängigen Lernen (L&M) gefunden. Das räumliche Lernen und das kontextbezogene Lernen ist von der *BRAF* Nullmutation nicht betroffen (Chen et al., 2006). Galabova-Kovacs et al. (2008) beobachten an *NestinCre braf^{ff}* Mäusen Wachstumsveränderungen ab dem postnatalen Entwicklungszeitpunkt P10. Diese Tiere zeigen ab dem Tag P15 Koordinationsstörungen, Tremor, Ataxie und Muskelschwäche und haben ab dem Tag P18 Probleme beim Laufen und letztlich auch beim Atmen. Die Tiere sterben noch vor dem Eintritt in die adulte Lebensphase. Histologische Analysen zeigen zudem eine veränderte Molekularschicht im Kortex, sowie ZNS Dysmyelinisierungen ab dem Tag P18 und Defekte bei der Oligodendrocyten-Reifung. Diese Veränderungen könnten auf ein schwächeres *ERK* Signal zurückgehen, dass durch die Deletion von *BRAF* in den neuronalen Vorläuferzellen verursacht wird (Galabova-Kovacs et al., 2008). Galabova et al. (2008) nutzen das *Cre-LoxP* System unter dem *Nestin* Promotor, wodurch *BRAF* in den neuronalen Vorläuferzellen des ZNS, aus dem Neuronen und Gliazellen hervorgehen, ab dem Embryonalstadium E11.5 deletiert wird. Zhong et al. (2007) flankieren das Exon 3 von *BRAF* mit *loxP* Stellen, um funktionell wichtigen Domänen wie die RBD, die CRD und die Kinase Domäne nach der Exon-3 Deletion durch Einfügen eines Translationsstopcodons an Position 132 zu inhibieren. *BRAF^{exon3-/-}* Mausembryonen sterben wie die konventionellen *BRAF* Knockouttiere um den embryonalen Entwicklungszeitpunkt E13 und zeigen deutliche

Wachstumsverzögerungen (Zhong et al., 2007). DRG (Dorsal Root Ganglion) Neurone von E12.5 *BRAF* Null-Embryonen haben nach fünf Tagen in Kultur mit dem Wachstumsfaktor NGF einen 90%igen Verlust an Zellen, während in heterozygoten Kontrollkulturen nur 19% der Zellen verloren gehen (Zhong et al., 2007). Western Blot Analysen zeigen zu diesem Zeitpunkt keine *TrkA* Proteinexpression bei *BRAF*^{-/-} DRGs, während der *pERK2* und *p75* Neurotrophin Rezeptor Level unverändert ist. Der Transkriptionsfaktor *Islet-1*, der als Marker für postmitotische DRGs dient, fehlt in *BRAF* Null DRGs (Zhong et al., 2007). Durch Einkreuzen von *braf*^{ff} mit *NestinCre braf*^{+/-} Mäusen können *Braf*^{f/-} *nesCre*⁺ Tiere generiert werden. *Braf*^{f/-} *nesCre*⁺ Mäuse werden unauffällig geboren und zeigen ab dem Zeitpunkt P12-P14 durch eine Fehlregulation der Wachstumshormonausschüttung ein stark reduziertes Wachstum. Schließlich sterben die Tiere in der dritten Lebenswoche. *Exon 3* deletierten *Braf*^{f/-} *nesCre*⁺ Tiere sind hyperaktiv, im Gegensatz zu *Raf1*^{f/-} *nesCre*⁺ Tieren, die keine phänotypischen Auffälligkeiten haben (Zhong et al., 2007). Western Blot Analysen adulter DRG Neurone von *Braf*^{f/-} *nesCre*⁺ Tieren zeigen nur eine geringe Veränderung der *TrkA* Expression, während die *Ret* Expression stark verringert ist (Zhong et al., 2007).

Die Deletion von *BRAF* und *CRAF* in *Braf*^{f/-} *Raf1*^{f/-} *nesCre*⁺ Mäusen ergibt doppelknockout Tiere, die bis zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E13 lebend detektiert werden können. Während die *ERK1/2* Phosphorylierung bei diesen Doppelknockouts im Rückenmark, DRGs und Neokortex signifikant reduziert ist, konnte nur eine geringe *pMEK* Reduzierung in den DRGs detektiert werden. Dissoziierte DRG Neurone von E13 doppelknockout Tieren zeigen nach fünf Tagen in Kultur mit dem Wachstumsfaktor NGF ein beeinträchtigt Axonwachstum und können nach bis zu sechs Tagen in Kultur lebend detektiert werden (Zhong et al., 2007). DRG Neurone von postnatalen *Braf*^{f/-} *Raf1*^{f/+} *nesCre*⁺ Mäusen zeigen *in vitro* Differenzierungs- und Reifungsunterschiede. *In vivo* werden bei diesen hemizygoten DRGs Veränderungen in der axonalen Projektionen Parvalbumin positiver Neurone zum ventralen Horn am Tag P1 gefunden (Zhong et al., 2007 Abb.6C). Um die frühe embryonale Letalität zu überwinden und mehr über die molekularen Mechanismen von *BRAF* beim Zellüberleben zu erfahren, wurden transgene Mäuse generiert, bei denen *ARAF* in den *BRAF* Locus integriert wurde (*BRAF*^{kin/kin}) und so anstelle von *BRAF* unter dem *BRAF* Promotor exprimiert wird. *BRAF*^{kin/kin} Tiere erreichen ein Lebensalter von bis zu acht Wochen postnatal und zeigen keine endotheliale oder neuronale Apoptose durch den Verlust von *BRAF* (Camarero et al., 2006). *In vitro* Überlebensexperimente von Motoneuronen aus E12.5 Tage alten Mäusembryonen mit neurotrophen Faktoren zeigen eine Kompensation von *BRAF* durch *ARAF* hinsichtlich des neuronalen Überlebens. Durch Zellmarkierungsexperimente (BrdU) und Immunfärbungen können zudem Migrationsveränderungen und Differenzierungsstörungen bei Pyramidenneurone im embryonalen Kortex gezeigt werden. Quantitative

immunhistologische Analysen P19 Tage alter *BRAF*^{kin/kin} Mäuse zeigen eine Reduktion an *Brn-2* positiven Pyramidenzellen (*Brn-2* POU-Homeodomänenprotein) in den kortikalen Schichten 2 und 3 (Camarero et al., 2006). *In vitro* Analysen kortikaler embryonaler Neurone bestätigen den histologischen Befund der Migrationsstörung und zeigen zusätzlich sogenannte „Stummelaxone“ in Abwesenheit von *BRAF* (Camarero et al., 2006).

Im humanen Krankheitsbild sind kortikale Störungen oftmals Ursache schwerwiegender Behinderungen wie beispielsweise bei der *mentalen Retardierung*, *Epilepsie*, Lähmung oder beim Erblinden (Ross und Walsh, 2001). Bei Patienten mit *Lissencephalie*- oder *Heterotypie*-Syndrom können bislang Mutationen in den vier Genen *Lis 1* (Reiner et al., 1993), *DCX* (Gleeson et al., 1998, des Portes et al., 1998), *Reelin* (Hong et al., 2000) und *Arx* (Stromme et al., 2002, Kitamura et al., 2002) gefunden werden, die für den charakteristischen Phänotyp des Krankheitsbildes verantwortlich sind. **CRAF**-defiziente Mäuse sterben häufig schon embryonal aufgrund schwerwiegender Defekte in der Organentwicklung (Mikula et al., 2001, Wojnowski et al., 1998). Wojnowski et al. (1998), die das *CRAF* Gen durch Einbau eines *neo^r* Gens in Exon 2, in dem die Translationsinitiierungsstelle sitzt zerstörten, erhalten *Craf-1^{neo2}* Mutanten, die ein geringes Level (15% von wild-typischem *Craf-1*) an einem N-terminal verkürzten 62 kDa Protein exprimieren. Die Tiere sterben im 129/C57B6 Inzuchtstamm zum Zeitpunkt E12.5 und zeigen schwerwiegende plazentale Defekte (Hüser et al., 2001 (Fig. 2), Wojnowski et al., 1998), während *CRAF*-defiziente Tiere im CD1 Auszuchtstamm mit Auffälligkeiten im epithelialen Gewebe, der Lunge, der Augenlider und der Haut geboren werden (Wojnowski et al., 1998). Diese *Craf-1^{neo2/neo2}* transgenen Tiere sterben bereits kurz nach ihrer Geburt oder werden kanibalisiert. *Craf-1*-defiziente E19.5 Embryonen zeigen zwar normale Atemreflexe, haben aber eine insuffiziente Lungenfunktion (Wojnowski et al., 1998). *CRAF*-defiziente Lungen sind nicht nur kleiner, sondern auch hypoplastisch. Betroffen von dieser Unterentwicklung sind hauptsächlich die Parenchymzellen der Alveolen (Wojnowski et al., 1998). Bei *in vitro* Studien an *CRAF*-defizienten Fibroblasten wird ein verringertes Wachstum und eine reduzierte Proliferationsrate beobachtet (Wojnowski et al., 1998). Phänotypische Auffälligkeiten der *CRAF*-defizienten Tiere wie Haut-, Lungen- und Augenliddefekte (**EOB**, **eye open at birth** (Shimizu et al., 2005)) und eine generelle Wachstumsverzögerung zeigen sich auch bei Tieren mit einer Mutation im *EGF*-Rezeptor (*EGFR*) (Miettinen et al., 1995, Sibilias und Wagner, 1995, Threadgill et al., 1995, Zenz et al., 2003). **Doppelknockout Mutanten** von ***BRAF*** und ***CRAF*** entwickeln sich bis zum Blastozystenstadium (4-5 Tage nach der Eizellbefruchtung, Thomson et al., 1998) normal, sterben dann aber bereits während der frühen embryonalen Entwicklung (Wojnowski et al., 2000). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass zu frühen Entwicklungszeitpunkten gemeinsame Funktionen von *BRAF* und *CRAF* ausgeübt werden, die beim Fehlen einer Kinase bis zu gewissen

embryonalen Entwicklungszeitpunkten kompensiert werden können (Zhong et al., 2007). **CRAF^{-/-}BRAF^{-/-}-Doppelnulmutanten**, die in Form kleiner Zellklumpen von 0,5mm Durchmesser nach *Mendel* das Entwicklungsstadium E8.5 erreichen, zeigen proliferierende Zellen mit einem verlängertem Zellzyklus (16-20h statt 15-18h) (Hogan et al., 1986, Takahashi et al., 1993) und einer fehlenden Differenzierung (Wojnowski et al., 2000).

1.9.2. Funktionen auf andere Mitglieder der mitogenen Kaskade

Nicht-Säugetiere wie *C.elegans*, *Drosophila* und *Xenopus* haben nur ein *MEK*-Gen, während Säugetiere über zwei *MEK*-Gene verfügen (*MEK 1* & *MEK 2*). *MEK-1*-Nullmutante sind rezessiv letal und sterben aufgrund plazentaler Fehlentwicklungen bereits zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E10.5 (Giroux et al., 1999). Bei diesen Knockout Embryonen wurde *in vivo* eine reduzierte Vaskularisierung der Plazenta beobachtet, bei der die Endothelzellen nicht in die Labyrinthschicht einwandern können. Zell-Migrationsassays mit *mek1^{-/-}* MEFs (embryonale Fibroblasten der Maus) zeigten keine Migrationsinduktion nach Fibronectin-Applikation. Die *MEK2* und *ERK* Proteinexpression verbleibt unverändert. Die beobachteten Defekte in der Zelladhäsion könnten dabei durch die plazentale Fehlentwicklung und die dadurch hervorgerufene embryonale Letalität der durch Insertionsmutagenese mutierten Mauslinie hervorgerufen werden (Giroux et al., 1999). Vergleicht man die Bindungsaffinität von allen drei *RAF*-Kinasen zu *MEK*, so zeigt *BRAF* die höchste Affinität (Papin et al., 1996). Während die Wachstumsfaktor-stimulierte *ERK* Aktivierung in Abwesenheit von *BRAF* reduziert ist, kann kein Unterschied bei *ARAF* oder *CRAF* defizienten Zellen detektiert werden (Wojnowski et al., 2000, Pritchard et al., 2004, Hüser et al., 2001, Mikula et al., 2001, Mercer et al., 2002, Galabova-Kovacs et al., 2008). Deshalb ist das Säugetier-*BRAF* dem *RAF* von nicht-Säugetieren am ähnlichsten.

Im *RAS-RAF-MEK-ERK* Signalweg ist das einzige Substrat von *BRAF* *MEK*. Mutiertes *BRAF* aus humanem Tumorgewebe, das *in vitro* seine Fähigkeit verloren hat *MEK* zu phosphorylieren, kann dennoch *in vivo* aktivierend auf die *MEK-ERK* Signalkaskade über seinen Interaktionspartner *CRAF* einwirken (Wan et al., 2004, Galabova-Kovacs et al., 2008). Die *MEK*-Kinaseaktivität von *CRAF* ist keine lebensnotwendige Funktion für das Protein beim Überleben. Der autoinhibitorische N-Terminus von *CRAF*, der beim retroviralen Onkogen fehlt, dient dabei als negativ-Regulator zweier weiterer Kinasen. Eine davon wirkt pro-apoptotisch (*MST2*), die andere kontrolliert Zellform und Zellmotilität (*ROCK II*) (Baccarini, 2005).

1.10. Eigene Fragestellung

Bisherige Studien beschreiben eine maximale Lebenserwartung *CRAF*-defizienter Mäuse (*CRAF*^{-/-}) im CD1/MF1 Auszuchtstamm um den Zeitpunkt der Geburt. Uns ist es erstmals gelungen, die frühe postnatale Letalität zu überwinden und *CRAF*-defiziente Tiere lebend bis zu frühen adulten Entwicklungsstufen zu bekommen. Aktuelle Knockout-Studien von *ARAF* und *BRAF* zeigen, dass Tiere, denen eine dieser *RAF* Kinasen fehlte, adulte Entwicklungsstadien nicht erreichen, und so konnten sich diese Studien ausschließlich mit der Rolle von *RAF*-Genen bei der embryonalen Neurogenese befassen. In einer Verhaltensstudie an *CRAF* heterozygoten (*CRAF*^{+/-}) und wildtypischen (*CRAF*^{+/+}) Kontrolltieren wurden bereits Unterschiede im Angst- (elevated *plus maze*-, *black box*, *open field Test*) und Lernverhalten (Labyrinth) gezeigt (nicht publizierte Daten). Basierend auf diesen Ergebnissen soll die Rolle der *RAF* Kinase *CRAF* bei der postnatalen und adulten Neurogenese im Hippocampus genauer untersucht werden. Erste histologische Analysen zeigen atypische Zellkluster dunkel gefärbter Zellen in der H&E und Nissl Immunfärbung bei postnatalen *CRAF*-defizienten Tieren, die vorwiegend in der SGZ des hippocampalen DG lokalisiert sind. In der Literatur werden diese „Zellkluster“ dunkel gefärbter Zellen häufig in Verbindung mit proliferierenden Vorläuferzellen gebracht (Palmer et al., 2000) und aus diesem Grund wollten wir der Frage nachkommen, ob es sich auch bei diesen „Zellklustern“ um proliferierende Zellen handelt. Über eine BrdU-Applikation werden proliferierende Vorläuferzellen zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungszeitpunkten markiert und anschließend immunhistologisch analysiert. In Verbindung mit Differenzierungs- und Reifungsmarkern kann so das Schicksal der BrdU-markierten Zellen bestimmt werden. Hierbei soll Aufschluss über die Rolle der *RAF* Kinase *CRAF* bei der postnatalen und frühen adulten Entwicklung im Bezug auf die Neurogenese im Hippocampus erzielt werden. Über Western Blot Analysen kann zudem der *RAF* Signalweg bei *CRAF*-defizienten Tieren molekularbiologisch betrachtet werden. Zentrale Frage dieser Arbeit ist dabei die *RAF*-vermittelte Zellschicksalsdeterminierung, die neue Erkenntnisse zu der *in vivo* Situation geben soll, in der keine *CRAF*-defizienten Tiere nach dem postnatalen Entwicklungszeitpunkt P60 detektiert werden können.

2. Material und Methoden

Die beschriebenen Methoden entsprechen den aktuellen Standards der Molekularbiologie.

2.1. Material

2.1.1. Instrumente und Geräte

<i>Instrumente und Geräte</i>	<i>Firma</i>
Ausgießstation für Paraffinierung: Leica EG 1140H	Leica
Cryotom Leica CM 1900	Leica
Einbettautomat EG1140H	Leica
Elektrophorese Netzgerät EPS301	GE
Entwicklermaschine	Agfa
Heizblock Typ QBD2	Grant
Horizontale Gelelektrophoresekammer	BIO RAD
WIDE MINI-SUB® CELL GT	
Inkubationsofen (Paraffinierung)	memmert
Inkubationsofen Techne Hybridiser HB-1D	thermo DUX
Magnetrührer IKAMAG Reo	IKA-Labort
<i>Mikroskope und Zubehör</i>	
Leica AS LMD Laser Microdissection System Version 4.0	Leica
Leica Stereomikroskop MZ6	Leica
Kamera Leica Mikrosystem Typ DFC320 12V / 400mA	Leica
Keyence BZ-8000 All-in-one Type Fluorescence Mikroskop	Keyence
Lichtquelle Leica KL1500 electronic	Leica
Stereomikroskop DF PLAN 15x	Olympus
Zeiss Axioskop, Aufrechtmikroskop	Zeiss
Mikrotom (Paraffinschnitte) Leica RM2155	Leica
Mini Trans Blot, Blot-Kammer	BIO-RAD
Neubauer Zählkammer improved CE	Marienfeld
PerfectBlue "Semi-Dry" Blotter #52-1010	Peqlab
pH Meter pH525 WTW	Heinse+Ziller
Photometer Eppendorf BioPhotometers #No 6131 01023 RS232C	Eppendorf
Ultra TURRAX® T25 basic Homogenisierer	IKA®WERKE
Vakuum-Gewebe-Infiltrationsautomat ASP20U	Leica
Vortexer Vortex-2 Genie	Scientific Ind.
Wasserbad (Mikrotom) WB 6P3	Vogel
Wasserbad Typ WB 10 SN693519 230V 50HZ 300VA	P-D, IG
Western Blot Blotapparatur	BIO-RAD
Shaker Polymax 1040	Heidolph
Skalpell steril SK11	A. Hartenstein
Thermocycler (Mastercycler) Eppendorf #No. 5333 43784	Eppendorf

Zellkulturbrutschrank Function line #51008331	Heraeus
2.1.2. Sonstiges	
Aufbewahrungssystem für Eppendorf-Reaktionsgefäße #95.64.997	Sarstedt
Amersham <i>Hyperfilm</i> TM MP 18x24 cm #28906844	GE Healthcare
Blotting Papier #GB46 460x570mm, 190g/m ²	A. Hartenstein
Deckgläser „ <i>Microscope Cover Glasses</i> “ 12 mm #0111520 (#DKR1)	A. Hartenstein
Einbettkassetten, Histosette M490-10	Simport
Filter #FP30/0.2 CA-S	Schleicher & Schuell
Filter-Spitzen 100-1000µl #FA20	A. Hartenstein
Filter-Spitzen 100-1000µl #FB20 (im Rack)	A. Hartenstein
Filter-Spitzen 100-1000µl #70.762.211	Sarstedt
Filter-Spitzen 10-200µl #70.760.212	Sarstedt
Filter-Spitzen 0.1-10µl #70.760.213	Sarstedt
Gewebekulturschale 35,0/10MM, viergeteilt #627170	Greiner
Glas Deckgläser 24x60mm, #DK60	A.Hartenstein
Glas Objektträger Superfrost [®] plus #H867.1	Roth
Greiner Röhrchen 15 ml #188271	Scheller
Greiner Röhrchen 50 ml #227261	Scheller
Hamilton [®] Pipette #702	A. Hartenstein
Injektionsspritze Plastipak TM 1 ml #300015	BD
Injektionsspritze Injekt [®] 10 ml #4606108V	Braun
Nitrocellulose Transfer Membran PROTRAN [®] Whatman [®] BA85#NC04	A. Hartenstein
Objektträgerbox #K10B	A. Hartenstein
Parafilm #PF10	A. Hartenstein
Perfusionsbesteck mit Flügeln Valu-Set TM 0.8x20mm REF#387455	BD
Petrischale 145/20MM	Greiner
Präparatenkasten für Objektträger #He.2704/2	Scheller
Präparatenkasten für Objektträger #He.2704/3	Scheller
Reaktionsgefäß 8.0 ml #PR08 (coronale OCT-Einbettung/ Mausgehirne)	A. Hartenstein
Reaktionsgefäß 0.5 ml #RK05	A. Hartenstein
Reaktionsgefäß 13.0 ml #62.515.006	Sarstedt
Reaktionsgefäß 5.0 ml #55.526.006	Sarstedt
Reaktionsgefäß 2.0 ml #62.554.502	Sarstedt
Reaktionsgefäß 1.5 ml #72.690	Sarstedt
Reaktionsgefäß 0.5 ml #72.699	Sarstedt
Roti [®] - Plast #6642.6 Paraffin- Pastillen	Roth
Serologische Pipette 5ml #86.1253.001	Sarstedt
Serologische Pipette 10ml #86.1254.001	Sarstedt
Skalpellklingen CE #0047	BAYHA [®]

Sterilfilter Minisart® 0,2µm #17597 LOT 17597 080460	Sartoriusstedim biot.
Sterilfilter 0.2µm #FP30/0,2CA-S LOT BZ0321-2	Schleicher & Schuell
Thermo-Strip 0.2 ml #AB-0266 PCR Stripes 8 Tubes&Caps	Thermo Scientific
Tissue-Tek® #4557 Cryomold® Standard 25x20x5mm	Sakura, USA
Tissue-Tek® MEGA-CASSETTE® #4173	Sakura, USA
Tissue-Tek® O.C.T™	A. Hartenstein
Komponente beinhaltet Polyvinylalcohol < 11%, Carbowax < 5% # TTEK	
Transwell® Zellkulturplatte #3421	Corning Incorporated
Zellkulturplatte 60x15mm #83.1801.002	Sarstedt
Zellkulturplatte 100x20mm #83.1802	Sarstedt
Zellkulturplatte 24-Well #83.1836.500	Sarstedt
2.1.3. Chemikalien	
Acrylamid 4K (30%) #A1672,0500	AppliChem
Agarose NEE0 Ultra Qualität, #2267.4	Roth
Amidoschwarz C ₂₂ H ₁₄ N ₆ Na ₂ O ₉ S ₂ #1.01167.0025	Merck
Aquaclean #CAC1	A. Hartenstein
APS- Ammoniumperoxydisulfat H ₈ N ₂ O ₈ S ₂ >98% #RT 09915	Fluka
BARRICIDAL® 36 #5ZKA0010	BIOHIT
Borsäure BH ₃ O ₃ , A1097, M = 61,83 g/mol #CB60	A. Hartenstein
Borsäure H ₃ BO ₃ > 99.8% pa M = 61.83 g/mol #6943.1	Roth
5-BROMO-2'-DEOXYURIDINE SIGMA ULTRA (Injektion) #B9285-1G	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau C ₁₉ H ₉ Br ₄ O ₅ Sna #B-6131 LOT116H365	Sigma-Aldrich
Zitronensäure-Monohydrat C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O #A1350,1000	AppliChem
Zitronensäure C ₆ H ₈ O ₇ H ₂ O #5110 M = 210,14 g/mol	Roth
Chloroform CHCl ₃ #2445	Merck
Chloralhydrat C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂ #K3181	Roth
Cresyl Fast Violet #C1791-5G Cresyl violet acetate	Sigma-Aldrich
Chromalaun	A. Hartenstein
DAB 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride #D5905	Sigma-Aldrich
DEPC, Diethylpyrocarbonat (162,14), #KO28.2	Roth
Desoxycholsäure Natriumsalz 25g	Fluka
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat mind.99,5% p.a. #4984.1	Roth
1,4-Dithioerythrid #1.24511.0005	Merck
DNase I, Deoxyribonuclease I #EN0521	Fermentas
DNase I #11284932001	Roche
DTE 1,4- Dithioerythriol	Merck
DTE 1,4- Dithioerythrit > 99%, p.a. C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	Roth
EDTA, Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat ≥99 %, p.a., C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2 H ₂ O, M 372,24 g/mol, #8043	Roth
EDU 5-ethynyl-2'-deoxyuridine #A10044	invitrogen
Entellan #1.07960.0500	Merck

Eosin B (blau) (Wasser und Alkohol löslich) $C_{20}H_6Br_2N_2Na_2O_9$	Chroma-
	Gesellschaft Schmidt&Co
Essigsäure > 99,7% pa CH_3COOH M = 60,05 g/mol D~1,05 #3738.3	Roth
Ethanol absolut #A3678,2500	AppliChem
Ethidiumbromidlösung 1%, #2218.2	Roth
Gallocyanin 7-Dimethylamino-4-hydroxy-3-oxo-phenoxazine-1-carboxyl-säure $C_{15}H_{13}ClN_2O_5$, #124508-10G	Sigma-Aldrich
Glycerin $C_3H_8O_3$ #3783.1 ROTIPURAN®	Roth
Glycerin wasserfrei 3783.1	Roth
Glycerol 1,2,3-Propantriol, Glycerin $HOCH_2CH(OH)CH_2OH$, #G5516	Sigma-Aldrich
Glycerophosphat	Sigma-Aldrich
Glycin >99% pa $C_2H_5NO_2$ M = 75,07 g/mol #3908.3	Roth
Hämatoxylin (dunkel)	Chroma
Hefeextrakt #2363.3	Life Tec.
Histofluid	Marienfeld
Isopropanol zur Analyse 2-Propanol C_3H_8O M060, 10g/mol #A0900,2500PE	AppliChem
Isopropanol 2-Propanol >99,7% #6752.4	Roth
Kaliumalaun #P724.1	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 #A3620.1000	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (M = 136,09 g/mol) #1.12034.1000	Merck
Kaliumchlorid KCl #A3582.1000 LOT8Q007037	AppliChem
Kaliumchlorid KCl >99,5% (M = 74,56 g/mol) #6781.3	Roth
Magermilchpulver #A0830,1000	AppliChem
Magnesiumchlorid, 1M, $MgCl_2$, #A3888,0500	AppliChem
2 Mercaptoethanol (2-Hydroxy-ethylmercaptan)	Sigma-Aldrich
β -Mercaptoethanol $C_2H_6O_5$ >99% #M-7522	
Methanol p.A. #A 0688,2500PE	AppliChem
Mowiol® 4-88	Calbiochem
Mowiol-4-88 dünnflüssig #67760 500g	Kremer Pigmente
Natriumchlorid p.a. #3957.2	Roth
Natriumchlorid (für Molekularbiologie) #A2942.1000	AppliChem
Natriumhydroxid NaOH 99% pa M = 40.01 g/mol #6771.2	Roth
Natriumhydroxyd Plätzchen A1551,1000 #CN40 LOT6M001703	A. Hartenstein
Natriumjodat $NaJO_3$	Merck
Natriumpyrophosphat #S6422	Sigma-Aldrich
Nissl, <i>Cresyl Fast Violet acetate</i> #C1791-5G 125K3707	Sigma-Aldrich
<i>Normal Donkey Serum</i> #S30-100ml LOT 0609039840	Chemicon
<i>Normal Goat Serum</i> #S-1000 LOT Q1130	Vector
<i>Normal Rabbit Serum</i> #S20	Chemicon
NP-40, Nonidet® P40 Substitute, >99% #74385	Fluka BioChem.
n-Propylgallat reinst #A5338.0100	AppliChem

PBS-Puffer #A09649100	AppliChem
Pentylentetrazole #P650-25G	Sigma- Aldrich
Pepton #8986.1	Roth
PFA, Paraformaldehyde #P6148-1KG	Sigma-Aldrich
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablette #04906845001	Roche
Picrotoxin (Cocculin) #P1675-1G C ₃₀ H ₃₄ O ₁₃	Sigma-Aldrich
Potassium Ferrocyanide K ₄ Fe(CN) ₆ 3H ₂ O, >99% FW=422.4 g/mol, #P-9387	Sigma-Aldrich
Potassium Ferricyanide K ₃ Fe(CN) ₆ , ~99% FW = 329.2g/mol #P-8131	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor Cocktail #20-201	Chemicon
Protease Inhibitor Cocktail Tablette #04693124001	Roche
Proteinase K aus Pilzen #7528.2	Roth
Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich
PVP-40 Polyvinylpyrrolidon (K30) M=40.000g/mol #A2259,0500	AppliChem
Rnase AWAY® #7005, 4 Liter	Molec. BioProd.
Salzsäure 37% p.a ACS,ISO, HCl M = 36,46g/mol D~1.19 #4625.2	Roth
Sodium Phosphate NaH ₂ PO ₄ , Monobasic, Anhydrous >98% #S-3139, FW = 120g/mol	Sigma-Aldrich
Sodium Phosphate Na ₂ HPO ₄ , Dibasic, Anhydrous #S-3264 MW = 142g/mol	Sigma-Aldrich
Sucrose #A1125,5000 D(+) Saccharose	AppliChem
SDS #2326.2	Roth
SDS Natriumlaurylsulfat > 99% C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S M=288.4g/mol, #4360.2	Roth
TEMED p.a. C ₆ H ₁₆ N ₂ #2367.3	Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ (2 H ₂ O) M = 294,1 g/mol >99%pa ,ACS #3580.1	Roth
Tris Puffer Ultra Pure > 99.9% Tris (hydroxymethyl)-aminomethan C ₄ H ₁₁ NO ₃ M = 121,14g/mol, #5429.2	Roth
Tween®-20 A1389 #9127.1	AppliChem
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 30% #A1134,0500	AppliChem
Xylol purum #9713.4	Roth

2.1.4. Betäubungsmittel

Ketanest ® S 25 mg/ml Wirkstoff Esketaminhydrochlorid „dissoziative Anästhesie“, d.h. Erzeugung von Schlaf und Schmerzfreiheit unter weitgehender Erhaltung der Reflextätigkeit.	Pfizer
Rompun ® 2% Wirkstoff Xylazin (Xylazinhydrochlorid) Muskelrelaxans, Sedativum, Analgetikum, Anästhetikum	Bayer

2.1.5. Enzyme und Puffer

Bio Therm DNA- Polymerase #GC-002.1000	Gene Craft®
10x Bio Therm Puffer, 15mM MgCl ₂ #GC-002-006	Gene Craft®
DNase I., Deoxyribonuclease I #EN0521	Fermentas
DNase I #11284932001	Roche
dNTP Mix, 2 mM #R0242	Fermentas

2.1.6. Kits

ABC-Kit Vectastain® #PK-6104 Rat IgG	Linaris
ABC-Kit Vectastain® #PK-6100	Linaris
BCA™ Protein Assay Kit Pod # 23277 Lot IG115185	Thermo Sci
ECL™ Western Blot Detektions Reagenz und Analyse System #RPN2106	GE
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System #TB235	Promega

2.1.7. Oligonukleotide

CRAF ko englisch (CRAF ko engl.)

Name	Sequenz	Firma
CRAFKO A (4)	5`-aca gaa agt gct gca gtg a - 3`	Biomers. net
CRAFKO B	5`-att gat ttg att gcc agg tat gat - 3`	Biomers. net
CRAFKO C	5`-tgc gtg aa tcc at ttg ttc aa - 3`	Biomers. net

Tab.2.1. Primersequenzen CRAF ko englisch CD1. Durch die Primerkombination CRAFKO A und CRAFKO C wird eine 450bp große Bande amplifiziert, die das Knockout-Allel definiert. Über die Primerkombination CRAFKO A und CRAFKO B wird eine 335bp große Bande amplifiziert. Sie bestimmt das wildtypische Allel. Werden beide Allele in einem Tier gefunden, so ist es heterozygot (+/-). Beim Vorhandensein eines Allels in Abwesenheit des anderen spricht man von homozygoten Tieren, die entweder wildtypisch (++) oder knockout (-/-) sein können.

SPC CRAF

Name	Sequenz	Firma
SPC S1	5`-gag gag agg aga gca tag cag -3`	Biomers. net
CRAF 2-3	5`-cca cag ttc ttt gct tgt tcg gc -3`	Biomers. net

Tab.2.2. Primersequenzen SPC CRAF. Konzentration: c=100pmol/µl, Lagerung bei -20°C.

2.1.8. Versuchstiere

Mauslinien

Mauslinie	Hersteller
CRAF ko engl. CD1	Catrin Pritchard, UK
CD1	Harlan Winkelmann GmbH
MF1	Harlan Winkelmann GmbH
SPC CRAF	Kerkhoff et al., 2000. Cell Growth & Differentiation.

Tab.2.3. Mauslinienhersteller.

2.1.8.1. Generierung CRAF-defizienter Mäuse

Die Generierung der CRAF knockout Mäuse (Nullmutante) erfolgte in Catrin Pritchards Labor in London. Für den Knockout (ko) von *raf-1* (CRAF) wurden die Exons 10-13, die für die Aminosäuren 338-472 codieren durch ein Neomycin-Gen (*neo^R* Gen) ersetzt. Der „Targetvektor“ wurde in 129Ola-ES Zellen elektroporiert und geeignete ES-Zellklone durch Southern Blot Analyse ausgewählt (Hüser et al., 2001 Supplement data Fig.1B). Klone, die die gewünschte homologe Rekombination enthielten, wurden

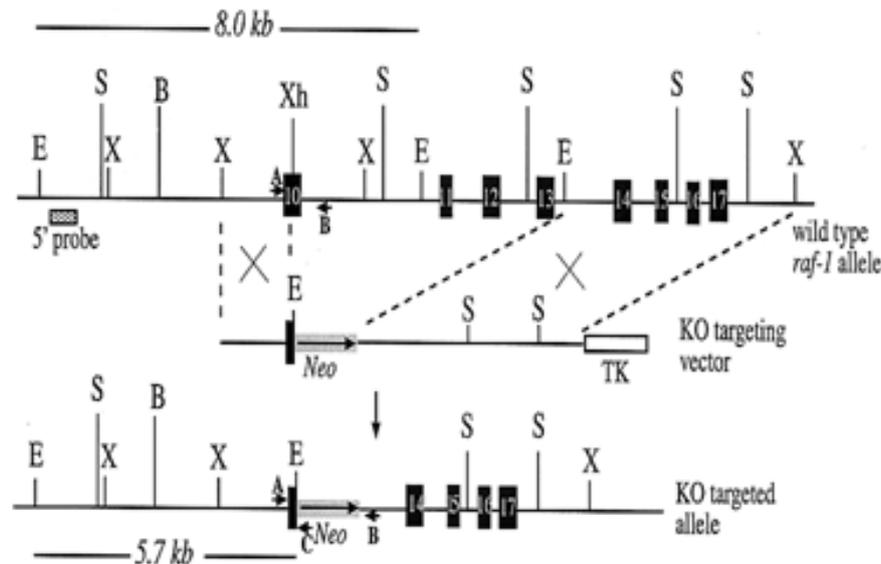


Abb.2.1. Schematische Darstellung des CRAF ko targeting Vector Konstrukts. (Hüser et al., 2001; <http://www.nature.com/emboj/journal/v20/n8/extref/7593694s2.gif>). Die Nullmutation resultiert aus dem Austausch von Exon 10-13 gegen ein Neomycin Resistenzgen. Das ko target Allel hat eine Deletion der Aminosäuren 338-472. Diese Zielgenveränderung hat zur Folge, dass die Kinaseaktivierung über die Phosphorylierung von Serin an der Position 338 nicht mehr erfolgen kann. Western Blot Ergebnisse zeigen, dass Nullmutante Tiere so kein CRAF Protein mehr exprimieren können. Schwarzen Boxen stehen für die Exons, die Proben zur Detektion der Zielfusion am 5`-Ende sind durch die Primer A, B und C bezeichnet. Diese werden für die PCR-Genotypisierung verwendet und liefern ein 355 bp großes Produkt, welches das wildtypische Allel definiert (CRAF^{+/+}) sowie ein 450 bp großes Produkt, das mit dem mutierten Allel korrespondiert (CRAF^{-/-}) (Hüser et al., 2001 Supplement data).

anschließend in Blastozysten injiziert und die Chimären in den MF-1 Auszuchtstamm oder C57BL6 Inzuchtstamm verpaart (Hüser et al., 2001). Die Mutation konnte so auf zwei gemischten genetischen Hintergründen (129Ola/MF-1 und 129Ola/C57BL6) etabliert werden (Hüser et al., 2001). PCR-Analysen der Embryonen aus heterozygoten Verpaarungen (CRAF^{+/-}) (Hüser et al., 2001 Supplement data Fig.1C) bestätigen das gewünschte Konstrukt, während Western-Blot-Analysen aus Protein-Lysaten dieser Föten mit dem Anti-Raf-1 Antikörper die vollständige Deletion des 74 kDa großen Proteins bei nullmutanten Tieren, sowie eine um 50% reduzierte Expression bei heterozygoten im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren zeigen (Hüser et al., 2001 Supplement data Fig.1D). Durch Einkreuzung in den CD1 Auszuchtstamm konnte die embryonale Lethalität CRAF-defizienter Tiere überwunden werden (Hüser et al., 2001).

2.1.8.1.1. Genotypische Analyse und quantitative Auswertung der Zuchtergebnisse

Die Genotypisierung der Embryonen und postnatalen Tiere nach Schwanzbiopsie erfolgte über die PCR Methode zur DNA Analyse. Aus heterozygoten Verpaarungen im CD1 Auszuchtstamm wurden im Gegensatz zu den Nullmutanten, heterozygote und wildtypische Tiere nach der erwarteten *Mendelschen* Frequenz geboren (ko: ht: wt=1/4: 1/2: 1/4).

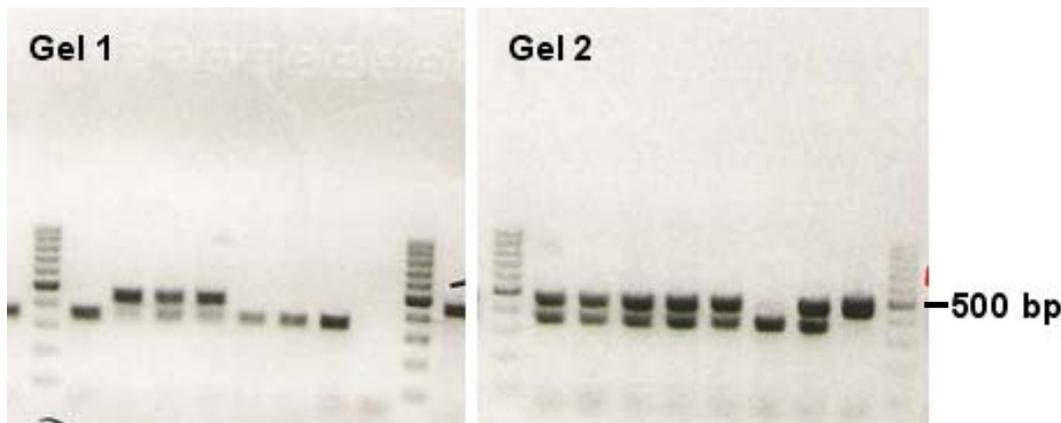


Abb.2.2. PCR-Genotypisierung der Schwanzbiopsien. Zur Größendeterminierung wurde als Marker eine 100bp Leiter geladen. Die dicke schwarze Bande des Markers am Anfang und Ende der Geldokumentation bezeichnet 500bp, der Abstand zwischen zwei Banden beträgt jeweils 100bp. Proben, die größer als 500bp sind, liegen oberhalb der 500er Bande, kleinere Proben dementsprechend unterhalb dieses Wertebereichs.

Ladeschemata:	Gel 1	Gel 2
Marker	x	x
Probe 1	wt	ht
Probe 2	ht	ht
Probe 3	ht	ht
Probe 4	ht	ht
Probe 5	wt	ht
Probe 6	wt	wt
Probe 7	wt	ht
Probe 8	Negativkontrolle	ko
Marker	x	x

Tab.2.4. Ladeschema der PCR Ergebnisse.

2.1.8.2. Generierung SPC CRAF-transgener Tiere

SPC CRAF-transgene Tiere von Kerkhoff et al. (2000) wurden mit CRAF^{+/-} CD1 Tieren von Catrin Pritchard verpaart. Aus den Verpaarungen resultierten Tiere, die heterozygot für SPC und CRAF waren. Die weitere Verpaarung heterozygoter SPC CRAF Versuchstiere brachte CRAF^{-/-} SPC⁺ und SPC⁻ Versuchstiere hervor.

2.1.8.2.1. Genotypische Analyse der Zuchtergebnisse

Aus acht Permanentverpaarungen konnten 33 Würfe mit insgesamt 264 Jungtieren gewonnen werden, 19 Tiere starben bereits vor Eintritt in die adulte Entwicklungsphase. Von den verbliebenen 245 genotypisierten Tieren waren sechs Tiere (3%) CRAF^{-/-}; vier der knockout Tiere waren weiblich, zwei männlichen Geschlechts. Vier der CRAF^{-/-} Tieren exprimierten CRAF in ihrer Lunge, waren also SPC positive „Rescue“ Probanden (2%), während die zwei übrigen CRAF^{-/-} Tiere SPC negativ waren (1%). Auffällig war hier vor allem der verhältnismäßig große Anteil an weiblichen Tieren (4♀/2♂). Im Folgenden sollte beobachtet werden, wie sich die Expression von CRAF in der Lunge bei CRAF defizienten Tiere auf die Lebenserwartung der Tiere auswirkt. Aufgrund der geringen Tierzahlen (n= 264) sind Aussagen bezüglich eines möglichen „Rescues“ nur schwer möglich. Lediglich 3% der 245 zum Zeitpunkt ~P21 genotypisierten Tiere waren CRAF^{-/-}. 7% der insgesamt geborenen Tiere starben bereits vor dem postnatalen Entwicklungszeitpunkt P21 und konnten nicht bezüglich ihres Genotyps erfasst werden. Von

den 6 knockout Tieren stammten 3 Versuchstiere aus dem gleichen Wurf mit einer insgesamten Wurfgröße, die 9 Tiere zählte. Alle drei CRAF^{-/-} Versuchstiere waren zudem SPC+. Das bedeutet, dass in einem von 33 Würfen die Anzahl neugeborener CRAF Knockouts der erwarteten *Mendelschen* Frequenz entsprach. Zwei der Tiere erreichten späte postnatale Entwicklungsstufen (P108/P115), eines verstarb bei P49 und zeigte vergleichsweise ähnliche Symptome, wie sie bei CRAF-defizienten Tieren bei P30 im CD1 Hintergrund gefunden wurden.

Versuchsjahr 2008/2009	Summe
Permanentverpaarung	8
Junge	264
Gestorben vor P21	19
CRAF ko ♀	4
CRAF ko ♂	2
CRAF ko SPC+	4
CRAF ko SPC-	2

Tab.2.5. Datensatz zur Genotypisierung der CRAF SPC Verpaarung.

2.1.9. Versuchsbedingungen

2.1.9.1. Allgemeine Tierhaltungsbedingungen

Alle Tiere, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, befanden sich in der Tierhaltungskapazität des Instituts für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung (MSZ) der Universität Würzburg. In der Tierhaltung gab es kein Tageslicht. Die künstliche Beleuchtung war auf einen Tag-Nacht Rhythmus eingestellt, bei dem die Tiere täglich von ca. 6-18 Uhr Kunstlicht hatten. Wasser und pelletiertes Fertigfutter wurde *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gereinigt und mit frischer Einstreu versehen. Zuchtkäfige wurden bei starker Belegung zusätzlich gesäubert.

2.1.9.1.1. Experimentelles Design

Zu Beginn des Experiments wurde eine äquivalente Anzahl an experimentellen und Kontrollversuchstieren aus einem Wurf ausgewählt. Der genetische Hintergrund der Tiere war somit identisch. Die BrdU-Applikation erfolgte zeitgleich morgens.

2.1.9.2. Tierhaltungsbedingung in einer reizreichen Umgebung

Versuchstiere, die in einer reizreichen Umgebung (*enriched environment*; ERV) gehalten wurden, lebten in einem speziellen Tierkäfig, der eine Grundfläche von 1680cm² (28cm x 60cm) hatte. Dieser Käfig hatte eine zweite Ebene, die von den Tieren über eine Leiter erreicht werden konnte. In dem Käfig befanden sich neben zwei Laufrädern noch einige Kriechtunnel und zwei Wohnhäuschen. Futter konnte über eine Raufe oder alternativ über eine Futterschale am Käfigboden aufgenommen werden.



Abb.2.3. ERV Tierhaltungsbedingungen. Käfigabbildung ähnlich unseres Erlebnisstalls.

2.1.9.3. Standardlabortierhaltungsbedingungen

Eine adulte ~25g schwere Maus benötigt laut Empfehlung des Amtsblatts der EG Nr. L358/21 vom 18.12.86 eine Mindest-Käfiggrundfläche von ca. 70cm². Bei einer Käfigbelegung von 3 bis max. 5 Tieren wurden die Mäuse in Makrolonkäfigen vom TypII mit einer Grundfläche von 363cm² untergebracht. Zuchttiere leben in Makrolonkäfigen vom Typ III mit einer Grundfläche von 815cm². Die Tierhaltungsbedingungen der Nullmutanten wurden durch Permanentverpaarungen der Elterntiere und nicht-absetzten der adulten Knockouttiere optimiert (Abb.2.4).



Abb.2.4. Tierhaltungsbedingung junger adulter nullmutanter (CRAF^{-/-}) Tiere. Durch das nicht-absetzen der Nullmutanten wurde ein engeres Sozialverhalten ermöglicht und damit eine höhere Lebenserwartung der Tiere erzielt.

2.1.10. Antikörper

2.1.10.1. Erstantikörper

2.1.10.1.1. Erstantikörper für die Histologie

ARAF (C-20) #sc-408 (Kaninchen polyklonal) IgG	Santa Cruz
BLBP #AB9558 (Kaninchen polyklonal)	Chemicon
BRAF (C-19) #sc-166 (Kaninchen polyklonal) IgG	Santa Cruz
BRAF (H-145) #sc-9002 (Kaninchen polyklonal) IgG	Santa Cruz
BrdU #ab 6326 (Ratte monoklonal) IgG LOT 489683/ LOT 570168	abcam
BrdU #ab1893 (Schaf polyklonal) IgG	abcam
BrdU (biotin.) #ab2284 (Schaf polyklonal) IgG	abcam
Brn-2 (C-20) #sc-6029 (Ziege polyklonal)	Santa Cruz
Calbindin D-28K #C9848 (Maus monoklonal)	Sigma-Aldrich
Calbindin D-28K #AB1778 (Kaninchen polyklonal) #610152 LOT 0605030979	Millipore
Caspase 3 (<i>cleaved</i>) (Kaninchen polyklonal) #9661L LOT 23	Cell Signalling
CRAF (Maus monoklonal) IgG1 Klon 53 #610152	BD
CRAF (C-20) #sc-227 (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz
CRAF (E-10) #sc-7267 (Maus monoklonal) IgG1	Santa Cruz
DAPI #D9542 > 98%	Sigma-Aldrich
Doublecortin (C-18) #sc-8066 (Ziege polyklonal) IgG	Santa Cruz
EdU #A10044 LOT 458045	invitrogen
GAD-6 (Maus monoklonal) IgG2a	Dr. David I. Gottlieb St. Louis
GFAP (Kaninchen polyklonal) #Z033401-2	Dako
Ki67 #ab15580 (Kaninchen polyklonal) IgG	abcam
Ki67 (Kaninchen monoklonal) SP6 IgG	Thermo Scientific
#RM-9106-S0 LOT 9106S807C, LOT 9106S901A	

Ki67 Ab4 (Kaninchen polyklonal) #RB-1510-P0 LOT 1510P904C	Thermo Scientific
Ki67 (Maus monoklonal) #NCL-Ki67-MM1	Novocastra™
MAP2 (Maus monoklonal)#ab11267-50 IgG1 LOT392836	abcam
Nestin-Rat-401 (Maus monoklonal) IgG1	Susan Hockfield
	Hybridoma Bank
NeuN (Maus monoklonal) IgG1 #MAB377	Chemicon
NeuN (Maus biotin.) #MAB337B LOT LV 1457795	Millipore
Neuro D (G-20) #sc-1086 (Ziege polyklonal)	Santa Cruz
Neuro D (H76) #sc-20805 (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz
Notch1 (C-20) #sc-6014 (Ziege polyklonal)	Santa Cruz
Notch1 (H-131) #sc-9170 (Kaninchen polyklonal) IgG	Santa Cruz
Notch1 (M-20) #sc-6015 (Maus monoklonal)	Santa Cruz
Prox1 anti-human (Kaninchen) #0610R02	RELIATech GmbH
PSA-NCAM (Maus monoklonal) IgM #AbC0019	Linaris
Smooth Muscle monoklonal Anti-Actin	Sigma-Aldrich
α-Smooth Muscle Antikörper, Klon 1A4 purifiziertes Immunglobulin #A5228, LOT 046K4751	
SOX2 #AB5603 (Kaninchen polyklonal) LOT 0606034313	Chemicon
SOX2 (H-65) #sc-20088 (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz
TUJ-1 (Maus monoklonal) #MAB1637 LOT060530904	Chemicon

2.1.10.1.2. Erstantikörper für Western Blot

Actin (I-19) #sc-1616 (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz
Active® MAPK pAb (Kaninchen polyklonal) #9PIV803	Promega
A-RAF (C-20) #sc-408 (Kaninchen polyklonal) IgG	Santa Cruz
B-RAF (C-19) #sc-166 (Kaninchen polyklonal) IgG	Santa Cruz
B-RAF (H-145) #sc-9002 (Kaninchen polyklonal) IgG	Santa Cruz
CRAF (C-20) #sc-227 (Kaninchen polyklonal),	Santa Cruz
ERK 2 (C-14) #sc-154 (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz
Neuro D (H76) #sc-20805 (Kaninchen polyklonal)	Santa Cruz
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (20G11) (Kaninchen monoklonal) #4376	Cell Signalling

2.1.10.2. Zweitantikörper

2.1.10.2.1. Zweitantikörper für die Histologie

Click-iT™ EdU Alexa Flour® 488 Imaging Kit #C10083 LOT 474282	invitrogen
Esel α Ziege (<i>Donkey α goat</i>) ALEXA 555 #A21432 LOT 38159A	invitrogen
Esel α Ziege (<i>Donkey α goat</i>) Cy2 #705-225-147 LOT 74848	Dianova
Esel α Maus (<i>Donkey α mouse</i>) Cy3 IgG #AP192C LOT 060503721	Chemicon
Esel α Kaninchen (<i>Donkey α rabbit</i>) Cy3 #711-165-152 LOT 77808	Dianova
Esel α Kaninchen (<i>Donkey α rabbit</i>) FITC #711-095-152 LOT 64654	Dianova
Esel α Maus (<i>Donkey α mouse</i>) IgG TRITC #715025151	Jackson
Kaninchen α Ziege biotin. (<i>Rabbit α goat biotin.</i>) #E0466 LOT 00012557	Dako

Kaninchen α Ziege biotin. (<i>Rabbit α goat biotin.</i>) #E0466 LOT 00018094	Dako
Kaninchen α Schaf (<i>Rabbit α sheep</i>) IgG FITC #ab6743-1	abcam
Kaninchen α Maus biotin. (<i>Rabbit α mouse biotin.</i>) IgG #E0354 LOT 00027052	Dako
Streptavidin-Alexa Fluor [®] -555 #S21381	invitrogen
Texas Red Streptavidin #SA-5006	Vector
Ziege α Kaninchen biotin. (<i>Goat α rabbit biotin.</i>) IgG #E043201-8 LOT 00039553	Dako
Ziege α Kaninchen biotin. (<i>Goat α rabbit biotin.</i>) IgG #E0432 LOT 00013145 (Matthias Becker)	Dako
Ziege α Ratte (<i>Goat α rat</i>) Alexa-488 IgG #A-11006 LOT 93C1	invitrogen
Ziege α Ratte (<i>Goat α rat</i>) Alexa-488 IgG #A-11006 LOT 45967A	invitrogen

2.1.10.2.2. Zweitantikörper für Western Blot

Ziege α Kaninchen Peroxidase konjugiert	Dianova
------------------------------------------------	---------

2.1.11. Injektionslösungen

BrdU-für die Injektion

BrdU, 5-Bromo-2'-deoxyuridine. Thymidin Analogon, das selektiv in die zelluläre DNA während der S-Phase des Zellzyklus inkorporiert wird.

BrdU (Sigma:#B9285-1G)

Abwiegen: 0.2056g \rightarrow 200,56mg c=5mg/ml
+ 40,11ml 0.9% NaCl

\rightarrow Wasserbad 37°C, gelegentlich schütteln (ca. 30min. inkubieren) oder bei RT rühren bis Kristalle vollständig gelöst sind.

\rightarrow Steril filtrieren (Sterilfilter).

\rightarrow Aliquotieren ($\hat{=}$ 1ml), Aufbewahrung der Aliquots bei -20°C.

Injektionsvolumen:

postnatale Maus: 50mg/kg Körpergewicht (i.p.)

trächtiges Weibchen: 100mg/kg Körpergewicht (i.p.)

EdU-für die Injektion (EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine Thymidine Analogon, wie BrdU)

100 μ g ip/ adulte Maus

50mg in 50ml 1x PBS (steril) lösen, steril filtrieren; 1ml Aliquot; Aufbewahrung bei -20°C. c= 1mg/ml

2.1.11.1. Injektionslösungen für die Anästhesie

Anästhetikum:

Für 1ml Ansatz: 250 μ g/ml Ketanest[®] S (Stock 25mg/ml)
50 μ l/ml Rompun[®] (Stock 2%) in 0.9% NaCl-Lösung.

6ml Ansatz: Ketanest[®] S 1500 μ l
Rompun[®] 300 μ l
0.9% NaCl 4200 μ l (alternativ: 1x PBS steril pH 7.4)

Vortexen, Lagerung bei +4°C.

0.9% NaCl in ddH₂O für die Anästhesie

0,9g NaCl auf 100ml ddH₂O.

2.1.12. Sonstige Reagenzien

DAB 3,3'-Diaminobenzidine #D-5905 LOT 102K8202	Sigma- Aldrich
dNTP Mix, 2mM <i>each</i> #R0242	Fermentas
Protease-Inhibitor Cocktail Set #I 539131	Calbiochem
Western Blot PageRuler™ Prestained Protein Leiter #SM0671	Fermentas
Taq DNA-Polymerase: #GC-002-1000, Bio Therm, 1.000U	Gene Craft®
10x Bio Therm Puffer, 15mM MgCl ₂ , :#GC-002-006	Gene Craft®
100bp DNA Leiter GeneRuler™ #SM0241	Fermentas

2.2. Lösungen und Puffer**2.2.1. Lösungen für die Genotypisierung*****Tail Juice* (Lysispuffer für Mausschwanzbiopsien)**

Je 250ml Ansatz von Stammlösungen.

Stammlösung:

(50mM EDTA, pH 8.0)

500 mM Stock EDTA

→ EDTA M= 372,24g/mol (1000mM)

500mM = 186,12g/l für 250ml: $186,12 / 4 = 46,53\text{g}$ einwiegen.

→ in dH₂O lösen, mit 10M NaOH-Lösung titrieren (pH 8.0), autoklavieren.

(50mM Tris, pH 8.0)

1M Stock Tris

→ Tris M= 121,14g/mol für 250ml → $121,14 / 4 = 30,285 \sim 30,3\text{g}$ einwiegen.

→ in dH₂O lösen, 37% HCl-Lösung, autoklavieren.

(0.5% SDS)

20% SDS (Schutz)

→ 0.5% SDS (100%= 288,38g/mol)

20% = $288,38 / 5 = 57,676\text{g}$ für 250ml $57,7 / 4 = 14,419\text{g} \sim 14,4\text{g}$ einwiegen.

→ in dH₂O lösen, nicht autoklavieren.

Ansatz für 100ml *Tail Juice*:

50mM EDTA pH 8.0 → 10ml

50mM Tris pH8.0 → 5ml

0.5% SDS → 2.5ml

+ 82.5ml dH₂O

2.2.1.1. Puffer für die horizontale Gelelektrophorese

1x TAE-Puffer

50x stock (1Liter Ansatz):

Tris	242g
EDTA	18,6g

pH 8; Mit dH₂O auffüllen, braucht viel HCl für die Titration!! Lagerung bei +4 bis +8°C.

1 Liter 20ml 50x TAE-Puffer (stock) + auf 1 Liter mit Millipore H₂O auffüllen

5 Liter: 4900ml Millipore Wasser/ oder dH₂O

+ 100ml 50x TAE-Puffer (stock).

10 Liter: 9800ml Millipore Wasser/ oder dH₂O

+ 200ml 50x TAE-Puffer (stock)

2.2.1.2. Ladepuffer für horizontale Gelelektrophorese Templates

6x Ladepuffer für PCR-Proben:

Bromphenolblau	250mg	
150mM Tris pH 7.6	33ml	(HCl Titration)
Glycerin	60ml	
ddH ₂ O	7ml	Lagerung bei +4 bis +8°C.

2.2.1.3. Lösungen für die Perfusion

Bouin`s Fixativ (Prof. H. Heinsen, Pathologie)

Picrinsäure	15ml	
40% Formaldehyd	5ml	
Essigsäure	1ml	Filtern und bei +4°C lagern

1x PBS-DEPC (steril)

9,55g PBS (Pulver) in 1 Liter ddH₂O lösen

0.01% DEPC (1ml auf 1 Liter), pH 7.2- 7.4 mit HCl/ NaOH einstellen

→ o/N bei 37°C inkubieren (Wasserbad), autoklavieren. Lagerung bei +4 bis +8°C.

1x PBS- Zellkultur pH 7.2-7.4 (steril)

9,55g PBS (Pulver) in 1 Liter ddH₂O lösen, pH 7.2- 7.4 mit HCl/ NaOH einstellen, autoklavieren. Lagerung bei +4 bis +8°C.

4% PFA in PBS/ DEPC

7,4g je 250ml Lösung.

+ 2 Tropfen 10M NaOH

Auf gewünschtes Volumen auffüllen, bei 60°C ca 1h inkubieren (homogene Lösung), pH 7.2- 7,4,

(HCl/ NaOH), filtern (Faltenfilter, unterm Abzug) und lichtgeschützt (Alufolie ummantelt) bei 4°C lagern.

30% Sucrose in PBS-DEPC pH 7.4

Für 100ml → 30g Sucrose

→ für 1L → 300g Surose einwiegen

PBS-DEPC zuvor autoklavieren, pH 7.2-7.4 (NaOH/ HCl). Unter Rühren lösen. Lagerung bei -20°C.

2.2.2. Puffer und Lösungen für die Histologie**10x PBS**

(5 Liter Ansatz)	NaCl	400g
	KCl	10g
	Na ₂ HPO ₄	57,5g
	KH ₂ PO ₄	10g

In dH₂O lösen, pH nicht einstellen, da für 1x PBS der pH-Wert auf pH 7.2-7.4 (HCl/ NaOH) titriert wird. Lagerung bei +4 bis +8°C.

0.1M Natriumcitrat-Puffer

29.4g tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1 Liter dH₂O lösen, Lagerung bei +4/ bis +8°C.

0.1M Zitronensäure

21g Zitronensäure in 1 Liter dH₂O lösen. Lagerung bei 4 bis 8°C.

Natrium-Citrat Puffer für die Antigendemaskierung:

0.1M Zitronensäure (21g/1Liter dH₂O)

0.1M Natriumcitrat (29.4g/1Liter 0.1M Tri-Natriumcitrat)

1 Liter Natrium-Citrat Puffer

0.1M Zitronensäure 18ml

0.1M Tri-Natriumcitrat 82ml

dH₂O 900ml

pH 6.0 (HCl/NaOH Titration), Lagerung bei +4 bis +8°C

Lösungen für die BrdU Detektion**0.1M Sodium Borat Puffer pH 8.5**

Borsäure: M= 61.83

→ 0.1M: für ½ Liter 3.1g Borsäure einwiegen

+ NaOH (M=40; d.h 0.1M heißt dann für ½ Liter 2g (4g für 1Liter))

Auf pH 8.5 entweder mit Borsäure oder NaOH einstellen. Lagerung bei +4 bis +8°C

(etwas mehr Borsäure einwiegen erleichtert mühevolleres pH einstellen).

2N HCl-Lösung für die BrdU Inkubation:

aus 37% HCl = M 36,46g/mol

M= m/n

HCl= 1:1 Wertigkeit; 1 normal=1M

1 Mol HCl = 36,5g

→ 36,5g/ 37% (Stock) = 98,6g von 37% Ausgangslösung (=1M oder 1N)

Oder über Dichte berechnen:

Dichte HCl 1,19g/ cm³ (Packung entnehmen) ($98,6 / 1,19 = 82,9\text{ml}$), d.h. 98,6g = 82,9ml auf 1Liter

Lösungsansatz: → Für 100ml werden 16,6ml der 37% HCl benötigt um eine 2N Lösung zu erhalten.

Lagerung bei +4- bis +8°C

2.2.3. Titrierlösungen für die pH-Wert Einstellung

10M NaOH

1M = 40g/l

→ 250ml = $40 : 4 = 10\text{g}$

10M = $10 \times 10 = 100\text{g}$ auf 250ml

→ Vorsicht, wird heiß! Deshalb zuerst 100ml zugeben, Deckel stets gut verschließen.

1 M HCl

1M = 36,46g/L

1M → 250 ml = $\frac{9,115\text{g} \times 100\%}{37\%}$ → 24,635g

oder 37g → 85,5ml

→ 21,4ml auf 250ml Lösung

2.2.4. Puffer und Lösungen für die Proteinanalyse

3x PP (für Western Blot) ansetzen (bei -20°C lagern)

Für 20ml:

Tris	0,454g
SDS	1,2g
Glycerin	7,56g
→ pH 6,9 (in dH ₂ O lösen, pH nur mit HCl einstellen)	
DTE	30mg
Bromphenolblau	400µl
ddH ₂ O	20ml

Homogenisierungspuffer für Gehirngewebe:

50mM Tris	(MG 121,14)
100mM NaCl	(MG 58,4)
10mM EDTA	Stock 0.5M
NP-40 Detergenz	0,5%

Auf pH 7.4 mit 37% HCl einstellen

→ 1ml Protease Inhibitor (Sigma) pro 20g Gewebe (1µg pro 20mg) zugeben.

Lysispuffer für Gewebe (Ripa)	10ml Ansatz
1M Tris/HCl pH 8.0	500µl
5M NaCl	300µl
20% SDS	50µl
5% Desoxycholat	1000µl

(Desoxycholsäure/Natriumsalz)

20% Triton x-100	<u>500µl</u>
Σ	2350µl
	+ 6100µl ddH ₂ O

Kann bei 4/ 8°C gelagert werden.

Zugabe von (kurz vor Gebrauch)

0.1M Natriumpyrophosphat	1000µl
0.2M Glycerophosphat	1250µl
Inhibitor-Cocktail	100µl

PBSTP (TBSTPV)

(PBS/0,05%Tween-20/ 0,1% PVP-40)

10x Stock/ 1000ml

Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	21,6g	
<u>oder</u> Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (8,06mM)	14,3g	
KH ₂ PO ₄ (1,47mM)	2g	
NaCl	80g	
Tween-20 (0,05%)	5g	
PVP-40 (0,1%)	10g	Lagerung bei +4 bis +8°C

Tris A Puffer

Tris: 121g/mol → 1Liter 750mM = 0,75M
 Tris 90,9g auf 1 Liter mit ddH₂O auffüllen,
 0,2% SDS (10ml von 20% Stocklösung/L), pH 8,8 (NaOH/HCl), bei RT lagern.

Tris B Puffer

Tris: 250mM,
 Tris 30,3g auf 1Liter ddH₂O
 0,2% SDS, pH 6.8 (NaOH/HCl Titration), bei RT lagern.

APS 10%

(frisch ansetzen)

APS	0,22g
ddH ₂ O	2,2ml

SDS-Gele

10 % Trenngel	<i>für 2 Gele</i>
750mM Tris A pH 8.8	5ml
Incl.0,2% SDS	
ddH ₂ O	1,7ml
30% Acrylamid	3,32ml
APS 10%	100µl
TEMED	3µl

APS und TEMED zuletzt zugeben, kurz vortexen und in der Gelkammer auspolymerisieren lassen. Gel mit Butanol oder besser Isopropanol überschichten um eine gerade Oberfläche zu erhalten und so einen gleichzeitigen Eintritt der Proben in das Trenngel zu ermöglichen.

Sammelgel

250mM Tris B pH 6.8	2,5ml
Incl. 0,2% SDS	
ddH ₂ O	1,8ml
Acrylamid	650µl
APS 10%	37,5µl
TEMED	4µl

Laemmli-Laufpuffer (1x)

10x Stocklösung	
Tris Base 25mM	60,6g
Glycine 250mM	376g
SDS 0,1%	20g
In 2 Liter dH ₂ O lösen pH 8.8 (NaOH/HCl), bei RT lagern.	
Laufzeit:	1h 30mA je Gel/230V

TBST

10x Stocklösung	
500mM Tris Base	60,5g/L
(0.5M x 121g/mol)	
1.5M NaCl (58.44g/mol x 1.5)	87,66g/L
pH 7.4 (NaOH/HCl), autoklavieren.	
nach dem Autoklavieren zugeben:	
Tween-20 (0,5%)	5g, bei RT lagern.

Stripping Puffer

20% SDS	10ml
1M Tris pH6.5	6,25ml
Auf 100ml ddH ₂ O auffüllen, bei RT lagern.	

Blot Puffer

10x Stocklösung	
250mM Tris	30,1g/L
1920mM Glycin	144g/L
10% Methanol	100ml/L, Lagerung bei +4 bis +8°C.

1M Tris-HCl Lösung

Tris M = 121,14g/ mol oder 121,14g/L

Für 1L 1M Tris Lösung werden 121,14g Tris in 1L dH₂O gelöst und mit HCl auf den gewünschten pH Wert eingestellt. Bei RT lagern.

2.2.5. Sonstige Lösungen

Proteinase K

c = 20mg/ml

Proteinase K	0,2g
ddH ₂ O	10ml

Unter Rühren lösen, Aliquot à 1ml, bei -20°C lagern.

2.2.6. Färbelösungen

DAB 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung dient als Peroxidasesubstrat und Chromogen.

#D5905 (Tabletten)

1 Tablette in 15ml 1x PBS pH 7.4 lösen (Abzug, da stark cancerogen), filtrieren (Faltenfilter) und aliquotieren (à 1ml). Lagerung bei -20°C. Kurz vor dem Färben auftauen und 0,8µl 30%-ige Wasserstoffperoxid- Lösung (H₂O₂) zugeben, vortexen. Farbumschlag nach braun beobachten und Färbung in ddH₂O abstoppen.

Gallocyanin-Chromalaun

Chromalaun KCr(SO ₄) ₂ 12H ₂ O	5g
dH ₂ O	100ml

→ unter Rühren lösen.

Gallocyanin	0,15g
-------------	-------

→ zusetzen, unter Rühren zum Kochen bringen, dabei löst sich der bei RT nur schwer lösliche Farbstoff rasch in tiefblauem Farbton 5min. sieden (nicht länger) (Heizplatte, rühren) erkalten lassen, filtrieren (Faltenfilter), mit destilliertem Wasser auf 100ml auffüllen pH-Wert der Lösung soll um pH 1.65 liegen (pH Einstellung mit HCl).

Gallocyanin

Rezept von Eva Broschk, Labor Prof. Dr. Helmut Heinsen

dH ₂ O	2000ml, auf 70°C erhitzen
-------------------	---------------------------

Chromalaun (Kaliumchrom(III)-sulfat)	100g
--------------------------------------	------

Gallocyanin	3g
-------------	----

→ genau 7min. kochen, abkühlen und filtrieren (Faltenfilter).

Perameisensäure

(Rezept von Eva Broschk, Labor Prof. Dr. Helmut Heinsen)

Vor Gebrauch 1h reifen lassen!

dH ₂ O	1200ml
-------------------	--------

H ₂ O ₂ 30%	600ml
-----------------------------------	-------

Ameisensäure	200ml
--------------	-------

Hämatoxylin

Hämatoxylin (dunkel)	1g
----------------------	----

Natriumjodat (NaJO ₃)	0,2g
Kaliumalaun	50g
Zitronensäure	1g
Chloralhydrat	50g

Auf 1 Liter mit H₂O auffüllen, filtrieren (Faltenfilter) und bei RT lagern.

Eosin

Eosin-Stocklösung 1:10 mit H₂O verdünnen: 1g Eosin + 99ml ddH₂O. Bei RT lagern.

Herstellung der Nissl Lösung (1ml = 1cm³)

Cresyl Fast Violet:	1g
Millipore H ₂ O: 100cm ³	100ml
Essigsäure 0,25cm ³	250µl

Rühren und filtrieren (Faltenfilter), bei RT dunkel aufbewahren.

150mM Tris pH 7.6

Tris M= 121,14g/mol 121,14g/L

150mM (1Liter): 121,14g x 0,150M = 18,17g

33ml 150mM Tris: 18,17g/30,03=0,6g Tris auf 33ml ddH₂O.

2.2.7 Eindeckmittel für dehydrierte Gewebe

Herstellung von Mowiol®

Mowiol® 4-88	15g
PBS 1x pH 8.0	60ml
Glycerin (H ₂ O frei)	30ml
n-Propylgallat (Bleichschutz)	2,25g

o/N rühren, 15min. Zentrifugation bei 17.300g zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile. Überstand aliquotieren und bei -20°C lagern. Kurz vor Gebrauch auftauen, kann wieder eingefroren werden; bei Zähflüssigkeit kurzes Erwärmen bei 37°C.

2.2.8. Lösungen für die Zellkultur

TB- Medium

1 Liter-Ansatz : Hefe	24g
Trypton (Pepton)	12g
Glycerol (100%)	4ml

→ auf 900ml mit dH₂O auffüllen und autoklavieren.

separat herstellen: 0.17M KH₂PO₄ → 1M = 136,09g/mol (~g/l)

0.17M = 23,14g/mol

→ für 100ml: 2.31g

+ 0.72M K₂HPO₄ → 1M = 174,18g/mol

0.72M = 125,5g/mol

→ für 100ml: 12,6g und autoklavieren.

2.2.9. Strukturformeln

Bromo-2'-deoxyuridin

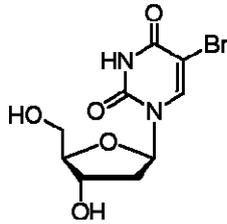


Abb.2.5. Strukturformel von BrdU.

Quelle: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=B5002|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochlorid (DAB)

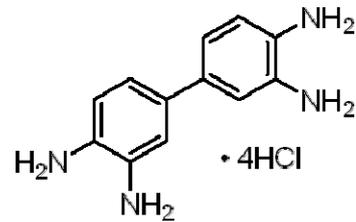


Abb.2.6. Strukturformel von DAB.

Quelle: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=de&N4=32748|FLUKA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

2.3. Methoden

2.3.1. Immunhistologische Methoden

In der Immunhistologie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Gewebeschnitt oder in isolierten Zellen sichtbar zu machen.

2.3.1.1. Gewebeeinbettung

Schematische Darstellung:

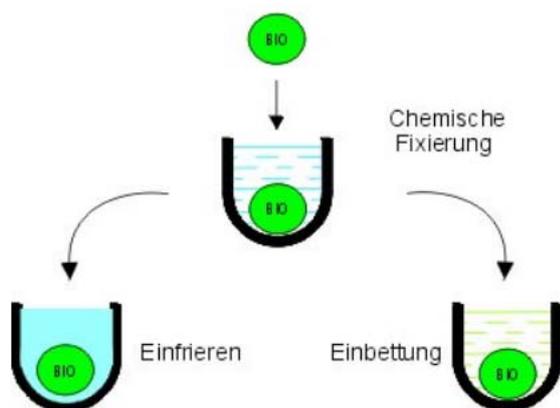


Abb.2.7. Gewebeeinbettung.

(<http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/bioprobe/cutlm.htm>). Die fixierten Gewebepreparate werden je nach Einbettung (OCT/Paraffin) in Sucroselösung bzw. 70% Ethanol transferiert und anschließend entsprechend dem Einbettungsprotokoll verarbeitet.

Für die Herstellung biologischer Proben müssen für lichtmikroskopische Analysen „Dünnschnitte“ für anatomische und immunhistochemische Versuche hergestellt werden. Das Gewebe wird dazu fixiert, eingebettet (Abb.2.7.) und anschließend in 10-50µm dicke Scheiben geschnitten (Abb.2.11.).

2.3.1.1.1. Gewebeeinbettung in OCT™ (tissue tec®)

Transkardiale Perfusion mit 1x PBS (steril)/4% PFA (PBS/DEPC); anschließend Postfixierung in 4% PFA (PBS/DEPC) bei 4°C o/N. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS (steril) bei RT in Bewegung; Transfer in 30% Sucroselösung (PBS/DEPC) o/N Inkubation bei 4°C (bei Bedarf auch länger, Sucroselösung sollte dann ausgewechselt werden). Nach dem Absinken der Gewebe in der Sucroselösung (teilweise

Entwässerung durch Osmose) Transfer in Cryomold® molds Gefäße (25x20x5mm) für Sagittalschnitte oder in halbierte 8,0ml Reaktionsgefäße für Coronalschnitte. Einbettung in O.C.T.™ auf Trockeneis, weitere Lagerung der fixierten Gewebe bei -80°C.

2.3.1.1.2. Gewebeeinbettung in Paraffin

Transkardiale Perfusion mit 1x PBS (steril)pH 7.4/ 4%PFA (PBS/DEPC) pH 7.4; anschließend Postfixierung in 4% PFA (PBS/DEPC) pH 7.4 bei 4°C o/N. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS (steril) pH 7.4 bei RT in Bewegung, Transfer in 70% Ethanol o/N bei 4°C.

In dieser Arbeit wurden postfixierte Gehirngewebepräparate mittels Skalpell halbiert, so dass für weitere Versuchsdurchführungen die rechte Gehirnhälfte in OCT™ und die linke Gehirnhälfte in Paraffin eingebettet zur Verfügung standen.

Handeinbettung für Gehirn- und Embryogewebe:

Gewebeinkubation wie folgt:

70% Ethanol (2x)	1h
96% Ethanol (2x)	1h
100% Ethanol (2x)	1h
50 % Ethanol/ 50% Chloroform (2x)	1h
100% Chloroform (2x)	1h
Paraffin I	1h o/N bei 70°C (bis zum Ausgießen).

Handeinbettung für große Embryonen (~E18.5) oder junge postnatale Tiere:

Gewebeeinbettung wie folgt:

70% Ethanol (2x)	24h
96% Ethanol	1h
100% Ethanol	24h
50% Ethanol/ 50% Chloroform I	1.30h
50% Ethanol/ 50% Chloroform II	2h
100% Chloroform I	2h
100% Chloroform II	2h
Paraffin I (70°C)	o/N
Paraffin II (70°C)	24h
Paraffin III (70°C)	bis zum Ausgießen.

2.3.2. Immunhistochemische Färbemethoden

Unter Immunhistochemie (IHC), Immunhistologie, Immunfärbung oder Antikörperfärbung versteht man in Naturwissenschaften wie der Biologie oder der Medizin eine Methode, mit Hilfe derer Proteine durch Antikörper sichtbar gemacht werden können. So kann unter anderem nicht nur bestimmt werden, in welchem Gewebe ein Protein vorhanden ist, sondern auch, in welchem Kompartiment der Zelle genau es lokalisiert ist. Für immunhistologische Färbungen wird entweder fixiertes Gewebe verwendet, das aus vollständigen Tieren wie beispielsweise Mausembryonen und anderen vergleichsweise größenähnlichen

Objekten besteht, oder aus Gewebeschnitten, die von einzelnen Organen angefertigt werden. Auch können isolierte Zellen aus der Zellkultur immunocytochemisch untersucht werden.

Prinzip der immunhistologischen Färbemethode:

Der immunhistologische Nachweis eines bestimmten Proteins beruht auf der spezifischen Affinität von Antikörper zu Antigen (Antigen-Antikörper Reaktion). Idealerweise bindet der Antikörper spezifisch an das Antigen (Epitop) und wird über ein visualisierbares Detektionssystem anschließend im Präparat sichtbar gemacht. So ist es möglich, selbst geringe Mengen an Epitop durch „verstärkte“ Detektionssysteme darzustellen. Der Antikörper, auch als Primär- oder Erstantikörper bezeichnet, sollte sich durch eine hohe Spezifität und Affinität auszeichnen und keine Kreuzreaktionen mit ähnlichen Epitopen zeigen. Die eigentliche Antikörperfärbung besteht aus mehreren einzelnen Schritten, bei denen die einzelnen Färbekomponenten des Detektionssystems dem Präparat zugeführt werden. Doch nicht allein die Färbekomponenten sind für die reproduzierbare Antikörperfärbung ausschlaggebend. Das Ergebnis einer IHC hängt wesentlich von vorgeschalteten Schritten wie Gewebefixierung, Fixierdauer, Gewebeeinbettung, Lagerung und der Vorbehandlung („*Antigen-Retrieval*“) der Präparate ab. So ist die Gewebefixierung schon primär ausschlaggebend, da nicht alle Antikörper für Paraffin-Schnitte zugänglich sind; Präparate sollten niemals überfixiert werden, hier ist das Absinken des Gewebes im Fixativ Indikator für die erreichte Fixierung.

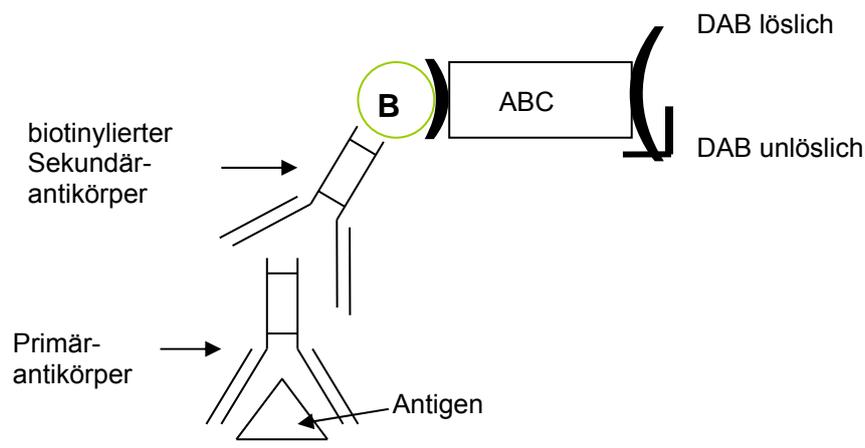


Abb.2.8. Schematische Darstellung des Färbepinzips mittels Doppelmarkierung.

Der biotinylierte Sekundärantikörper markiert den Primärantikörper, welcher das Antigen erkennt und bindet. Das ABC-Reagenz dient dabei der Sensitivitätssteigerung, durch die das Verhältnis zwischen positiver Färbung und Hintergrund optimiert werden soll. Der ABC Komplex (*Avidin and Biotynilated horseradish peroxidase macromolecular Complex*) als immunoperoxidase System setzt das Chromogen DAB durch Oxidation um und bildet ein braunes Polymer als Endprodukt.

Bei der Gewebeeinbettung sollte zuvor die Lösungsmittelbehandlung der jeweiligen Präparate in Erfahrung gebracht werden, da einige Gewebe bei bestimmten Einbettprotokollen nicht analysierbar sind und schon beim Schneiden zerfallen. Um Beispiele zu nennen, werden Organe wie Lunge, Leber und Niere mit Xylol „eingebettet“ bevor sie in Paraffinblöcken konserviert werden, wohingegen Mausembrionen und Gehirngewebe eine solche Behandlung nicht überstehen und deshalb mit Chloroform „eingebettet“ werden müssen. Da jedoch die Einbettautomaten nicht mit Chloroform laufen

dürfen, wird die Einbettung von diesen Präparaten per Hand vorgenommen. Die eigentliche Färbung, die durch die Antigen-Antikörperreaktion zustande kommt, ist jedoch von weiteren Faktoren wie Temperatur, Konzentration, Inkubationszeit, Bewegung und einem optimalen Reaktionsmilieu abhängig, das sich durch festgelegte pH-Werte und Salzkonzentrationen definiert. Damit die eigentliche Färbung reproduzierbar gelingen kann, sollten die Rahmenbedingungen genauestens eingehalten werden. Des Weiteren können unspezifische Nebeneffekte und allgemeine Hintergrundfärbungen, wie sie durch endogenes Biotin oder endogene Peroxidase herbeigeführt werden, durch sogenannte „Blockierungsschritte“ dezimiert werden. Zusätzlich können schwache Signale über „Signal-Amplifikationen“ wie das „Biotinylieren“ oder die Peroxidasekopplung (z.B. ABC Kit) verstärkt werden. Die anschließende Analyse der Färbung erfolgt im morphologischen Kontext durch ein geeignetes Mikroskop. Bei der Antikörperfärbung unterscheidet man prinzipiell zwei Methoden; die direkte und die indirekte Methode.

Direkte Methode

Das Antigen reagiert unter definierten Bedingungen mit einem spezifischen Antikörper, der wiederum direkt an ein Enzym oder Fluorophor wie beispielsweise Fluorescein, Rhodamin oder Texas Red gekoppelt ist. Der Antikörper bindet das Antigen und das Enzym kann nach Substratzugabe (Chromogen) unter Bildung eines Farbstoffes reagieren. Da sich der Farbstoff nur dort bildet, wo eine immunchemische Reaktion stattgefunden hat, ist diese visualisierbar. Bei fluoreszierenden (fluorochrom-markierten) Antikörpern benötigt man für die Detektion ein Fluoreszenzmikroskop. Die direkte Immunfluoreszenz (DIF) eignet sich besonders bei Mehrfachfärbungen in einem Präparat, wobei die Antikörper von unterschiedlicher Spezifität und mit Fluorochromen verschiedener Emissionswellenlängen konjugiert sein müssen.

Indirekte Methode

Bei der indirekten Immunfluoreszenz (IIF) ist der zweite Antikörper aus einer anderen Tierart und gegen das Fc-Fragment der schweren Kette des Primärantikörpers gerichtet. Über den sekundären und teilweise tertiären Antikörper wird der Komplex von Farbmolekülen (Chromophore), Enzym und Biotin gekoppelt. Vorteil dieser Methode ist eine verbesserte Effizienz und Sensitivität des Systems, wobei mit Effizienz das Verhältnis zwischen positiver Färbung und dem Hintergrund, und mit Sensitivität die minimal benötigte Menge an Antigen, die zum Nachweis erforderlich ist, gemeint ist. Der Sekundärantikörper ist entweder an einen Fluoreszenzfarbstoff oder an ein Enzym, wie z.B. HRP, gekoppelt. Ist der Primärantikörper aus dem Spendertier Maus (Maus IgG), so muss der Sekundärantikörper gegen den Wirt des Erstantikörpers gerichtet sein, also α -Maus sein. Die Blockierlösung (BS), in der die Antikörper verdünnt werden, ist gegen den Spenderorganismus des Sekundärantikörpers gerichtet, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Diese Methode dient vor allem der Signalverstärkung.

Peroxidase Reaktion

Dem Enzym Peroxidase dient Wasserstoffperoxid als Substrat, wobei freiwerdende Protonen oxidieren und das zuvor farblose Chromogen zu einem farbigen unlöslichen Endprodukt unter Bildung von Wasser machen. In dieser Arbeit wurde das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) verwendet, das nach

Oxidation ein braunes Endprodukt (Polymer) bildet. Elektronendonator (R) ist dabei das DAB: $H_2O_2 + R-H \rightarrow 2H_2O + R$.

ABC-Methode

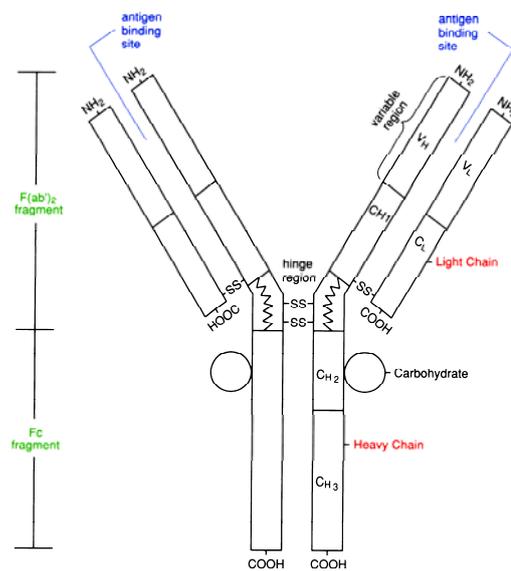
Das Prinzip der ABC-Methode basiert auf der Fähigkeit von Avidin, vier Moleküle Biotin zu binden. Hierdurch kommt es zu einer enormen Affinitätssteigerung, die 10^6 x stärker ist als die zwischen Antikörper und Antigen. Zudem ist Biotin leicht mit Proteinen wie beispielsweise HRP konjugierbar.

Konjugierte Streptavidin- Methode

Durch die Biotinylierung der Sekundärantikörper ist das Enzym Peroxidase kovalent an das Streptavidin gebunden. Durch die geringe Größe dieses Komplexes kann diese Methode auch bei hoher Antigenkonzentration in Betracht gezogen werden.

Antikörperstruktur

Antikörper oder auch Immunglobuline (Igs) genannt sind Glycoproteine und bestehen zu 82-96% aus Protein und zu 4-18% aus Kohlenwasserstoff. Man unterscheidet fünf Klassen von Igs: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM, wobei etwa 70% der Igs im menschlichen Serum IgGs sind. Grundstrukturiell bestehen IgGs aus je zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken gekoppelt sind. Ein Epitop oder Antigen (antigene Determinante) besteht aus 3-10 Aminosäuren. Polyklonale Antikörper sind ein Gemisch aus verschiedenen IgGs unterschiedlicher B-Lymphocyten, die an verschiedenen Epitopen des Antigens binden. Bei monoklonalen Antikörpern ist die identische Struktur und Spezifität von großem Vorteil, weil sie von einem einzigen Klon produziert werden. Als Antigene werden die Substanzen bezeichnet, die eine Immunantwort auslösen.



Tab.2.9. Antikörperstruktur (Homburg U.,2006). Die Antigenbindestellen des Fab Fragments sind blau markiert

Fluoreszenzfarbstoffe

- Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)
- Tetramethyl Rhodamine- Isothiocyanat (TRITC)
- Sulforhodamine-101-säure-Chlorid (Texas Red)
- 7-Amino-4 Methylcoumarin-3-Acetat (AMCA)
- Carbocyanin (Cy2)
- Indocarbocyanin (Cy3)
- Indodicarbocyanin (Cy5)

- Grünfluoreszenz
- Rotfluoreszenz
- Rotfluoreszenz
- Blaufuoreszenz
- Grünfluoreszenz
- Rotfluoreszenz
- Rotfluoreszenz (langwellig)

Fluoreszenztechniken

Schematischer Aufbau eines Fluoreszenz-mikroskops: Weißes Licht aus einer Xenon- oder Quecksilberdampf-Lampe wird durch einen Anregungsfilter auf die entsprechende Wellenlänge, die für die Anregung des jeweiligen Fluorochroms benötigt wird, herausgefiltert. Dieses Licht wird anschließend von einem dichromatischen Spiegel, der eine kritische Wellenlänge besitzt, auf das Präparat reflektiert, wobei Licht kleinerer Wellenlänge reflektiert und Licht größerer Wellenlänge passiert wird. Der dichromatische Spiegel muss also so gewählt werden, dass die kritische Wellenlänge zwischen dem Anregungs- und dem Emissionsmaximum des zu detektierenden Fluorochroms liegt. Auf diesem Weg wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat geleitet, während langwelligeres Fluoreszenzlicht den dichromatischen Spiegel passieren und durch das Okular zum Auge gelangen kann. Ein optisches System, das eine möglichst vollständige Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht erlaubt, ist Voraussetzung für eine gute mikroskopische Abbildung.

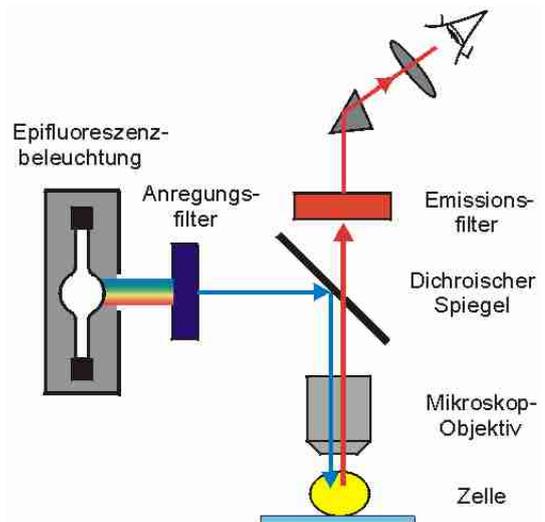


Abb.2.10. Fluoreszenzmikroskop schematisch (<http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/fluomikl.htm>).

2.3.2.1. Paraffin Schnitte

Paraffinschnitte (10µm) werden mittels Mikrotom angefertigt, manuell entparaffiniert und kurz gewässert. Anschließend findet die Antigendemaskierung in der Mikrowelle (~90°C) in 10mM Natriumcitratpuffer bei pH 6.0 statt. Nach dem Abkühlen bei RT wird die Pufferlösung fließend durch dH₂O ersetzt und über einen Inkubationsschritt in 1x PBS der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Durch das Blocken in Blockierlösung, bestehend aus 5% Serum und 0,1% Triton-X100 in 1x PBS, werden unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers reduziert (Hintergrundfärbung). Die Erstantikörperinkubation erfolgt bei 4°C o/N im Kühlschrank. Bei Doppelfärbungen sollte, um Crossreaktionen zu vermeiden, darauf geachtet werden, dass die beiden Erstantikörper aus verschiedenen Spenderspezies stammen. So können sie parallel in die Färbereaktion eingesetzt werden. Nach mehrmaligem Waschen der Objektträger in 1x PBS pH 7.4 findet die Inkubation mit dem Zweitantikörper bei RT im Dunkeln statt. Durch mehrmaliges Waschen der Objektträger in 1x PBS pH 7.4 werden ungebundene Zweitantikörper entfernt und anschließend die Reaktion in dH₂O gestoppt. Nicht-dehydrierte Gewebe werden mit Mowiol® eingedeckt. Bei dehydrierten Geweben, wie beispielsweise nach einer Gegenfärbung mit H&E, erfolgt die Schnittkonservierung durch Entellan® oder Histofluid. Bei der immunhistochemischen Detektion durch DAB wird im Anschluss an den Natriumcitratpuffer Austausch durch fließendes Wasser ein Inkubationsschritt in 3% H₂O₂-PBS eingefügt. Um die H₂O₂-PBS Reste von den Schnitten zu entfernen werden diese erneut in 1x PBS gewaschen und anschließend in der Blockierlösung geblockt.

Hand-Entparaffinierung:

Xylol I.	10min.
Xylol II.	10min.
Ethanol 100%	Kurz durchziehen
Ethanol 100%	10min.
Ethanol 100%	10min.
Ethanol 70%	10min.
dH ₂ O	5min.

Tab.2.6.Entparaffinierungsreihe.

Dehydrierung:

dH ₂ O	5min.
Ethanol 70%	5min.
Ethanol 96%	5min.
Ethanol 100%	10min.
Ethanol 100%	10min.
Xylol I.	10min.
Xylol II.	10min.

Tab.2.7. Dehydrierungsreihe.

Färbeprotokolle:

1. Waschen
2. (Antigenretrival, Abkühlen, fließend Wässern, Waschen)
3. Permeabilisieren (Triton® X-100) und Blockieren
4. Primäantikörper
5. Waschen
6. Sekundäantikörper
7. Waschen
8. DAPI
9. Abstoppen mit Wasser

Protokolle:

Primär AB	Verdünnung	Company	Sekundär AB	Verdünnung	Hersteller	AG Retrival	BS
A-RAF	1:100	Santa Cruz	α Kaninchen biotin DAB	1:200	Dako	6 min	2h 5% GS 0.1%Trit
BLBP	1:500	Millipore	α Kaninchen biotin Tex.Red.Str	Dako Vector	1:200 1:200	6 min	2h 5% GS 0.1%Trit
B-RAF	1:100	Santa Cruz	α Kaninchen biotin DAB	1:200	Dako	6 min	2h 5% GS 0.1%Trit
BrdU-Ratte	1:100	abcam	Alexa488	1:200	invitrogen	6-23 min	60 min-2h
BrdU-Schaf	1:128	abcam	α Schaf FITC	1:200	abcam	6 min	2h 5% GS 0.1%Trit
Brn-2	1:1000	M.Wegner	α Ziege biotin Str.Alexa555	1:200 1:200	Dako invitrogen		
Calbindin Cryo	1:1000	Millipore	α Maus biotin Str.Alexa555	1:400 1:200	Dako invitrogen		30 min 5% Rb 0,1%Trit
Calbindin MM Paraffin	1:1000	Sigma	α Maus biotin Str.Alexa555	1:200 1:200	Dako invitrogen	10 min	1h 10% GS 0.1%Trit

Caspase3	1:100	Cell Signalling	α Kaninchen biotin DAB	1:200	Dako	23 min	30 min 5% GS 0.2%Trit
CRAF	1:100	Santa Cruz	α Kaninchen biotin DAB	1:200	Dako	6 min	2h 5% GS 0.1%Trit
DAPI	1:50	Sigma					
EdU		invitrogen	Click-it™ Alexa488	500 μ l	invitrogen		2h 3% BSA
GFAP	1:200	Dako	α Kaninchen biotin Tex.Red.Str.	1:200 1:200	Dako Vector	6-23 min	2h 5% GS 0.1%Trit
Ki67- Kaninchen	1:250	abcam	Cy3	1:400	Dianova	23 min	2 h 4% NDS 0.1%Trit
Ki67-MM	1:20	Novocastra	α Maus biotin Str.Alexa555	1:200 1:200	Dako invitrogen	23 min	30 min 4% NDS 0.2%Trit
Ki67 SP6	1:200	Thermo Sci	Cy3	1:200	Dianova	20 min	1h 5% NDS 0.2%Trit
Ki67 Ab4	1:100	Thermo Sci	Cy3	1:200	Dianova	20 min	1h 5% NDS 0.2%Trit
MAP2	1:1000	abcam	α Maus TRITC	1:100			
Nestin	1:5	Hybridoma Bank	α Maus biotin Tex.Red.Str.	1:200 1:100	Dako Vector	6 min	30 min 3% BSA 0.3%Trit
NeuN-biot.	1:100	Millipore	Str.Alexa555	1:400	invitrogen	6 min	2h 5% GS 0.1%Trit
NeuN	1:100	Millipore	α Maus biotin Str.Alexa 555	1:400 1:200	Dako invitrogen	6 min	2h 5% GS 0.1%Trit
NeuroD	1:50 - 1:200	Santa Cruz	α Ziege biotin Str.Alexa555	1:400 1:200	Dako invitrogen	20 min	30 min 5% Rb 0.2%Trit
Prox1	1:200	RELIATec.	α Kaninchen biotin DAB	1:200	Dako	15 min	30 min 1% BSA 0.2%Trit
PSA-NCAM Cryo	1:250	Linaris	α Maus biotin Tex.Red Str.	1:400 1:100	Dako Vector		2h 5% GS 1%Trit
SOX2	1:100	Santa Cruz	Cy3	1:200	Dianova	6 min	2h 5% DS 0.1%Trit
Tau	1:100		α Ziege	1:200	Dako		

			biotin.				
TUJ-1	1:100	Chemicon	α Maus biotin Str.Alexa555	1:200 1:200	Dako invitrogen		1h 5% Rb 3% BSA 0.3%Trit

Tab.2.8. Antikörperspezifische Färbeprotokolle.

2.3.2.2. Cryo Schnitte

Die zuvor in OCT™ eingebetteten und bei -80°C gelagerten Gewebeproben können bei kurzer Lagerdauer auch für In-situ Hybridisierungen verwendet werden. Hierbei wird mit Hilfe von spezifischen Sonden nach dem Vorhandensein der RNA der zu detektierenden Gene gesucht. Gleich wie für immunhistologische Analysen werden $10\mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte bei -20°C mittels Cryotom angefertigt. Gleichmäßig tiefe Temperaturen sind notwendig, um fortlaufende Serienschnitte anfertigen zu können. Wird ein Präparat nicht vollständig geschnitten, können Gewebereste anschließend mit OCT™ überschichtet wieder bei -80°C gelagert werden. Cryo-Gewebeschnitte müssen je nach Protokoll des jeweiligen Markers kurz bei RT getrocknet oder mit 4% PFA/PBS-DEPC nachfixiert werden, bevor sie wie Paraffinschnitte nach dem Entparaffinierungsschritt nach dem Färbeprotokoll weiterbehandelt werden.

Serienschnitte

Um vergleichbare Gewebeabschnitte für unterschiedliche histologische Auswertungen zur Verfügung zu haben, ohne dass dabei eine Mehrfachbewertung derselben Zelle in einem Versuch vorgenommen wird, werden Zehnerserien medianer Sagittalschnitte auf Super Frost® Plus Glasobjektträgern mit einer jeweiligen Schnittdicke von $10\mu\text{m}$ angefertigt. Zehnerserien bedeutet, dass das erste Gewebepräparat auf Objektträger Nummer 1, das zweite Präparat auf Nummer 2,...bis schließlich das elfte Präparat zu dem Ersten auf Objektträger Nummer 1 plaziert wird, usw. Insgesamt wurden vier Gewebepräparate in fortlaufender 10er Serie auf einem Objektträger platziert. Das bedeutet, dass der Abstand vom ersten Präparat zum Zweiten auf dem Objektträger jeweils $100\mu\text{m}$ beträgt. Eine Zehnerserie bestand demnach aus 40 Gewebepräparaten. Pro Tier konnten ca. 200 Gewebepräparate pro Gehirnhälfte angefertigt werden. Die ersten Schnitte einer Zehnerserie (1.1, 1.2, 1.3, 1.4/ 11.1,...) bis zur DG Fusion wurden zur DG-Volumenbestimmung durch Nissl gefärbt. Sie gaben gleichzeitig Aufschluss darüber, wie viele Schnitte für die Folgefärbungen analysiert werden mussten. Für die Folgefärbungen erfolgte die Präparateauswahl analog der Nissl Färbung.

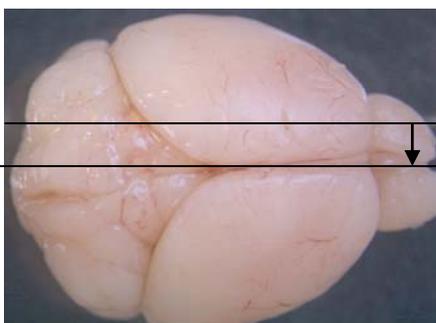


Abb.2.11. Schematische Darstellung zur Durchführung von Sagittalschnitten einer vollständigen Hippocamushälfte. Die jeweilige Schnittdicke betrug $10\mu\text{m}$ (\downarrow). Die Gehirnpräparate wurden postfixiert halbiert, so dass die eine Gehirnhälfte für Cryoschnitte und die andere für Paraffinschnitte verwendet werden konnte.

2.3.2.3. Hämatoxylin/Eosin Färbung

Hämatoxylin/Eosin, oder abgekürzt als H&E-Färbung bezeichnet ist die am weitesten verbreitete Routinefärbung für morphologische Untersuchungen. Pathologen nutzen diese Übersichtsfärbung, basierend auf zwei miteinander gekoppelten Einzelfärbungen häufig dazu, um Veränderungen an Biopsiepräparaten aufzudecken. **Hämatoxylin**, ein natürlich gewonnener Farbstoff aus dem Blauholzbaum, muss zunächst zu Hämalaun aufbereitet werden, damit es färbende Eigenschaften entwickeln und saure/basophile Strukturen wie Zellkerne und die darin enthaltene DNA anfärben kann. **Eosin** hingegen ist ein synthetischer saurer Farbstoff, färbt also basische/acidophile (eosinophile) Strukturen, wie Zellplasmaproteine, rot.

Paraffinschnitte müssen für die H&E-Färbung zunächst entparaffiniert werden. Nach der Hämatoxylin-Färbung (20-40sek.) erscheinen die Zellkerne aufgrund des sauren pH-Wertes der Färbelösung zunächst rot-braun. Durch anschließendes Wässern der Färbung mit Leitungswasser schlägt der Farbton durch diese Erhöhung des pH-Wertes zu dem für Hämatoxylin typischen Blauviolett um. Nach der Hämatoxylin-Färbung folgt die zytoplasmatische Gegenfärbung durch Eosin. Nach weiteren Spülschritten unter Leitungswasser werden die Gewebeschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Die Inkubation in einem organischen Lösungsmittel, wie beispielsweise Xylol bewirkt die Klärung der Präparate und schließlich können die Gewebeproben mittels Entellan unter einem Deckglas konserviert werden. Die weitere Lagerung erfolgt bei RT.

2.3.2.4. Gallocyanin Färbung

Gallocyanin stellt wie Hämatoxylin eine Kernfärbung dar, mit dessen Hilfe die morphologischen Gegebenheiten einer Struktur sichtbar gemacht werden können. **Paraffin Schnitte** werden zunächst entparaffiniert, kurz gewässert und je nach Färbintensität der Lösung 1min. im Färbemittel inkubiert. Unter Leitungswasser wird anschließend ungebundener Farbstoff abgespült. Über eine aufsteigende Alkoholreihe mit anschließender Xylol-Inkubation werden die Gewebe dehydriert und mit Entellan unter einem Deckglas konserviert. Die weitere Lagerung erfolgt bei RT. **Celloidin Schnitte**, die häufig in der Pathologie insbesondere bei größeren Präparaten Verwendung finden und auf 70% Ethanol aufbewahrt werden, müssen zunächst für mindestens 1h gewässert werden, wobei es sich bei mehreren Schnitten empfiehlt, die Schnitte zwischen Siebplatten oder Gewebekassetten und Filterpapier zu sortieren und zu glätten. Anschließend werden die Schnitte über Nacht auf einem Schüttler bei RT in Perameisensäure inkubiert, die zuvor hergestellt wurde und 1h reifen konnte. Nach weiterem Wässern für mindestens 1h folgt die eigentliche Färbung mit Gallocyanin, oder Nissl genannt, die je nach Färbintensität und Schnittgröße zwischen 1-2h betragen kann. Nach dem fließenden Entwässern der Gewebepreparate unter Leitungswasser für 30min. erfolgt die Dehydrierung der Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe, einem 1:2 Gemisch an Xylol/Propanol und schließlich reinem Xylol sowie die Gewebekonservierung mit Entellan und einem Deckglas.

2.3.2.5. TUNEL Assay

Der TUNEL Assay dient zur Detektion von Apoptose. Diese Färbung kann sowohl an Cryo-Schnitten als auch an Paraffin-Schnitten durchgeführt werden. 10µm dicke Sagittal-Schnitte werden mit dem DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System von Promega nach Herstellerprotokoll gefärbt, wobei die

fragmentierte DNA apoptotischer Zellen durch Inkorporation von fluoreszierendem 12-dUTP* an den freien 3'OH DNA-Enden durch das Enzym Terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT) erfolgt, das wiederum polymere Enden (polymeric tail) bildet und so das TUNEL Prinzip darstellt (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). Der TUNEL-Negativkontrolle wird kein TdT im „Labelling Mix“ zugeführt, so dass keine enzymatische Reaktion erfolgen kann. Für die Positivkontrolle werden Gewebe mit DNase-I behandelt. Durch diesen Verdau entstehen freie 3'OH-Enden, die nach Zugabe von TdT grüne Fluoreszenz zeigen. Nach der TUNEL Färbung erfolgt eine Gegenfärbung mit DAPI zur Darstellung der Zellkerne. Apoptotische Zellen fluoreszieren grün, während ihr DAPI gefärbter Zellkern blau markiert ist. Zudem können einzelne apoptotische Zellen besondere Merkmale wie kondensiertes Chromatin und Zytoplasma, stark uniform verdichtetes Chromatin sowie intrazelluläre Chromatinfragmente aufweisen. Cryo-Schnitte werden o/N bei RT getrocknet, für 15min bei RT mit 4% PFA nachfixiert und durch Inkubation in einer Proteinase K Lösung (c=20µg/ml) für 8-10min permeabilisiert. Nach einer weiteren Nachfixierung in 4% PFA für 5min bei RT erfolgt ein Equilibrierungsschritt bei RT für 5-10min. Die eigentliche Färbung erfolgt durch Zugabe von TdT „Label Mix“ bei 37°C für 60min im Dunkeln. Durch Zugabe von 2x SSC wird die Reaktion abgestoppt, mit DAPI gegengefärbt und anschließend werden die Gewebeproben mit Mowiol® unter einem Deckglas konserviert. Für Paraffin-Schnitte wird die Deparaffinierung vorgeschaltet und mit der Fixierung im Cryo-Schnitt-Protokoll begonnen.

2.3.2.6. BrdU Färbung

Das Thymidin Analogon BrdU, das, i.p. injiziert, sich in die DNA von proliferierenden Vorläuferzellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, integriert, kann mittels immunhistochemischer Färbemethoden visualisiert werden. Über eine Antigen-demaskierung mit Natriumcitratpuffer, auf die je nach Färbeprotokoll noch eine zusätzliche HCl-Behandlung von 30min bei 60°C folgen kann, wird das nukleäre Antigen für den Antikörper präsentiert. Die HCl-Behandlung ist an eine anschließende 25min Inkubation in 0.1M Natrium Borat Puffer pH 8.5 bei RT gekoppelt. Nach dieser Behandlung ist eine Gegenfärbung mit DAPI obsolet.

2.3.3. Immuncytochemie

2.3.3.1. Embryoisolation

Um Mausembryonen zu einer bestimmten embryonalen Entwicklungsstufe isolieren zu können, muss der Trächtigkeitsbeginn einer Verpaarung via „Plug check“ genau festgestellt werden. Ab diesem „Plug“-positiven Start der Trächtigkeit werden die Tage als embryonale Entwicklungsstufen gezählt, und der gewünschte Zeitpunkt kann leicht ermittelt werden. Die trächtigen Weibchen werden zur Entnahme der Embryonen via Genickbruch euthanasiert, der Bauchraum geöffnet und die Embryonen aus dem Uterus entnommen.

2.3.3.2. Primäre Kulturen postmitotischer Neuronen aus dem embryonalen Telencephalon

Vor der eigentlichen Gewebeentnahme müssen die Zellkulturplatten unter sterilen Bedingungen vorbehandelt werden. 24-Well Platten werden mit Deckgläschen (cover slip) bestückt, und mit 70% Ethanol und anschließend 3x mit 1x PBS- Zellkultur (pH 7.4) gewaschen, bevor sie mit 250–500µl je Well mit einer Beschichtungslösung bestehend aus 0,1mg/ml Poly-D-Lysin und 0,01mg/ml Laminin für 2h bei 37°C oder bei 4°C o/N inkubiert werden. Nach dieser Vorbehandlung werden die Platten 3x mit 1x PBS-

Zellkultur (pH 7.4) gewaschen und bei 4°C unter sterilen Bedingungen gelagert. Die Mausembryonen werden wie oben beschrieben aus dem Uterus des trächtigen Muttertieres entnommen und in 4°C kaltes 1x PBS-Zellkultur (pH 7.4) transferiert. Unter einem Stereomikroskop werden den separierten Embryonen das *Telencephalon Meninges* entnommen und beide Telencephalonhälften in 500µl MediumX bestehend aus Neurobasal Medium, 1x B27 (Supplementfaktor), 2mM Glutamin und 1x Penicillin/Streptomycin überführt und unter sterilen Bedingungen manuell tituriert, bis keine Gewebeklumpen mehr sichtbar sind. Nach Zugabe von weiteren 2ml MediumX werden 10µl der Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung via Neubauer Zählkammer entnommen. 600.000 Zellen sollen in 500µl Medium pro Well ausgesät werden. Der ermittelte Wert nach Zellzahlbestimmung wird wie folgt errechnet. Bei vier ausgezählten Quadraten der Zählkammer: $4 \times Y \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$. Nach zweitägiger Kultivierung bei 37°C wird das MediumX nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS-Zellkultur pH 7.4 durch frisches MediumX mit 100ng/ml BDNF ersetzt und für 10min, 30min und 4h inkubiert, in 1x PBS-Zellkultur pH 7.4 gewaschen und für 20min in 500µl 4% PFA/PBS pH 7.4 bei 4°C fixiert. Um die Zellen nicht überzufixieren, wird das Fixativ gründlich durch mehrmaliges Waschen in 1x PBS-Zellkultur pH 7.4 entfernt und die Platten bei 4°C in 1x PBS-Zellkultur aufbewahrt. Zur Quantifizierung der Zellen werden diese anschließend über immuncytochemische Färbemethoden visualisiert.

2.3.3.3. Immuncytochemie kortikaler Neurone

In der Immuncytochemie nutzt man, wie bei allen immunchemischen Färbemethoden, die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung bestimmter Antigene auf Zellen sichtbar zu machen. Die bei 4°C in 1x PBS gelagerten „Deckgläschen“ mit den kortikalen Neuronen werden für 1h in einer Blockierlösung, bestehend aus 1x PBS mit 0,3% Triton X-100, 3% BSA und 3% NDS, in Bewegung geblockt und permeabilisiert. Anschließend erfolgt die Erstantikörperinkubation o/N bei 4°C. Die Erstantikörper- und Zweitantikörper-Verdünnung wird in der Blockierlösung vorgenommen.

Antikörper	Verdünnung
Brn-2; Ziege	1:500- 1:1000
MAP2 ; Maus	1:1000
P35; Kaninchen	1:50
pERK 1,2; Kaninchen	1:50
TUJ-1; Maus	1:200

Tab.2.9. Antikörperverdünnung.

Beim Färben in 24-Well Platten wird in einem Volumen von 200µl je Well inkubiert. Nach dem Waschen (3x je 5-10min in 1x PBS in Bewegung) wird der Zweitantikörper für 2-3h bei RT in Bewegung im Dunkeln inkubiert.

Antikörper	Verdünnung
αMaus TRITC	1:100
αKaninchen TRITC	1:100
αZiege Cy5	1:100

Tab.2.10. Antikörperverdünnung.

Nach dem Waschen (3x je 5-10min in 1x PBS auf dem Schüttler) werden für 1h bei RT in Bewegung die Dendriten mit Phalloidin/ F-Aktin (1:40) gefärbt, die Zellkernfärbung mit DAPI (1:1000) erfolgt für 15min bei

37°C in 1x PBS verdünnt. Nach der Zellkernkontrastierung wird 3x für 5min gewaschen, mit ddH₂O die Färbung abgestoppt und mit Mowiol® die Zellen unter einem Deckgläschen konserviert. Die Quantifizierung der Dendritenlänge wird über das „Leica Microdissector“ Programm des Leica Mikroskops durchgeführt.

2.3.3.3.1. Migrationsassay kortikaler Neurone via Transwell® Assay

Experiment	oberer Transwell®Bereich	unterer Transwell®Bereich
Kontrolle	V = 200µl	V = 500µl ohne BDNF
BDNF	V = 200µl	V = 500µl + 50ng/ml BDNF

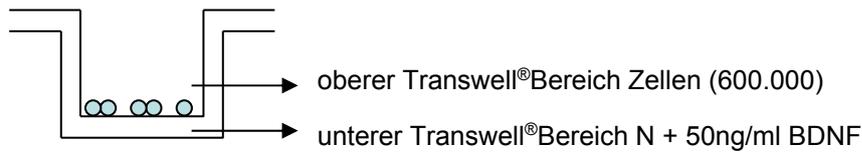
Tab.2.11. Transwell® Beladung.

500ml N =	5ml Glutamin (200mM)	500µl Glutamin
	10ml B27	1ml B27
	Penicillin/Streptomycin	1ml Pen/Strept.

EGF-Stimulation: c= 100ng/ml

Sollwert: 100µg/ml in 500µl Lösung, d.h. 3µl EGF + 3ml Medium

Versuchsaufbau schematisch:



N = Neurobasalmedium + 1x B27 + 2 mM Glutamin + 1x Penicillin/Streptomycin

Abb.2.12. Transwell® -Assay schematisch.

Isolierte kortikale Neurone aus dem embryonalen Vorderhirn der Maus werden auf die zuvor beschichtete Membran des oberen Transwell® Bereichs gegeben. Die Porengröße der Microporenmembran beträgt 5µm. Durch Zugabe eines chemischen Lockstoffs in den unteren Transwell® Bereich soll die gerichtete Migration der kortikalen Neurone durch die Transwell® Membran beobachtet werden.

Die stereomikroskopisch isolierten Vorderhirne werden manuell zerkleinert; dazu wird ca. 10x mit der 1000er Pipette und anschließend ca. 20x mit der 200er Pipette das Volumen aufgezogen und durch das Auspipettieren das Gewebe mechanisch zerkleinert und homogenisiert. Über die Neubauer Zählkammer wird die Zellzahl ermittelt und das Volumen zum Aussäen der Zellen bestimmt. 600.00 Zellen sollen in einem Volumen von 500µl vorliegen. Die Inkubation erfolgt o/N bei 37°C im Zellkulturbrutschrank. Nach dem Waschen müssen die Zellen auf der Transwell®membran fixiert werden. Dazu wird der untere Transwell®bereich mit 800µl 4% PFA/PBS-Zellkultur pH 7.4 befüllt, der obere Transwell®bereich in den unteren eingesetzt, und beide für 30min bei RT fixiert. Nach wiederholtem Waschen in 1x PBS können die Membranen, die eine Porengröße von 5µm besitzen, entweder direkt in die Färbung gehen oder in 1x PBS bei 4°C gelagert werden. Für die Färbung wird der nach oben zeigende Membranbereich mit einem Wattestäbchen gesäubert, die Membran mittels Skalpell aus dem Transwell® entfernt und der nach unten zeigende Bereich der Membran in gegengerichteter Orientierung in eine 24-Well-Platte transferiert. Durch diese Maßnahme werden bei der Färbung nur die Neurone markiert, die durch die Membran hindurch

gewandert sind, nicht aber diejenigen, die auf der Membran ausgesät wurden. Die Auswertung erfolgt wie oben.

2.3.3.3.2. Beschichtung der Zellkulturplatten

Damit sich die ausgesäten Zellen am Boden der Kulturschalen anheften, werden diese zuvor mit einer „Beschichtungslösung“ inkubiert.

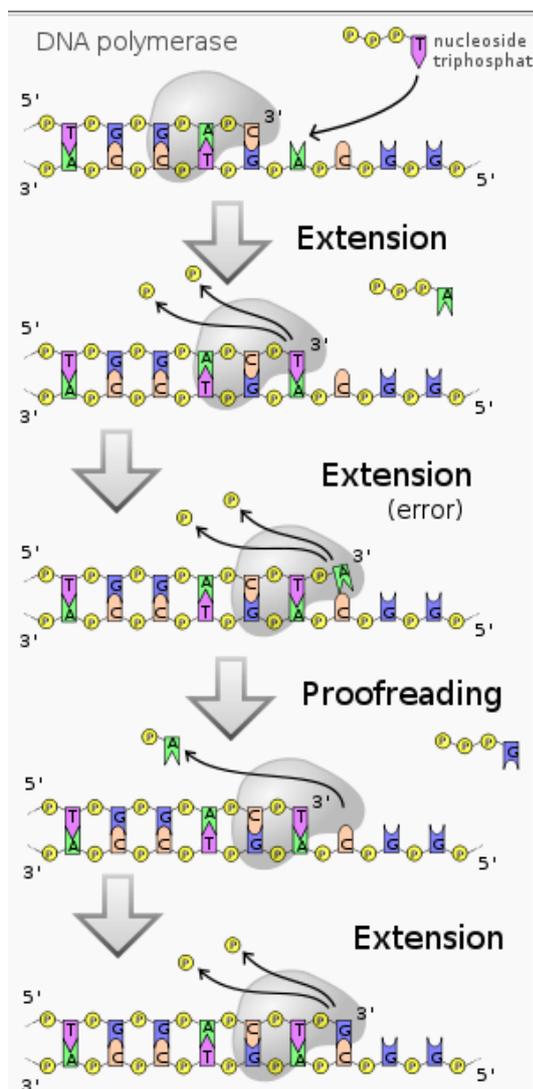
Beschichtungslösung: Laminin (1µg/ml) + Poly-D-Lysin (0,1µg/ml) + Sigma H₂O.

Experiment	Volumen
Western Blot	300µl je Well/ 12 Well Platte
ICC	250µl je Well/ 24 Well Platte
Transwell® Assay	800µl unterer Transwell®bereich 100µl oberer Transwell®bereich

Tab.2.12. Vorbereitungsschema der Zellkulturplatten.

2.3.4. Methoden zur DNA-Amplifikation

2.3.4.1. PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)



Die „*Polymerase Chain Reaction*“, Polymerase Kettenreaktion oder kurz PCR, bezeichnet eine Technik, mit Hilfe derer bestimmte DNA-Abschnitte selektiv amplifiziert werden können um beispielsweise Erbkrankheiten zu erkennen, zum Nachweis von Vater- oder Täterschaften oder zum Nachweis von bestimmten Genen zur Genotypisierung von gentechnisch veränderten Organismen (GVOs). Prinzipiell muss jede Zelle, um sich zu vermehren, eine Kopie ihrer eigenen DNA anfertigen, somit trägt jede Zelle auch die notwendigen Mittel zur Vervielfältigung der DNA in sich. Bei der PCR-Reaktion lässt man viele DNA-Verdopplungsschritte hintereinander ablaufen, um eine möglichst hohe Kopienzahl zu bekommen. Möchte man einen spezifischen Abschnitt eines DNA-Doppelstrangs vervielfältigen, so muss die Sequenz vor und nach diesem Abschnitt durch eine definierte Nucleotidabfolge „flankiert“ sein. Die genaue Zusammensetzung dieser flankierten Sequenz muss bekannt sein, um zu diesem DNA-Abschnitt genau passende Gegenstücke, sogenannte „Primer“ herstellen zu können. Viele Firmen haben sich auf solche Primer-

Abb.2.13. Die PCR-Reaktion schematisch

<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=>

Datei:DNA_polymerase.svg&filetimestamp=2007080703

5548

herstellungsverfahren spezialisiert und nach Sequenzdefinition können die Primer kommerziell erworben werden. Die Primer erkennen „Startsequenzen“, die auf gegenläufigen Strängen liegen. Die eigentliche PCR-Reaktion besteht an sich aus der zyklisch ablaufenden Wiederholung von drei Schritten; zu Beginn wird der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen, so dass er in linearem Zustand in Form von Einzelsträngen vorliegt, gefolgt vom sogenannten Hybridisierungsschritt. Dabei binden zwei „Starter“-Oligonukleotide an die jeweilige Erkennungssequenz der Einzelstränge, wobei die eine Startsequenz an den positiven Strang und die andere an den dazu komplementären Strang bindet und die beiden Oligodeoxynukleotide so in ihrer Orientierung von 5' → 3' zueinander gerichtet sind. Dieser Schritt wird auch als Annealing bezeichnet, wobei „Anneal“ eigentlich härten bedeutet, bei der PCR-Reaktion allerdings das Anlagern der Primer (Oligodeoxynukleotide) an die entsprechenden DNA-Abschnitte der beiden DNA-Einzelstränge bezeichnet. Dabei müssen die Primer im Überschuss vorhanden sein, damit die DNA-Einzelstränge bei der niedrigeren Annealingtemperatur nicht wieder aneinander binden. Nach der Hybridisierung der Startsequenz erfolgt die Verlängerung der DNA-Matrize. Eine thermostabile DNA-Polymerase, die ihre enzymatische Aktivität bei hohen Temperaturen (72°C) ausübt, verlängert dabei an den freien 3'-OH-Enden matrizenabhängig die Startsequenzen und synthetisiert so die Tochterstränge, die genaue Gegenstücke der DNA-Matrize sind. Bei der Wiederholung dieses Zyklus dienen die soeben synthetisierten komplementären Tochterstränge ebenfalls als DNA-Matrize. Hierdurch kann unter Korrektur der Effektivität der DNA-Polymerase und der Limitierung durch die insgesamt Enzymmenge über einen weiten Bereich der PCR-Zykluswiederholung eine exponentielle Vervielfältigung des durch die beiden Startsequenzen festgelegten DNA-Fragments erreicht werden. Die bei der PCR verwendeten Thermocycler werden so programmiert, dass die PCR-Zyklen automatisch wiederholt nacheinander ablaufen, um am Ende auf ca. eine Millionen oder sogar mehr Kopien des ursprünglichen DNA-Abschnittes zu kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Taq-Polymerase verwendet, ein Enzym, das nicht erst durch Erhitzen „aktiviert“ werden muss. Die Hybridisierungstemperaturen hingegen waren abhängig von den zuvor gewählten Startsequenzen, deren Schmelzpunkte nach der Regel von Wallace $T_m = (A+T) 2 \text{ °C} + (G+C) 4 \text{ °C}$ mit (A+T) gleich der Anzahl an Adenin und Thymin und (G+C) gleich der Anzahl von Guanin und Cytosin ermittelt werden kann. Dabei sollte bei einer genauen Übereinstimmung der Basen mit der DNA-Matrize der Wert 4°C unterhalb der Schmelztemperatur liegen. Für die Synthese der Tochterstränge wird die optimale Arbeitstemperatur für die jeweilige DNA-Polymerase gewählt und liegt für die in dieser Arbeit verwendete Taq-Polymerase bei 72°C. Die Zeitdauer der eigentlichen Synthese richtet sich mit 1min pro kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments nach dessen Größe, beträgt jedoch mindestens 30sec.. Ausgehend von einem DNA-Doppelstrang erhält man nach einem Durchlauf von dreißig oder mehr Zyklen 2ⁿ Abschriften. Optimal als Ausgangsmaterial sind hierfür 100 bis 10.000 Moleküle.

2.3.4.1.1. PCR-Reaktion mit der Taq-Polymerase

Für die PCR-Reaktion können nicht nur thermostabile DNA-Polymerasen aus verschiedenen thermophilen Organismen verwendet werden, sondern auch modifizierte Enzyme, denen beispielsweise die 3' → 5' Exonukleaseaktivität fehlt. Bei der Taq-DNA-Polymerase verwendet man die Polymerase I aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Für die Amplifikation der DNA wird herstellenspezifisch der modifizierte Polymerasepuffer zur jeweiligen Polymerase angeboten. Nach einem ersten Denaturierungsschritt während der eigentlichen PCR-Reaktion im Thermocycler für 5min. bei 95°C

erfolgt die eigentliche Amplifizierung mit einem Denaturierungsschritt von 1min. bei 95°C. Nach einem 30sec. „Annealing“ bei spezifisch errechneter Hybridisierungstemperatur für die Oligodeoxynukleotide erfolgt die Verlängerung des Transkripts bei 72°C für 30sek.. Dieser Zyklus wird dann in Folge 35x durchlaufen. Beendet wird die Reaktion durch eine 10min Verlängerungsdauer bei 72°C und anschließendes Abkühlen der Apparatur auf 4°C, womit die eigentliche Reaktion zum Erliegen kommt.

2.3.4.1.2. Herstellung der Lysate aus Mausschwanzbiopsien

Mausschwanzpräparat (Länge bis ca. 0,5cm) mit 190µl Lysispuffer („Tail Juice“) und 7,5µl Proteinase K (c=20mg/ml) bei 54°C (Heizblock) für 8h-24h lysieren. Lysat 1:20 mit ddH₂O (autoklaviert) verdünnen, Lagerung bei -20°C.

2.3.4.1.3. PCR-Master-Mix

Der PCR-Master-Mix wird auf Eis pipettiert. Je Ansatz 30µl Gesamtvolumen, bestehend aus 28µl PCR-Master-Mix und 2µl Lysat (1:20 verdünnt).

Anzahl der Lysate	ddH ₂ O	10xPuffer + 15mM MgCl ₂	2mM dNTP Mix	Forward Primer 20pmolar	Reverse Primer 20pmolar	DNA Polymerase
1 Probe	21µl	3µl	3µl	0,3µl	0,3µl	0,1µl

Tab.2.13. Pipettierschema für PCR-Master-Mix.

Der zur DNA-Polymerase zugehörige Puffer ist zehnfach konzentriert, wird aber in einfacher Konzentration in die Reaktion eingesetzt. Folgende Nukleotide sind im dNTP-Mix enthalten: dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Häufig werden die Primer in einer Konzentration von 100pmol/µl aufbewahrt, da sie bei längerer Lagerung in höherer Konzentration stabiler sind. Sie müssen dann für die PCR Reaktion noch 1:5 verdünnt werden. Den PCR-Master-Mix zuerst in die PCR-Gefäße geben und anschließend das DNA-Template von 2µl zupipettieren. Nach Zugabe des Enzyms (DNA-Polymerase) sollte eine längere Inkubation auf Eis vermieden werden. Eine ungekühlte Lagerung des Reaktionsgemisches sollte wegen der Gefahr der Bildung unspezifischer Bindungen zwischen Primer und Template ebenfalls vermieden werden.

2.3.4.1.4. PCR-Programme

Die verschiedenen PCR-Reaktionen unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer Annealing-Temperatur, die über die Zusammensetzung der Primer bestimmt wird. Es gibt aber auch Unterschiede in der Anzahl der Replikationszyklen zwischen DNA-Denaturierung, Annealing und Extension, die je nach Spezifität der Primer unterschiedliche Wiederholungsabfolgen benötigen. Zur Genotypisierung der Probanden wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende PCR-Reaktionen durchgeführt:

CRAF ko engl. (Konditionaler CRAF Knock-out):

1. 95°C	2min.	Aktivierung
2. 94°C	30sec.	DNA-Denaturierung und Einzelstrangbildung
3. 60°C	30sec.	Annealing
4. 72°C	1min.	Extension
		Schritt 2 bis 4 35x replizieren
5. 72°C	10min	Vervollständigung der einzelnen Stränge
6. 4°C	∞	

SPC CRAF (CRAF „Rescue“ Experiment):

Analog CRAF ko engl. mit Annealing-Temperatur: 68°C für 30sec.

2.3.4.2. Horizontale Gelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Größe von 0.2kb bis 10kb können über ihre definierte Größe auf Agarosegelen aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu amplifizierenden Fragmente werden 0.7-2% Agarosegele gegossen. In dieser Arbeit verwendeten wir 1.5% Agarosegele. 1,8g Agarose wurden mit 120ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und vollständig gelöst. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 50°C wurden 5µl Ethidiumbromidlösung zugegeben und in einem BioRad Gelträger mit einem geeigneten Kamm für die Probenbefüllung auspolymerisiert. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Gelelektrophorese-kammer für horizontale Gelelektrophorese gegeben, der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel mit den DNA-Proben beladen, die zuvor mit 4µl 6x Ladepuffer versetzt waren. Kontaminationen beim Beladen der Gele durch ein Überladen der Kammern sollten vermieden werden. Um die Banden besser sichtbar zu machen, ist eine zusätzliche Zuführung von Ethidiumbromidlösung am Pluspol der Gelkammer in die TAE-Pufferlösung möglich. Da DNA-Moleküle wegen ihrer Phosphat-Ionen negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zum Pluspol, wohingegen Ethidiumbromid zum Minuspol hin, also in die ladungstechnisch entgegengesetzte Richtung wandert. Die Elektrophorese sollte bei 120V/300mA für 30min ein ausreichendes Auftrennen der Proben nach ihrer Größe ermöglichen. Dabei wandern große Moleküle trotz ihrer größeren negativen Ladung im elektrischen Feld langsamer durch die „Maschen“ des Gels als kleinere DNA-Fragmente. Anschließend kann die DNA unter UV-Licht visualisiert werden.

2.3.5. Proteinbiochemische Methoden

Proteine spielen in jeder Zelle eine herausragende Rolle, so erfüllen sie zum einen als Enzyme die Funktion biologischer Katalysatoren, sind an der Regulation des Zellstoffwechsels und der Interaktion zwischen den Zellen beteiligt und werden außerdem als Strukturproteine für den Aufbau spezifischer Strukturen benötigt. In ihrer Enzymfunktion katalysieren sie wichtige Stoffwechselreaktionen im Organismus, wie die Fettspaltung oder den Nukleinsäureaufbau. Als Transportproteine sind sie für den Stofftransport in der Membran und in Körperflüssigkeiten zuständig; hier ist das Hämoglobin im Blut das überlebenswichtige Sauerstofftransportprotein. Immunproteine für die Abwehr von Infektionen, wie Actin und Myosin für die Bewegung, Rezeptorproteine für die Aufnahme und Weiterleitung von Reizen wie im Auge das Rhodopsin, aber auch Strukturproteine wie Kollagen und Keratin zeigen die Vielfältigkeit von Proteinen auf. Regulatorproteine, die für das An- und Abschalten von Genen bei Stoffwechselprozessen verantwortlich sind, sollen hier genauer untersucht werden.

2.3.5.1. Gewebeisolierung für Western Blot Analysen

Unter Anästhesie werden die Tiere dekapitiert und die Gehirne unverzüglich präpariert und auf Trockeneis bei -80°C fixiert. Um verschiedene Präparate aus einem Gewebe wie beispielsweise Amygdala (Amy), Bulbus Olfactorius (OB), Cerebellum (CB) und Hippocampus (HP) zu erhalten, werden die fixierten Gewebe kurz auf einer Kühlplatte angetaut und Coronalsschnitte von einer Dicke von etwa 1-2mm mit Hilfe eines Skalpell geschnitten. Unter einem stereotaktischen Mikroskop können mit Hilfe des „Maus Brain“ Atlas von Keith B. J. Franklin, 1997 die gewünschten Bereiche isoliert und wieder auf Trockeneis

gelagert werden. Nach Zugabe von 50-150µl Ripa-Puffer kann das Gewebe entweder manuell mit einem Handmörser oder mittels Ultra-Turrax® homogenisiert werden. Durch anschließende Zentrifugation bei 12.000rpm für 15min werden die gelösten Proteine aus dem Überstand genommen und in 1,5ml Reaktionsgefäßen bei -20°C aufbewahrt.

2.3.5.2. Bestimmung der Proteinkonzentration über die BCA™ Methode

Die BCA™ Methode kann zur Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt werden. Sie basiert auf der wissenschaftlichen Beobachtung, dass Coomassie Brilliant Blau G-250 an das Protein bindet und so das Absorptionsmaximum von 450nm auf 595nm verschoben wird. Gleiche Volumina der Gewebelysate werden zu 1ml A+B Reaktionsgemisch des BCA™ Kits nach Herstellerprotokoll zugeführt, wobei die Konzentrationsverhältnisse bei 50 Teilen A zu 1 Teil B in 1ml Reaktionsgemisch liegen. Nach gründlichem Vortexen erfolgt eine Inkubation für 30min im Wasserbad bei 37°C. Befinden sich Eiweißmoleküle im Reaktionsgemisch, erfolgt ein Farbumschlag nach blau-violett. Die photometrische Absorption wird bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen und erfolgt nach einem Abgleich gegen den „Blank“ oder auch Nullwert, der aus dem A+B Reaktionsgemisch mit Ripa besteht. Als Eichgerade werden verschiedene BSA Verdünnungen hergestellt. Nach dem photometrischen Abgleich durch Vermessen der Eichwerte erfolgt die eigentliche Messung des Proteingehaltes der zu analysierenden Proben. Durch den gemessenen Wert und das in die Messung eingesetzte Volumen kann die eigentliche Konzentration errechnet werden. 50-60µg Protein sollten pro Well auf ein 10% SDS-PAGE Gel geladen werden.

Endkonzentration	Volumenzugabe BSA (c=2mg/ml)
5µg	2,5µl
25µg	12,5µl
50µg	25µl
125µg	62,5µl

Tab.2.14. BSA-Verdünnungsreihe für die Eichgerade.

2.3.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Die Primärstruktur eines Proteins, auch als Aminosäuresequenz bezeichnet, wird vom N- zum C-terminalen Ende geschrieben. Diese Richtung entspricht auch der Syntheserichtung. Charakteristikum des Proteinmoleküls ist die genaue Abfolge der Nukleotidsequenz der DNA. Aus der Primärstruktur ergeben sich physikalische und chemische Eigenschaften wie etwa die Masse, über die Proteine in denaturierter, aufgefalteter Form aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld der Größe nach getrennt werden. Bei der SDS-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate*) erfolgt zunächst die Auftrennung von komplexen Proteingemischen nach ihrer Größe (MW) und durch den Transfer der Proteine auf eine Membran (Western Blot) werden diese fest gebunden und auf einer offenen Fläche exponiert, so dass ein anschließender Antikörpernachweis erfolgen kann. SDS, ein anionisches Detergenz, überdeckt die Eigenladung von nativen Proteinen, die durch nichtkovalente Interaktionen hervorgerufen werden, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95°C für 5min. (Heizblock) erhitzt und so die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung wie beispielsweise β-

Mercaptoethanol, Dithiothreitol (DTT) oder Dithioerythriol (DTE) aufgespalten, wodurch es zur Auflösung der Quartärstruktur kommt. Dadurch wird gewährleistet, dass nur die molare Masse des Proteins als Trennkriterium wirkt. Bei der SDS-Gelelektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Nach der Hitzedenaturierung werden die Proben auf Eis gegeben. DTE und SDS sind Komponenten des 3xPP-Puffers, mit dem die Proben vor der Hitzedenaturierung versetzt werden. Die Gelelektrophorese erfolgt in einem, von U. K. Laemmli (Laemmli, 1970, Cleveland et al., 1977) eingeführten, diskontinuierlichen Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem. Ein weitporiges Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6.8; 3-4% Acrylamid) überschichtet ein engmaschiges Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8.8, 5-20% Acrylamid). Der pH-Wert des Sammelgels liegt sehr nahe am isoelektrischen Punkt von Glycin. Dadurch hat Glycin zu Beginn der Trennung eine niedrige elektrophoretische Mobilität (Folgeionen). Die Chloridionen in den Puffern haben hingegen eine sehr hohe Mobilität (Leitionen), wobei die Mobilität der Proteine zwischen den Folgeionen und den Leitionen liegt. Beim Anlegen des elektrischen Feldes beginnen in diesem diskontinuierlichen System alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit zu wandern. Aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten befinden sich die Proteine in einem Feldstärkegradienten und bilden während der Elektrophorese einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Mobilitäten (stacking-Effekt). Im Trenngel erfahren die Proteine einen hohen Reibungswiderstand, es gibt einen „Stau“, der das niedermolekulare Glycin nicht beeinflusst; es überholt die Proteine. Im Trenngel wirkt schließlich auf alle Proteine die gleiche Feldstärke und ausschließlich die Größe ist für die Wanderungsgeschwindigkeit ausschlaggebend. Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid, Bisacrylamid (in Acrylamidlösung enthalten), TEMED und APS. Acrylamid, ein Neurotoxin, polymerisiert zu Polyacrylamid und ist in diesem Zustand ungefährlich. Doch Vorsicht, denn auch in auspolymerisierten Polyacrylamidgelen können noch Reste an monomerem Acrylamid enthalten sein! Je nach Menge an Polyacrylamid im Gel lassen sich Proteine unterschiedlicher Größe trennen, wobei die Auftrennung nach Größe ausschließlich aus dem Molekularsieb-Effekt der Gelporen resultiert. Die Porengröße wird durch die Total-Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad (Vernetzer ist Bisacrylamid) definiert. APS dient als Katalysator für die Polymerisation von Acrylamid, die als Radikalkettenreaktion abläuft, wobei APS in Wasser freie Radikale (SO_4) bildet, die mit Acrylamid reagieren. Durch Weiterreaktion des Acrylamidradikals mit Acrylamidmolekülen kommt es zur Monomer-/Polymerbildung. TEMED ein weiterer Katalysator erleichtert die Radikalbildung des APS. Die Polymerisation erfolgt unter Luftabschluss, da Sauerstoff zum Kettenabbruch führt. Je länger das Trenngel, desto besser die Trennung, je dünner das Gel, desto schöner die Banden, aber desto weniger Probenmaterial kann gleichzeitig geladen werden. Bei 1,5mm dicken Gelen und 0,5cm breiten Geltaschen liegt die Obergrenze der Auftragsmenge bei 500µg Proteingemisch. Die Konzentration der Trenngele sollte in etwa der Tabelle unten entsprechen:

MW 10-60 kD	15% Trenngel
MW 30-120 kD	10% Trenngel
MW 50-200 kD	8% Trenngel

Tab.2.15. Konzentration der Trenngele bei der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.

2.3.5.3.1. Herstellung von SDS-Gelen

Das BIO-RAD System ermöglicht eine schnelle und unkomplizierte Handhabung bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen. Die zuvor gründlich mit Spülmittel, 70% Ethanol und ddH₂O gereinigten Glasplatten werden paßgenau zusammengesetzt und in die BIO-RAD Vorrichtung eingespannt. Nach erfolgter

Dichtheitskontrolle mit ddH₂O wird zunächst das Trenngel in die vertikale Gelplattenkonstruktion gegeben, wobei zum oberen Glasrand der beiden Platten mindestens ein Abstand von 1cm verbleiben sollte, das Trenngel wird zur Abtrennung gegen Luftsauerstoff und zur Erlangung einer gleichmäßigen Oberfläche mit Isopropanol/Butanol überschichtet. Die Polymerisationszeit von Acrylamidgelen soll zwischen 30 und 60 Minuten betragen. Es ist von Vorteil, das Gel bereits am Vortag zu gießen, da eine sogenannte Nachpolymerisation durch genauere Porengröße bessere reproduzierbarere Ergebnisse liefert. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist, wird das Isopropanol entfernt und die Gelkammer bis zum Überlaufen mit der Sammelgellösung aufgefüllt und der Kamm für die Proben eingeführt. Die Polymerisationszeit für das Sammelgel sollte zwischen 15 und 30 min betragen. Das Gel kann in diesem Zustand o/N bei 4°C in einem feuchten Tuch vollständig auspolymerisieren.

Trenngel (10%)

750mM TrisA pH 8.8	5ml
Incl, 0.2% SDS	
ddH ₂ O	1,7ml
Acrylamid (30%)	3,32ml
TEMED	3µl
10% APS	0,1ml

Sammelgel

50mM TrisB pH 6.8	2,5ml
Incl, 0.2% SDS	
ddH ₂ O	1,8ml
Acrylamid (30%)	650µl
TEMED	4µl
10% APS	37,5µl

2.3.5.3.2. Probenauftrag und Gelelektrophorese

Nach dem Herausziehen des Kammes wird der Probenraum und die BIO-RAD Elektrophoresekammer mit 1x Laemmli Laufpuffer aufgefüllt. Nun werden die vorbereiteten (denaturierten) Proben mit einer Hamilton[®] Pipette in die Tröge aufgetragen. Durch das im Probenpuffer enthaltene Glycerin sind die Proben schwerer als der Puffer, sie sinken auf den Boden der Tröge ab und der Laufpuffer wird dabei nach oben verdrängt (Unterschichtung). Je zwei Gele werden mit dem BIO-RAD Elektrophorese-Modul zusammengebaut und der dadurch entstandene Kathodenraum vorsichtig mit 1x Laemmli-Laufpufferlösung aufgefüllt, wobei darauf zu achten ist, dass die Gele mit dem Laufpuffer überschichtet sind. In der BIO-Rad Elektrophoresekammer (Anodenkammer) muss genügend Laufpuffer enthalten sein, um einen geschlossenen Stromkreis von Kathode über die Gele zur Anode zu ermöglichen. Über den Deckel des BIO-RAD Elektrophoresesystems wird die Stromversorgung mit dem Spannungsgerät hergestellt. Die Elektrophorese läuft bei 230V konstanter Spannung und 60mA ca 30-45min. Wichtig ist es am Start der Elektrophorese die Polung zu überprüfen, damit die negativ geladenen Proteine nicht in Richtung Plus Pol aus dem Gel herauswandern.

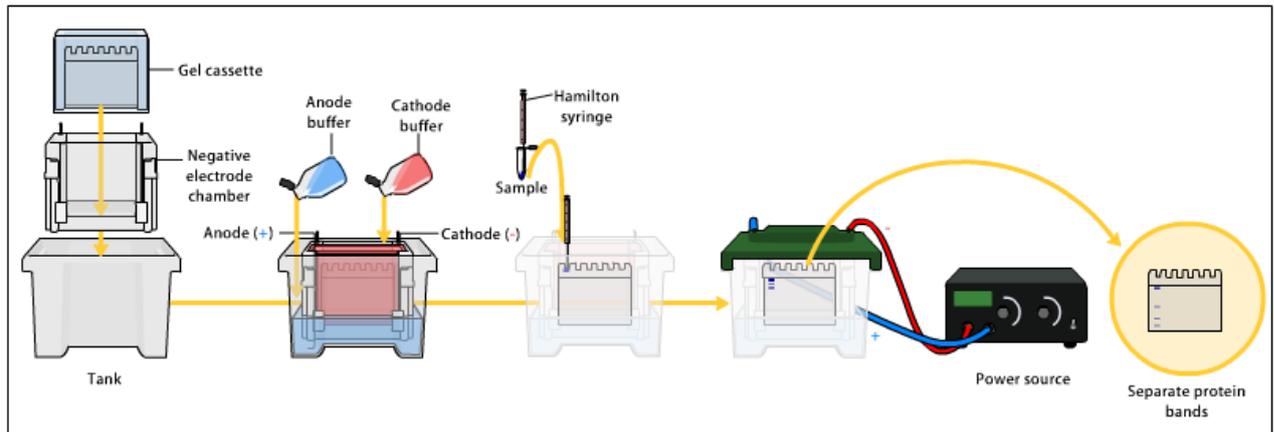


Abb.2.14. Schematische Darstellung der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (<http://en.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>).

2.3.5.3.3. Gel-Kalibrierung

Durch gleichzeitiges Auftragen von Größenstandards („Marker“) kann das gesamte Gel kalibriert werden. Da die relative Mobilität der Proteine im SDS-Gel linear zum Logarithmus ihrer molaren Masse ist, kann anhand der relativen Laufweite zu den Markerbanden das Molekulargewicht eines unbekanntes Proteins bestimmt, oder bekannte Proteine identifiziert werden. 1 Dalton (1Da) ist die Masseneinheit, die der Masse des Wasserstoffatoms (1,0000 auf der Atommassenskala) sehr nahe kommt. Sie wurde nach John Dalton (1766-1844), dem Entwickler der Atomtheorie, benannt. Außer durch Coomassie-Blau- (Nachweisempfindlichkeit von $1\mu\text{g}$ - $0.1\mu\text{g}$) oder Silber-Färbung (Nachweisgrenze in ng Bereich) können Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung auch immunologisch detektiert werden. Dazu transferiert man die aufgetrennten Proteine auf eine „stationäre Phase“, eine Nitrozellulose-Membran. Der Transfer erfolgt ebenfalls unter angelegter Spannung, dabei wandern die immer noch negativ geladenen Proteine elektrophoretisch auf die Membran und werden dort fest gebunden.

2.3.5.3.4. Immunoblot, Färbung, Nachweis und Bestimmung der Proteine

Nachdem die Gewebeeextrakte durch Gelelektrophorese auf dem SDS-PAGE nach ihrer molaren Größe aufgetrennt sind, erfolgt der Transfer auf die Nitrocellulosemembran via Naß- oder „Semi-Dry“ Blot. Nach der Elektrophorese werden die Gele aus der BIO-RAD Apparatur genommen und das Sammelgel von Trenngel vorsichtig entfernt und verworfen. Die Orientierung des Gels darf dabei nicht verloren gehen. Dazu ist es sinnvoll, die Orientierung mit Markern und Positivkontrollen zu determinieren. Das Trenngel wird in eine Färbewanne (Wägeschälchen geeigneter Größe) überführt. Es wird soviel Färbelösung zugegeben, dass das Gel „schwimmen“ kann. Für den Naßblot kann die BIO-RAD Mini Trans-Blot Apparatur verwendet werden. Je Gel werden 4 Blatt Whatman® Papier und 1 Blatt Nitrocellulosemembran in 1x Blotpuffer befeuchtet. Zwei Blatt werden unter die Nitrocellulosemembran gelegt, darüber kommt das Gel und mit den beiden restlichen Whatman® Papieren wird das Ganze überdeckt. Luftblasen müssen unbedingt eliminiert werden. Dieser „Sandwich“ wird in die farblich orientierte „Gel Halterkassette“ für elektrophoretischen Transfer eingesetzt, in die Blot Kammer gegeben und mit 1x Blotpuffer befüllt. Der Blot erfolgt bei 400mA für ca 45min und wird durch die Bio-Eis Kühleinheit von BIO-RAD gekühlt. Eine andere Möglichkeit ist der „Semi Dry Blot“ oder halbtrockene Blot. Das Sandwichsystem erfolgt wie beim normalen Blot, doch befindet sich kein zusätzlicher Blotpuffer im

System. Der Sandwich aus Nitrocellulose und Gel, umschichtet von feuchtem Whatman® Papier, wird in dieser Reihenfolge in die PerfectBlue „Semi-Dry“ Elektroblot Apparatur eingesetzt und für 1.10h bei 190mA (bei 2 Gelen) geblottet. Der weitere Verlauf ist bei beiden Verfahren der Gleiche. Die Nitrocellulosemembran wird nach vollendetem Blot aus dem Sandwich entnommen. Durch Ponceau S Färbung kann der Blottransfer überprüft werden. Ponceau S kann anschließend mit ddH₂O und 1x TBST entfärbt werden. Für die weiteren Färbeschritte wird die Nitrocellulosemembran für 1h bei RT oder o/N bei 4°C in Bewegung in einer 5% Milchpulverlösung (in 1x TBSTPV) (Milchpuffer) geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Die Erstantikörperinkubation (1:1000) erfolgt bei RT für 2h oder o/N bei 4°C in 2.5-5% Milchpuffer in Bewegung. Nach dreimaligem Waschen in 1x TBST bei RT in Bewegung für je 10min. erfolgt die Peroxidase gekoppelte Zweitantikörperinkubation (1:5.000) für 1h bei RT in TBSTPV in Bewegung und anschließendes Waschen. Diesem Schritt folgt die standardisierte verstärkte Chemilumineszenz-Reaktion (ECL™), wobei die Membran in einer Färbeschale in einem 1:1 Gemisch der ECL™ Reagenzien 1 und 2 (je 1ml) bei Dunkelheit für ca 5min. inkubiert wird. Diese Reaktion basiert auf der durch das Enzym Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol, das im oxidierten Zustand Lichtphotonen emittiert, die durch „X-ray“ oder Hyperfilme™ detektiert werden. So kann der Peroxidase konjugierte Zweitantikörper den Erstantikörper binden, der wiederum seinerseits ein spezifisches Protein bindet und dieses mittels ECL™ Detektionsverfahren sichtbar machen.

2.3.5.3.5. „Strippen“/Ablösen von Antikörpern

Durch das Ablösen/„Strippen“ des Erst- und Zweitantikörpers ist es möglich, dass die Membran mehrfach mit alternativen Antikörpern beladen wird. Für zwei Gele benötigt man 21ml „Stripping“-Puffer, bestehend aus 20% SDS und 1M Tris/HCl (pH 6.7) mit 150µl 2-Mercaptoethanol. Die Membranen werden in gegengleicher Orientierung in eine Färbeschale mit „Stripping“-Puffer für 30min bei 50°C im Wasserbad oder Heizschrank inkubiert, wobei das System alle 10min vorsichtig geschüttelt wird. Nach dem Dekantieren der „Stripping“-Lösung wird die Nitrocellulosemembran mehrfach mit ddH₂O und TBST gewaschen, bis der Geruch des Mercaptoethanols vollständig verfliegen ist. Anschließend kann die Membran geblockt und wie bereits oben beschrieben neu mit weiteren Antikörpern beladen werden.

2.3.6. Auswertung

2.3.6.1. Mikroskopie

Die lichtmikroskopischen Analysen wurden mittels Leica Microdissection Mikroskop unter Verwendung eines 10x Objektivs durchgeführt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte manuell durch das Laser Microdissection V5.0 Programm (Leica). Die Auswertung und Bildgebung fluoreszenzmehrfachmarkierter Gewebepräparate wurde am Keyence BZ-8000 Fluoreszenzmikroskop mit einem 20xPlan APO Objektiv unter 40x Vergrößerung vollzogen, wobei hier das BZ-Analyzer Programm zur Verfügung stand. Mehrfachfärbungen wurden mittels z-stack Verfahren auf Kollokalisierung hin überprüft. Die erzeugten Bilder wurden anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop weiter bearbeitet.

2.3.6.2. Quantitative Auswertung

2.3.6.2.1. Definition der Auswertungsareale

Perfundierte Gehirngewebepräparate wurden zunächst manuell mit einem Skalpell halbiert. Zur weiteren Analysen stand die rechte Gehirnhälfte in OCT™ eingebettet und die linke Gehirnhälfte in

Paraffineinbettung zur Verfügung. Mediane Sagittalschnitte mit einer Schnittdicke von 10µm wurden auf Super Frost Plus Objektträgern in 10er Serien aufgezogen. Die ersten Schnitte einer Zehnerreihe (1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 11,..21,..) wurden jeweils zur DG-Volumenbestimmung durch Nissl gefärbt. Sie gaben gleichzeitig Aufschluss darüber, wie viele Schnitte für die Folgefärbungen analysiert werden mussten. Die darauffolgenden Schnittpräparate konnten für Immunfärbungen verwendet werden. Durch den Abstand von jeweils 100µm zwischen aufeinander folgenden Gewebepreparaten eines Objektträgers sollte verhindert werden, dass ein und dieselbe Zelle in einer Färbung mehrfach ausgewertet wird. Zur quantitativen Auswertung wurde jeweils ein Objektträger aus jeder Zehnerreihe mit vier Präparaten analysiert, und zwar ab dem Erscheinen des DG bis zu seiner Fusion. Das bedeutet, dass pro IHC Auswertung und Tier abhängig von der jeweiligen Entwicklungsstufe zwischen 20 und 24 Gewebepreparate untersucht wurden. Das untersuchte Areal wurde dabei nach räumlichen Begrenzungen in dorsal und ventral unterteilt. Zellen wurden in der gesamten Körnerzellschicht (GCL), die in SGZ, MZ und OZ unterteilt wurde, aber auch im Hilus und der Molekularschicht (ML) analysiert. Der Hilus wurde als eine zwei Zellschichten dicke Schicht vor der SGZ des GCL gerechnet, also als die Schicht definiert, aus der in frühen postnatalen Stadien die NPCs entspringen. Die weitere Unterteilung des GCL erfolgte analog Kempermann et al., 2003 (Fig. 1C).

2.3.6.2.2. Fehlerkalkulation

Um eventuelle Schnittverluste am Mikrotom auszugleichen, wurden die gezählten Zellzahlen anschließend durch das Nissl Gesamtvolumen des DG des jeweiligen Tieres geteilt. Diese Ergebnisse wurden tabellarisch als Zellzahl/mm³ dargestellt.

2.3.6.2.3. Quantifizierung

Zur Bestimmung des Zellschicksals BrdU markierter Zellen wurden IHC Doppelfärbungen mit Ki67, GFAP oder NeuN durchgeführt. Anschließend konnten in dem durch Nissl Färbung determinierten Bereich alle BrdU positiven Zellen im Hilus und GCL analysiert werden. Für die z-stack Analyse wurde der Fokus auf die BrdU-Markierung gelegt. Hierdurch sollte eine Fehlinterpretation durch falschpositive Zellen vermieden werden. Analysiert wurden jeweils geschlechts-gleiche Geschwistertierpaare eines Wurfes. Graphische Darstellungen zeigen die Mittelwerte von gleich alten Tieren gleichen Genotyps. Die statistische Auswertung erfolgte analog des Statistikkurses von Dipl. Mathematiker Christian Weiss durch *Statistika 8.0*. Parametrische Daten wurden mittels der „*t-Test für gepaarte Stichproben*“ Varianzanalyse ausgewertet, nicht-parametrische Daten folgten der „*Wilcoxon-Analyse für gepaarte Stichprobe*“. Die Normalverteilung wurde im *Quantile Plot* überprüft. Signifikante Unterschiede wurden als p-Wert (p-value) ausgedrückt.

p-value	
≤0,05	*
≤0,01	**
≤0,001	***

Tab.2.16. Signifikanzdeterminierung. P-value Werte ≤ 0.05 zeigen signifikante Unterschiede.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung CRAF-defizienter Mäuse und quantitative Auswertung der Zuchtergebnisse mit Letalitätsstudie

Die Generierung der CRAF knockout Mäuse (Nullmutante) erfolgte in Catrin Pritchards Labor in London. Für den Knockout (ko) von *raf-1* (*c-raf*) wurden die Exons 10-13, die für die Aminosäuren 338-472 codieren, durch ein Neomycin-Gen (*neo^R* Gen) ersetzt (M&M 2.1.8.1.). Wie bereits durch Hüser et al. (2001) publiziert, konnte die embryonale Letalität nullmutanter Tiere durch das Einkreuzen in den CD1 Auszuchtstamm überwunden werden. In dieser Arbeit wurden CRAF Mäuse verwendet, die durch weiteres Auskreuzen > 75% CD1 Gene hatten. Erst in diesem genetischen Hintergrund gelang es uns, nullmutante Tiere bis in die adulte Entwicklungsphase hinein zu analysieren und die Auswirkung einer CRAF Deletion auch im postnatalen System bis zu 55 Tage nach der Geburt zu erfassen. Die Zucht basierte ausschließlich auf der Verpaarung heterozygoter (CRAF^{+/-}) Tiere. CRAF nullmutante Mäuse im CD1 Hintergrund waren vorwiegend männlichen Geschlechts und zeigten trotz intakter Spermien keine positiven Anpaarungsergebnisse. Der Anteil an weiblichen adulten Nullmutanten war deutlich geringer, wobei diese Tiere vitaler im Vergleich zu männlichen Nullmutanten wirkten. Drei nullmutante Weibchen erreichten das postnatale Entwicklungsstadium P36; ein Weibchen wurde sogar am Tag P52 trächtig analysiert.

Aus der Verpaarung CRAF heterozygoter Tiere konnten wildtypische (wt) und heterozygote (ht) Nachkommen nach der erwarteten *Mendelschen* Frequenz (ko: ht: wt=1/4: 1/2: 1/4) detektiert werden, während die Anzahl nullmutanter (ko) Neugeborener nur in wenigen Ausnahmen der *Mendelschen* Regel entsprach (Tab.3.1.). Da nullmutante Neugeborene schon aufgrund ihrer reduzierten Körpergröße und helleren Hautfarbe optisch auffallend waren, konnten sie bereits zum Zeitpunkt P0 optisch als kleine Tiere („*small*“) erfasst werden. Die eigentliche Genotypisierung der Tiere durch Schwanzbiopsie erfolgte erst kurz vor dem Experiment, um die Tiere zu schonen. Bei jedem als „*small*“ deklarierten Tiere bestätigte sich dabei die phänotypische Auffälligkeit nach der Genotypisierung. Auch tote und noch nicht komplett kanibalisierte Neugeborene wurden genotypisiert. Veränderte Haltungsbedingungen reduzierten dabei die anfangs beobachtete Kanibalisierung der kleineren und schwächeren neugeborenen Nullmutanten. Trotz dieser Optimierung konnten von den im Zeitraum von 2006 bis 2009 detektierten 316 kleinen Neugeborenen („*small*“) (Tab.3.1.) nur 122 Nullmutante experimentell analysiert werden (Tab.3.2.).

Versuchszeitraum 2006-2009					
1 Kleiner/Wurf	2 Kleine/Wurf	3 Kleine/Wurf	4 Kleine/Wurf	5 Kleine/Wurf	6 Kleine/Wurf
230x	64x	16x	1x	4x	1x
				2x alle tot 1x 1 lebend 1x alle lebend	1x 5 tot

Tab.3.1. Häufigkeit und Anzahl detektierter kleiner Neugeborener je Wurf im Zeitraum von April 2006 bis Juni 2009. Nullmutante Neugeborene sind bereits zum Zeitpunkt ihrer Geburt (P0) phänotypisch leicht von ihren Geschwistertieren zu unterscheiden. Nur fünf von insgesamt 250 analysierten Würfen (aus n= 143 Verpaarungen) hatten zum Zeitpunkt der Geburt (P0) fünf bis sechs nullmutante Neugeborene bei einer Wurfgröße von 20 bis 24 Tieren. Lediglich ein Wurf erreichte mit der vollständigen Anzahl nullmutanter Neugeborener das adulte Entwicklungsstadium. Am häufigsten wurden ein bis zwei kleine Neugeborene („small“) pro Wurf bei einer Wurfgröße von 8 bis 24 Tieren detektiert. In 47 Würfen wurden keine Nullmutanten geboren.

Versuchsjahr	2006	2007	2008	2009	Summe
Permanentverpaarungen	23	59	35	26	143
Anzahl Würfe	44	77	84	45	250
Anzahl neugeborene Tiere	535	940	880	423	2778
Kleine Neugeborene detektiert	52	111	100	53	316
Nullmutante im Experiment	15	59	51	36	161
Nullmutante im Experiment tot	3	10	16	10	39
Nullmutante tot insgesamt	37	52	49	17	155

Tab.3.2. Darstellung der Verpaarungen, Geburtenraten und Anzahl kleiner Neugeborener während eines Zeitraumes von drei Jahren. Aus 143 Verpaarungen wurden 250 Würfe mit insgesamt 2778 Tieren geboren. 316 Neugeborene (11%) zeigten dabei eine auffällig reduzierte Körpergröße und erwiesen sich nach ihrer Genotypisierung als CRAF Nullmutante. Von diesen 316 Nullmutanten starben 155 Tiere, 39 davon, während sie an einem Versuch teilnahmen. 122 Nullmutante konnten schließlich experimentell analysiert werden. Das sind 4% der Gesamtanzahl an Tieren, die in diesem Zeitraum geboren wurden. Die Permanentverpaarungen wurden wochentags täglich auf Neugeborene untersucht. Würfe mit neugeborenen Nullmutanten wurden täglich kontrolliert. Durch die Umstellung auf Permanentverpaarung konnte die Anzahl lebender Nullmutanter von einem Tier auf bis zu zehn Tieren im Monat gesteigert werden. Die geschlechtsspezifische protokollarische Unterscheidung nullmutanter Tiere erfolgte erst bei den Langzeitexperimenten mit BrdU Applikation und durch Biopsielisten.

Lethalitätsstudie über 16 Monate	n=	
Anzahl Verpaarungen	22	
Anzahl Neugeborener	873	
(davon) kleine Neugeborene	110	13% der Neugeborenen
Anzahl nullmutanter Versuchstiere	24	22% der Nullmutanten
Davon: Tot am Tag P0/P1	74	67%
Tot am Tag P5/P6	6	6%
Tot am Tag P10/P12	3	3%
Tot am Tag P17	1	1%
Tot am Tag P20/P21	2	2%
Summe tot bis Tag P21	86	78%

Tab.3.3. Datensatz zur Letalitätsstudie (Abb.3.1.).

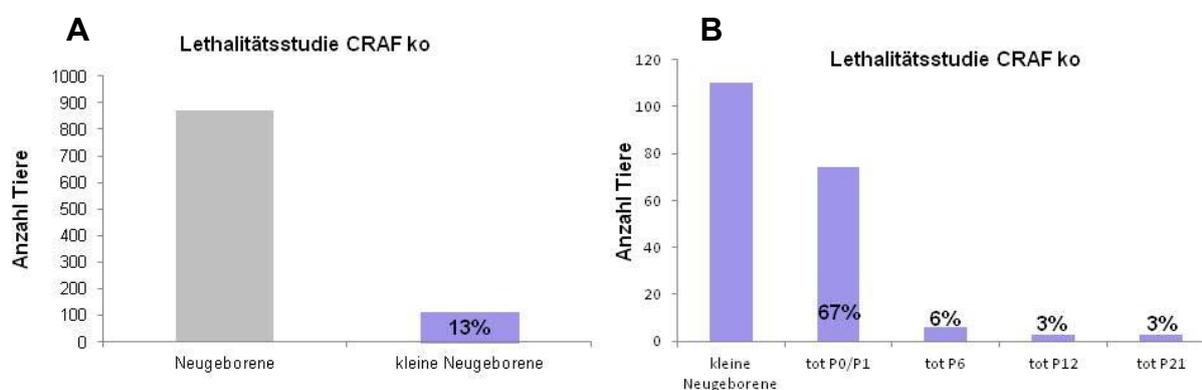


Abb.3.1. Bestimmung der Letalitätszeitpunkte über einen Zeitraum von 16 Monaten. Aus 22 Permanentverpaarungen werden 873 Tiere geboren, von denen ~13 % als kleine („small“) detektiert werden (A). (B) Lediglich ~3% der insgesamt in diesem Zeitraum geborenen Tiere gehen als CRAF ko Versuchstiere in die Experimente ein. 67% der Nullmutanten sterben bereits kurz nach ihrer Geburt (P0/P1), 73% sterben noch während der ersten Lebenswoche und über 78 % versterben noch vor Erreichen der adulten Entwicklungsphase (%-Werte wurden gerundet).

Die Letalitätsstudie CRAF nullmutanter Tiere über einen Zeitraum von 16 Monaten (Tab.3.3.) zeigt, dass 78% der neugeborenen Nullmutanten das adulte Entwicklungsstadium nicht erreichen und 67% der phänotypisch auffällig geborenen Tiere bereits kurz nach ihrer Geburt (P0/P1) verstarben. Während zu früheren, noch embryonalen Entwicklungszeitpunkten (E16.5) keine toten Nullmutanten detektiert wurden (n=2) (Tab.3.4.), häufte sich die Anzahl letal detektierte experimenteller Tiere um den Zeitpunkt der Geburt (Tab.3.5./Abb3.2./Abb.3.3.). Da bei der Maus eine Trächtigkeitsdauer zwischen 19 und 21 Tagen angenommen wird (Heinecke 1989), wurden weitere Embryonen zum Zeitpunkt ~E18 isoliert. Histologische Untersuchungen sollten Aufschluss über die Ursache der hohen Letalitätsrate nullmutanter Tiere um den Zeitpunkt der Geburt (Abb.3.2) geben.

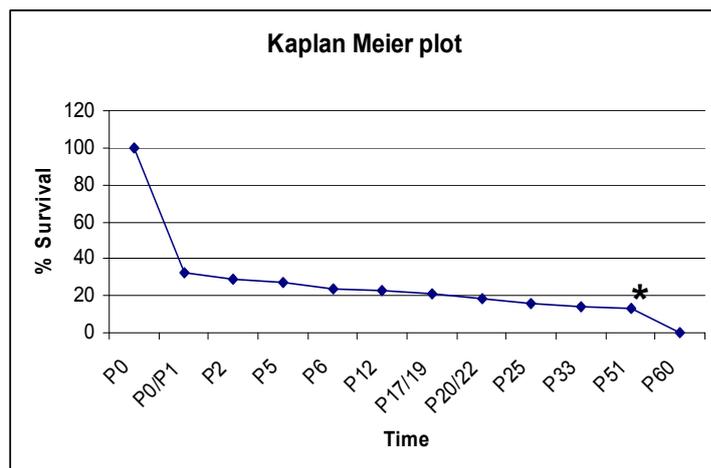


Abb.3.2. Kaplan Meier Plot.

Von n=110 detektierten neugeborenen Nullmutanten aus der Letalitätsstudie sterben nahezu 70% der Tiere kurz nach der Geburt. Nur wenige Tiere erreichen ein Lebensalter von über 30 Tagen, wobei n=3 Tiere bis zu dem postnatalen Entwicklungszeitpunkt P52/P55 lebend detektiert werden konnten (*spätester Zeitpunkt vital detektierter Tiere).

E16.5/E17	Wurfgröße	ko	tot	wt	tot	ht	tot
n=2	5	2	0	0	0	3	0
	18	4	0	4	0	10	0
Summe	23	6	0	4	0	13	0

Tab.3.4. Datensatz zur E16.5/E17 Embryo-Isolation (n=2). Aufgrund der geringen Versuchstiergröße sind statistische Aussagen hier nicht möglich. Nachdem ein Weibchen nullmutant (P52) und das andere heterozygot waren, sind Aussagen bezüglich der genetischen Verteilung nach Mendel nur einzelfallspezifisch möglich. (ko x ht: n=5 MR 2.5 (ko)/2.5 (ht); ht x ht: n=18 MR 4.5 (ko)/4.5 (wt)/9 (ht)). Bei beiden Tieren wurden die Embryonen nach der erwarteten *Mendelschen* Frequenz isoliert.

E18	Wurfgröße	ko	tot	wt	tot	ht	tot
	11	2	1	2	1	7	0
	16	4	2	7	0	5	0
	14	4	1	4	0	6	0
	10	2	0	1	0	7	0
	13	3	3	2	0	8	0
	12	4	1	3	0	5	0
	11	1	1	7	0	3	0
	16	2	0	6	0	8	0
	15	3	2	5	0	6	0
Summe	118	25	11	35	1	55	0
MR n=9		29,5		29,5		59	
%	100	17.2	7.6	26.9	1.4	55.9	0

Tab.3.5. Datensatz zur Embryo-Isolation zum Zeitpunkt E18 aus neun Sektionen. Die Embryonen stammten aus heterozygoten Verpaarungen. Von insgesamt 118 Embryonen waren 25 CRAF ko, 35 CRAF wt und 55 CRAF ht. Die Zahlen entsprachen dabei nahezu der erwarteten *Mendelschen* Frequenz (MR= *Mendelian* Ratio). 44% der detektierten Nullmutanten waren zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits tot. Von den 35 wildtypischen Embryonen war nur ein Tier tot, während alle heterozygoten Tiere zum Zeitpunkt E18 vital waren.

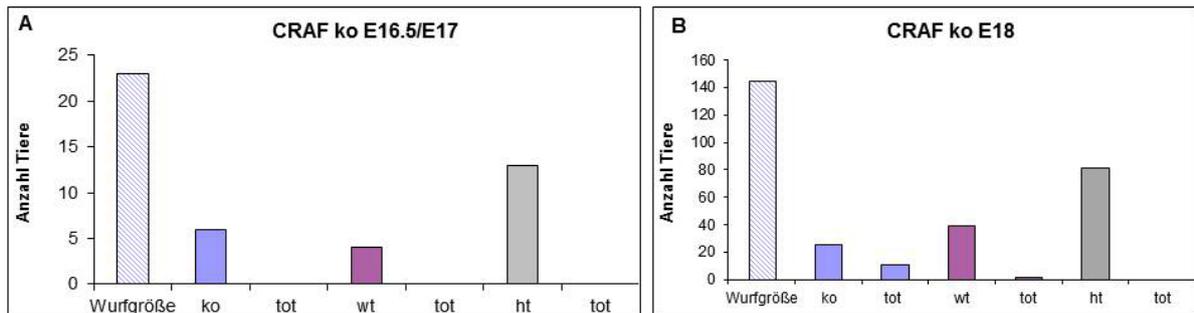


Abb.3.3. Graphische Darstellung der isolierten Embryonen zum Entwicklungszeitpunkt E16.5/E17 (A) und E18 (B).

3.2. Phänotypische Analyse CRAF-defizienter Tiere

3.2.1. CRAF-defiziente Embryonen

Bei der Sektion des ältesten adulten nullmutanten Weibchens (P52) konnten fünf Embryonen (~E16.5) lebend detektiert werden. Zwei Embryonen waren CRAF ko, die anderen drei heterozygot (Abb.3.4.). Wildtypische Tiere konnten durch die Verpaarungszusammensetzung nicht entstehen.

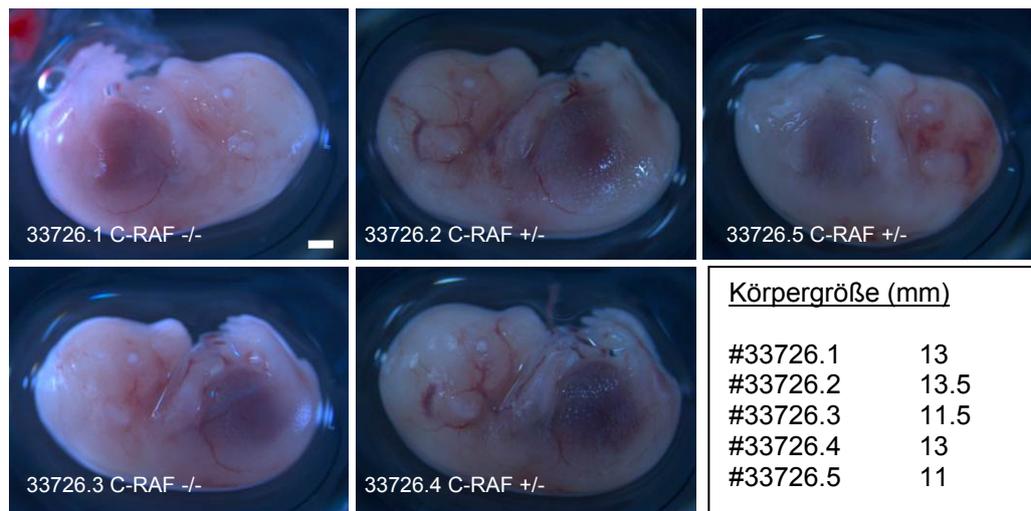


Abb.3.4. Embryonalstadium ~E16.5 CRAF-defizienter und heterozygoter Embryonen. Makroskopisch lassen sich keine Unterschiede in der Körpergröße (siehe Tabelle) oder Hautfarbe zwischen Nullmutanten und Kontroll-Embryonen erkennen. Größenstandard 1mm.

Auch weitere Sektionen zum Zeitpunkt ~E16.5 zeigten keine phänotypischen Auffälligkeiten zwischen Knockout-Embryonen und ihren Wurfgeschwistern (Abb.3.4.). Bereits zum Zeitpunkt E18 waren 44% der Nullmutanten tot (Tab.3.5). Die meisten E18 Nullmutanten waren deutlich kleiner als ihre Geschwistertiere und konnten zusätzlich auch über ihre etwas hellere Hautfarbe selektiert werden (Abb.3.5.). Auch die Plazenta zeigte sich deutlich in ihrer Größe reduziert (Abb.3.5.). Möglicherweise ist dies auch der Grund für die verminderte Körpergröße der Nullmutanten. Weitere Analysen der Plazenta wurden nicht durchgeführt.

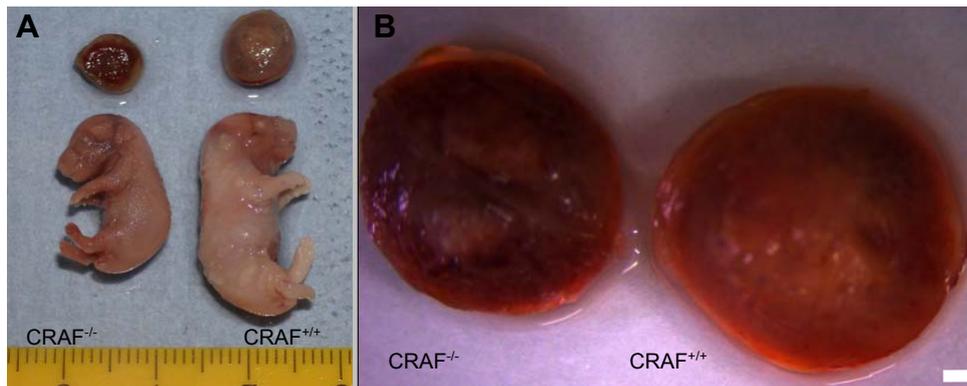


Abb.3.5. (A-B) Makroskopische Analyse CRAF-defizienter Embryonen und ihrer Plazenta zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E18. (A) Phänotypisch sind CRAF-defiziente E18 Embryonen bereits über ihre deutlich reduzierte Körpergröße detektierbar. (A-B) Auch die Plazenta der Nullmutanten ist im Vergleich zur Plazenta heterozygoter oder wildtypischer Versuchstiere deutlich in ihrer Größe reduziert. Größenstandard 1mm.

3.2.2. Postnatale CRAF-defiziente Mäuse

Neben den bereits genannten phänotypisch auffälligen Merkmalen konnte bei neugeborenen Nullmutanten auch eine Veränderung der Augen festgestellt werden (Abb.3.6.A). Normalerweise sind die Augenlider bei der Maus zum Zeitpunkt der Geburt (P0) geschlossen und öffnen sich erst postnatal am Tag P12/P13 (Findlater et al., 1993, Kaufman, 2002). CRAF Nullmutante werden jedoch häufig mit ein oder zwei geöffneten Augenlidern geboren (EOB- „eye open at birth“-Phänotyp) (Abb.3.6./Abb.3.7.). Oftmals entzündeten sich diese dann, weshalb die Tiere später Augenlidschluss-Probleme haben (Abb.3.8.B-C). Ob der EOB-Phänotyp zur Erblindung der Tiere oder einer Vernarbung der Augenlider nach einer möglichen Infektion führt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert.

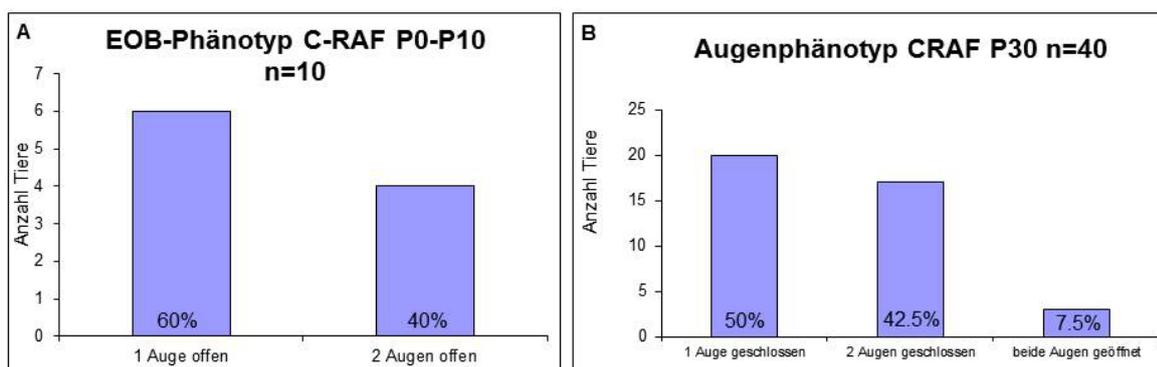


Abb.3.6. Augenphänotyp-Analyse CRAF-defizienter postnataler Tiere. (A) EOB Phänotyp am Tag P0-P10 (n=10) (B) Augen-Phänotyp zum Zeitpunkt P30 (n=40). (normal= beide Augen geöffnet).

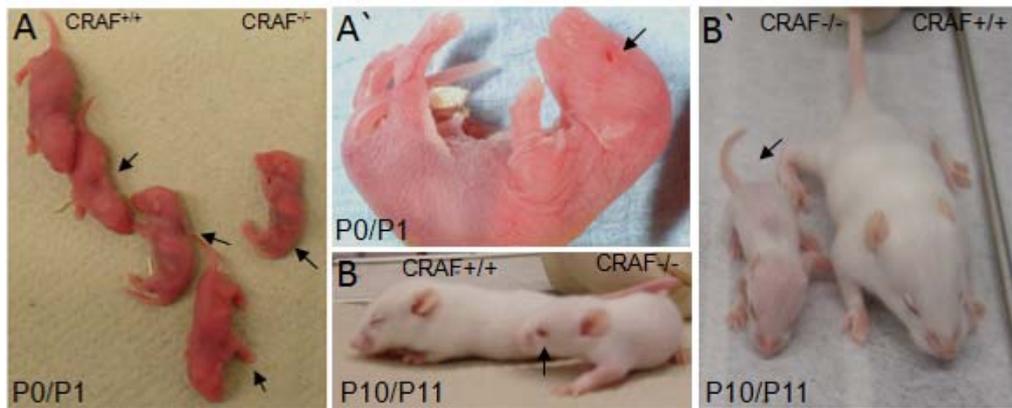


Abb.3.7. Phänotypische Auffälligkeiten CRAF-defizienter postnataler Tiere. (A) Neugeborene Nullmutanten sind deutlich kleiner als ihre Wurfgeschwistertiere und haben eine hellere Hautfarbe. (A') Die meisten Nullmutanten werden mit geöffneten Augenlidern (EOB-Phänotyp) geboren. (B) EOB-Phänotyp am Tag P10/P11 bei Nullmutanten. (B') Postnatale Nullmutante haben zu diesem Entwicklungszeitpunkt ein weniger dichtes Fell, welches die Haut durchscheinen lässt und sind deutlich kleiner als Kontrollgeschwistertiere. (A-B) Pfeile markieren nullmutante Tiere. (A' und B) Pfeile markieren EOB-Phänotyp.

3.2.3. Weitere phänotypischen Merkmale postnataler CRAF-defizienter Tiere

Eine weitere phänotypische Auffälligkeit besteht in der Körperhaltung CRAF-defizienter Tiere. Ältere postnatale Nullmutanten (P30) sitzen oft in sich zusammengekauert mit einer leicht buckeligen Haltung (Abb.3.8.D) und suchen dabei engen Körperkontakt zu ihren Artgenossen. Befindet sich ein Folgewurf der Elterntiere mit im Käfig, gesellen sich Nullmutante zu den Neugeborenen und lassen sich mitsäugen. Zusätzlich ernähren sie sich selbständig mit Fertigfutter und Wasser, doch der enge soziale Kontakt im Nest scheint einen positiven Einfluss auf ihre Lebenserwartung zu haben. Die hohe Letalitätssrate postnataler Tiere konnte so nachhaltig durch die veränderten Haltungsbedingungen (M&M.2.1.9.3.) vermindert werden was dazu führte, dass insgesamt mehr Nullmutante die adulte Entwicklungsphase erreichten. Durch die große Effizienz der Zucht nach Veränderung der Tierhaltungsbedingungen zusammen mit der gesteigerten Lebenserwartung nullmutanter Nachkommen konnte auch die Gesamtzahl an CRAF Mäusen im Zuchtbereich reduziert werden.

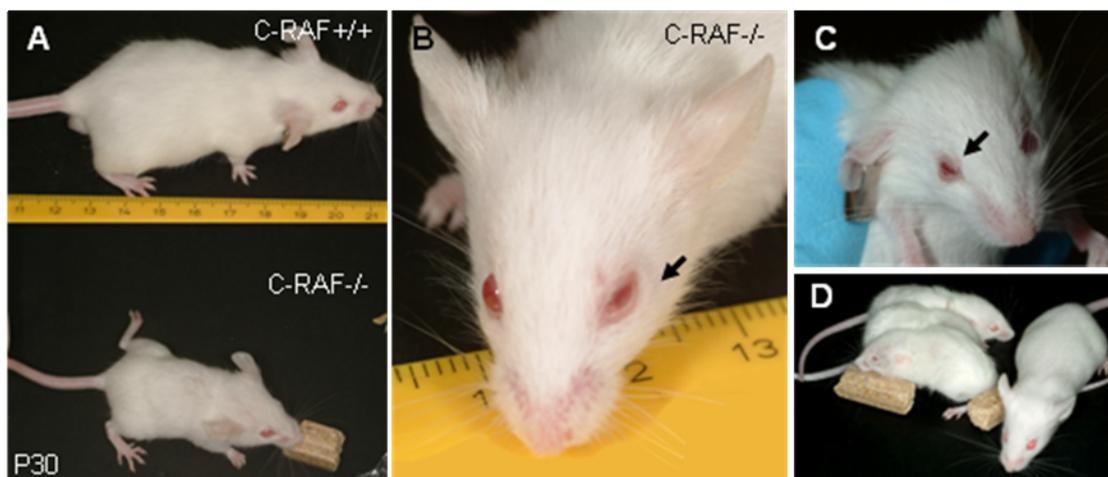


Abb.3.8. Phänotypische Auffälligkeiten junger adulter CRAF-defizienter Tiere.(A) CRAF-defiziente Tiere sind deutlich kleiner als Kontrollgeschwistertiere und haben zu diesem Entwicklungszeitpunkt oftmals Augenprobleme (B und C, Pfeile). (D) Die buckelige Haltung ist ein weiteres auffälliges Erkennungsmerkmal für postnatale Nullmutante, die engen Körperkontakt zu ihren Artgenossen suchen.

3.3. Vergleich von Körper- und Gehirngewicht

3.3.2. Gewichtsanalysen unter Standard-Tierhaltungsbedingungen (NC)

Nachdem die Unterschiede in der Körpergröße bereits zum Zeitpunkt der Geburt optisch gut erkennbar waren und mit zunehmendem Alter immer größer wurden (Abb.3.8.A), sollte auch das Körpergewicht der Tiere datenmäßig erfasst werden. Um weiterhin eine Relation zwischen Gewicht und Größe der Tiere feststellen zu können, wurde zusätzlich das Gehirngewicht nach Sektion der Tiere notiert. Gewichtsanalysen der Gehirngewebepräparate (Abb.3.9.), die nach Autopsie der Tiere durchgeführt wurden, bestätigen signifikante Unterschiede zwischen wildtypischen und CRAF-defizienten Tieren zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstufen in der Zeitkurve (P10-P55) (Abb.3.10.). Nichtsignifikante Unterschiede sind auf zu geringe Versuchstierzahlen der jeweiligen Entwicklungsstufe zurückzuführen.

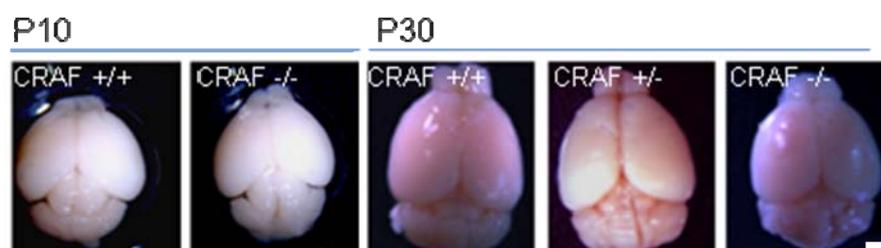


Abb.3.9. Gehirngewebepräparate P10 und P30 Tage alter Tiere. Nach der Sektion wurden die Gewebepräparate in Paraformaldehyd nachfixiert. Größenstandard 1mm.

Wildtypische und heterozygote Versuchstiere zeigen im Gewichtsvergleich der Gehirngewebepräparate zum Zeitpunkt P30/P34 keine Unterschiede (Abb.3.11.B), während die Gewichtsunterschiede zu Knockout-Tieren signifikant sind (Abb.3.11.B).

Zeitkurve	Alter									
Körperg. /g	P1	P10	P20	P23	P26	P30	P34	P38	P43	P55
CRAF ko	1,03	4,76	7,03	7,27	7,62	10,24	10,74	12,82	10,91	7,99
n=	5	18	11	10	4	40	9	10	2	1
S.E.M.	0.045	0.38	0.56	0.53	0.62	0.46	1.10	1.66	0.079	
CRAF ct	1,92	6,89	13,00	17,85	26,98	24,55	29,08	29,05	39,34	32,26
n=	3	18	10	10	3	57	12	8	2	1
S.E.M.	0.087	0.37	0.71	1.62	1.87	0.45	0.69	0.95	1.41	
p-value	0.019	0.000084	0.000009	0.000089	0.0095	0.0000001	0.000002	0.00004	0.029	
Gehirng. /g	P1	P10	P20	P23	P26	P30	P34	P38	P43	P55
CRAF ko	0,04	0,308	0,398	0,416	0,42	0,4157	0,42	0,41	0,41	0,43
n=	4	17	11	10	4	37	9	10	2	1
S.E.M.	0.019	0.015	0.013	0.0095	0.009	0.006	0.011	0.013	0.015	
CRAF ct	0,06	0,36	0,46	0,51	0,47	0,48	0,52	0,47	0,5	0,53
n=	2	17	10	10	3	52	12	8	2	1
S.E.M.	0.005	0.012	0.0107	0.019	0.013	0.0038	0.0098	0.018	0.2	
p-value	0.74	0.0013	0.012	0.0006	0.047	0.0000001	0.0007	0.096	0.22	

Tab.3.6. Datensatz zu Abb.3.10.

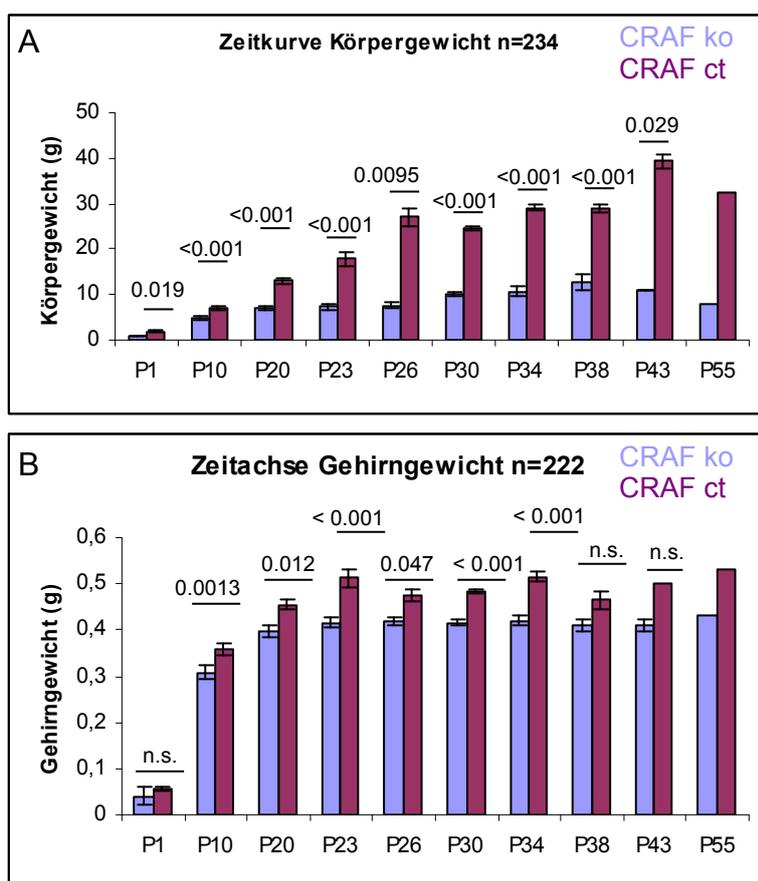


Abb.3.10. Graphische Darstellung der Körper- (A) und (B) Gehirngewichtsunterschiede zwischen CRAF ko und CRAF ct zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungszeitpunkten. Signifikante Unterschiede sind über den Altersstufen der x-Achse notiert. Die Daten wurden Sektionsprotokollen von Tieren aus Western Blot- oder histologischen Analysen entnommen.

Genotyp				ko/wt	wt/ht	ko/ht
Körpergewicht/g	CRAF ko	CRAF wt	CRAF ht	p-value	p-value	p-value
P30	10,24	24,55	23,03	0.0000001	0.14	0.0000001
P34 /38	10,74	29,08	29,05	0.000002	0.96	0.000004
Gehirngewicht/g						
P30	0,42	0,48	0,48	0.0000001	0.72	0.00004
P34/38	0,42	0,52	0,52	0.00069	0.64	0.0012

Tab.3.7. Datensatz zu Abb.3.11. (g=Gramm).

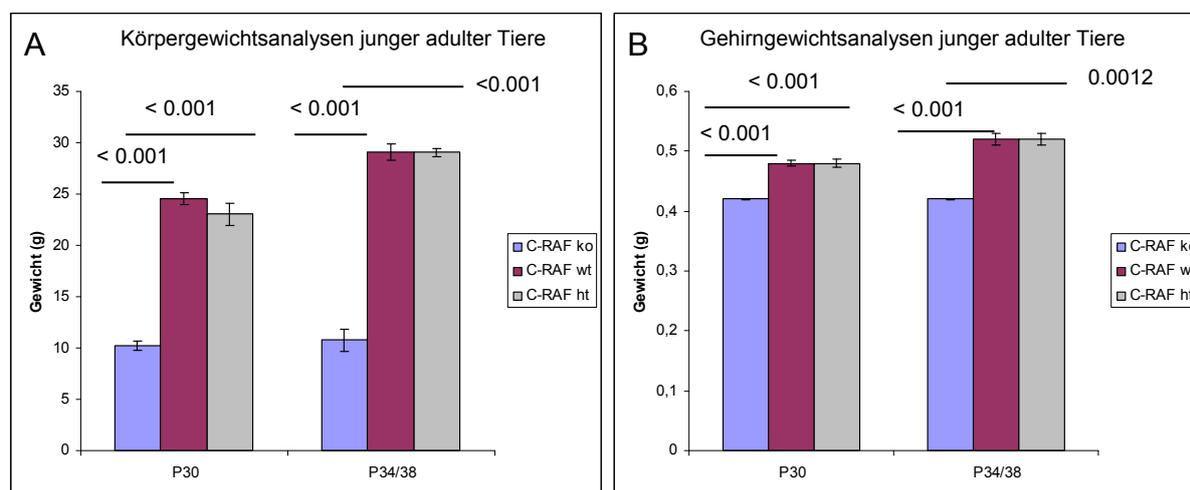


Abb.3.11. Graphische Darstellung von (A) Körper- und (B) Gehirngewicht junger adulter knockout-, wildtypischer und heterozygoter Tiere zum Zeitpunkt P30/P34. Aufgrund der nicht-signifikanten Unterschiede zwischen heterozygoten und wildtypischen Tieren wurden diese als Kontrollversuchstiere (ct) zusammengefasst.

Die Körpergewichtsanalysen junger adulter Mäuse verschiedenen Genotyps (P30 n=41 ko/wt; n=25 wt/ht; P34/38 n=9 ko/wt; n=7 wt/ht) zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen wildtypischen und nullmutanten Tieren, während der Unterschied zwischen wildtypischen und heterozygoten Tieren nicht signifikant war (Abb.3.11.A). Nachdem auch einige weibliche Tiere unter den Nullmutanten waren, wurde darauf geachtet, dass Versuchspaare nicht nur denselben genetischen Hintergrund hatten, sondern zusätzlich auch das gleiche Geschlecht besaßen.

Während die Gewichtsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen jungen adulten Nullmutanten nicht signifikant waren (Abb.3.12.A-B), zeigten sich signifikante Unterschiede im Körpergewicht von Männchen und Weibchen (n=11) bei wildtypischen Tieren (Abb.3.12.A). Das Gehirngewicht weiblicher Tiere war trotz signifikant reduziertem Körpergewicht etwas schwerer, als das der wildtypischen Männchen (Abb.3.12.B). Bei heterozygoten Weibchen konnten signifikante Unterschiede im Gehirngewicht verglichen mit heterozygoten Männchen analysiert werden (Abb.3.12.B). Auch hier hatten weibliche Tiere etwas weniger Körpergewicht als männliche Tiere (n=5). Aufgrund der nicht-signifikanten Unterschiede bei wildtypischen und heterozygoten Tieren (Abb.3.11.) wurden diese als Kontrollversuchstiere (ct) zusammengefasst.

Körpergewicht	P30ko	P30wt	P30ht
Weibchen	13,08	21,07	23,71
S.E.M.	1.97	1.43	0.78
Männchen	10,24	25,38	23,03
S.E.M.	0.46	0.45	1.08
p-value	0.34	0.003	0.51
Gehirngewicht	P30ko	P30wt	P30ht
Weibchen	0,44	0,51	0,52
S.E.M.	0.02	0.004	0.009
Männchen	0,43	0,49	0,48
S.E.M.	0.006	0.0038	0.007
p-value	0.94	0.84	0.0087

Tab.3.8. Datensatz zu Abb.3.12.

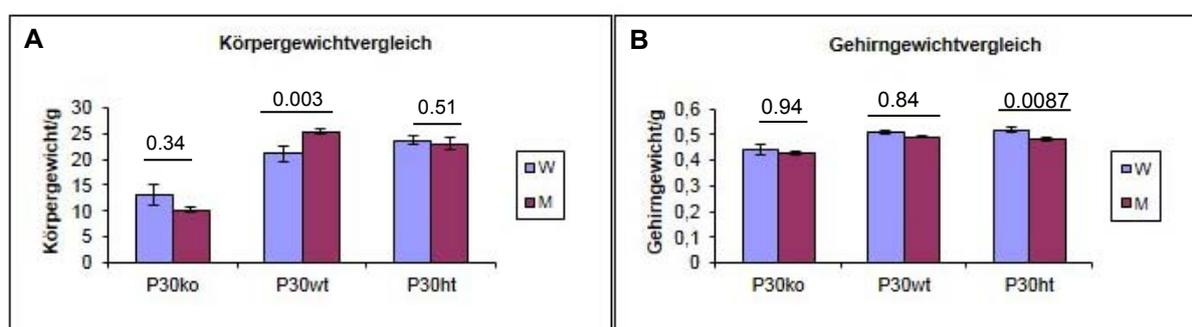


Abb.3.12. (A) Körpergewichts- und (B) Gehirngewichtvergleich zwischen männlichen (M) und weiblichen (W) Versuchstieren eines Genotyps. Nullmutante zeigen keine signifikanten Unterschiede im Gehirn- und Körpergewicht (A und B). (A) Wildtypische Weibchen haben ein signifikant reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu wildtypischen Männchen, während das Gehirngewicht (B) im Vergleich zu männlichen Versuchstieren keine signifikanten Unterschiede zeigt. Bei heterozygoten Weibchen ist das Gehirngewicht (B) signifikant gegenüber dem männlicher Tiere erhöht.

Nullmutante und Kontrollversuchstiere wurden aus einem Wurf ausgewählt, wobei weibliche und männliche Versuchstierpaare anschließend gemeinsam analysiert wurden. Durch die BrdU-Langzeitexperimente, die eine chase-Phase von zwölf Tagen erfassten und bei denen die Versuchstiere täglich eine Gewichts-Dosis-abhängige-BrdU Applikation von 50mg/kg Körpergewicht erhielten, konnten zusätzliche Daten über die Gewichtszunahme der Versuchstiere ermittelt werden. Die geringste Körpergewichtszunahme (Δ 38%) zeigte sich dabei bei nullmutanten Tieren (Abb.3.13.). Wildtypische und heterozygote Versuchstiere hatten keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtszunahme ($p=0,068$). Für den Zeitraum dieser Studie standen lediglich männliche Nullmutante zur Verfügung. Auf eine geschlechtsspezifische Unterteilung der Versuchstiere konnte somit verzichtet werden.

Gewichtszunahme nach zwölf Tagen									
	P23			P34			Δ P34/P23		
	ko	wt	ht	ko	wt	ht	Δ ko	Δ wt	Δ ht
average	6,95	14,13	16,54	11,25	29,20	29,99	4,29	15,08	13,45
S.E.M.	0.51	1.69	1.53	1.55	0.98	1.09	1.20	0.91	0.80
p-value							0.016	0.000003	0.000074
p-value ko/wt							0.000049		
p-value ko/ht							0.0081		
p-value wt/ht								0.068	
ΔP23/P34	62%	48%	55%						

Tab.3.9. Datensatz zu Abb.3.13.

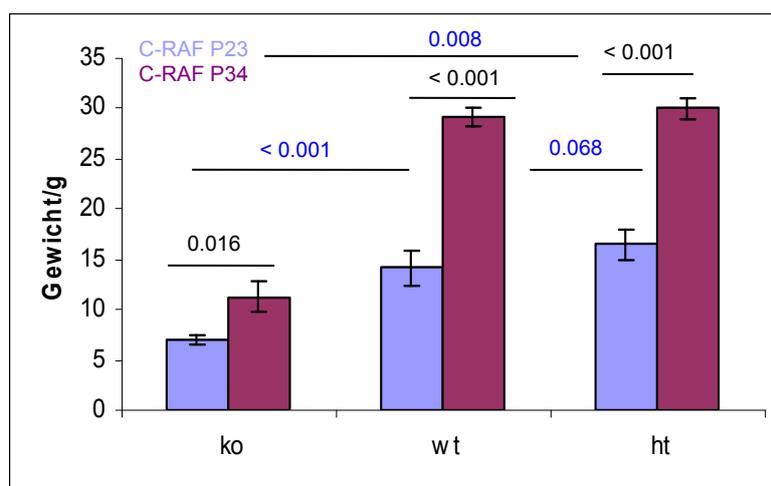


Abb.3.13. Graphische Darstellung der Gewichtszunahme während einer chase-Phase von zwölf Tagen. Blau dargestellt sind die Gewichtsdaten zu Beginn des Experiments, rot dargestellt sind die Gewichtsdaten nach einer chase-Phase von zwölf Tagen. P-value = Δ P23/P34. Vergleichende Analysen zwischen den Genotypen sind durch blaue Zahlenwerte gekennzeichnet, während schwarze Zahlenwerte Unterschiede in der Gewichtszunahme eines Genotyps aufzeigen. Wie zu erwarten, waren die Unterschiede in der Gewichtszunahme zwischen heterozygoten und wildtypischen Versuchstieren nicht signifikant. Nullmutante zeigen dagegen eine signifikant reduzierte Gewichtszunahme im Vergleich zu wildtypischen, wie auch zu heterozygoten Versuchstieren. Die größte Gewichtszunahme verzeichneten wildtypische Versuchstiere, die ihr Gewicht nach zwölf Tagen chase-Phase bereits mehr als verdoppelt hatten. Wie erwartet wurde die geringste Zunahme an Körpergewicht bei Nullmutanten beobachtet (Zunahme um Faktor 1.62).

3.3.3. Gewichtsanalysen unter dem Einfluss einer angereicherten Umgebung (ERV)

Verschiedene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass auch die Tierhaltungsbedingungen einen Einfluss auf die Neubildung von Nervenzellen haben. Dabei wurde eine verstärkte Neuroneogenese im Gehirn von Ratten bzw. Mäusen in einer angereicherten Umgebung beobachtet (Kronenberg et al., 2005, Kempermann et al., 1997, 1998, Ra et al., 2002, van Praag et al., 1999, Wu et al., 2008). Auch in dieser Arbeit sollte der Einfluss einer angereicherten Umgebung auf die Neusynthese von Nervenzellen bei Mäusen mit einer CRAF Nullmutation beobachtet werden. Um dabei die Tierhaltungsbedingungen für die

Nullmutanten optimal zu halten (3.2.3.), wurde die komplette Permanentverpaarung zusammen mit den CRAF nullmutanten Jungtieren in einen Erlebnisstall (M&M.2.1.9.2) umgesiedelt. In dieser neuen Umgebung waren die Tiere nicht nur mehr Umweltreizen ausgesetzt, sondern hatten auch einen viel größeren Bewegungsfreiraum zur Verfügung. Dabei bewegten sich nullmutante Tiere ebenso zwischen den Käfigebenen fort wie Kontrollversuchstiere. Aufgrund ihres zu geringen Körpergewichts gelang es den nullmutanten Jungtieren jedoch nicht, sich im Laufrad zu bewegen. Ansonsten wurden alle Gegenstände und Umweltreize gleichermaßen genutzt. Die reizreiche Umgebung animierte alle Bewohner zu einer vermehrten Bewegungsaktivität. Dabei war der Augenphänotyp der Nullmutanten kein Handicap in der Bewegungsfreiheit. Körpergewichtsanalysen der Tiere unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen zeigten unterschiedliche Auswirkungen bei den einzelnen Genotypen. Während bei wildtypischen und heterozygoten Tieren eine Körpergewichtszunahme unter ERV-Tierhaltungsbedingung beobachtet wurde, verringerte sich das Gewicht der Nullmutanten in der reizreichen Umgebung (Abb.3.14.). Warum die Nullmutanten in der reizreichen Umgebung nicht an Körpersubstanz zulegen und trotzdem ein höheres Lebensalter im Vergleich zu Nullmutanten, die unter Standard-Tierhaltungsbedingungen gehalten wurden erreichten, wurde im Rahmen dieser Studie nicht weiter ermittelt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte jedoch Stress sein.

P30, n=6	ko	wt	ht	p-value ko/ko	p-value wt/wt	p-value ht/ht
Körpergewicht				0.65	0.13	0.86
NC	10,24	25,38	23,03			
S.E.M.	0.46	0.45	1.09			
ERV	7,61	27,58	25,6			
S.E.M.	1.65	1.36	2.63			
Gehirngewicht						
NC	0,42	0,48	0,48	0.13	0.17	0.55
S.E.M.	0.006	0.004	0.007			
ERV	0,36	0,49	0,56			
S.E.M.	0.02	0.02	0.09			

Tab.3.10. Datensatz zur quantitativen Auswertung von Körper-/Gehirngewicht unter NEV bzw. ERV Bedingung. (NC= normal cage; Standard-Tierhaltungsbedingungen; ERV= enriched environment; angereicherte Umgebung). Die quantitativen Analysen von Körper- und Gehirngewicht junger adulter (P30) Tiere unterschiedlichen Genotyps zeigt keine signifikanten Unterschiede unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen. Auffällig ist die Gewichtsreduktion nullmutanter Tiere unter ERV Bedingungen. Während die Körpergewichtsdifferenz zwischen NC/ERV Tierhaltung Δ 26% beträgt, ist auch das Gehirngewicht der Versuchstiere in der angereicherten Umgebung um Δ 14% reduziert. Bei den Kontrollversuchstieren sind sowohl Körpergewicht und Gehirngewicht in der angereicherten Umgebung leicht erhöht. Vereinzelt erreichten Nullmutanten unter ERV Tierhaltungsbedingungen ein höheres Lebensalter im Vergleich zu NC Tierhaltungsbedingungen (ERV P52/P55; n=3).

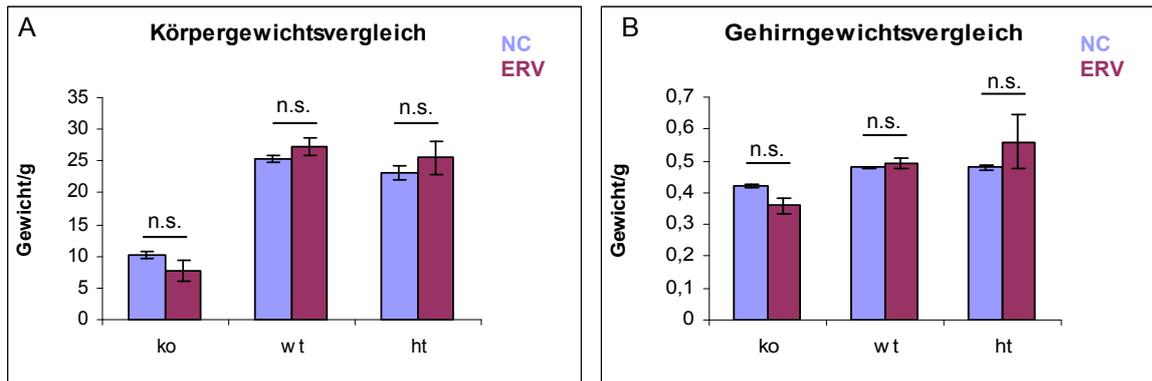


Abb.3.14. Graphische Darstellung der quantitativen Analyse von (A) Körpergewicht und (B) Gehirngewicht zwischen genotypisch identischen Tieren unter NC/ERV Tierhaltungsbedingungen.

3.4. Verhaltensbeobachtungen

CRAF-defiziente CD1 Tiere unterscheiden sich ab dem Zeitpunkt ihrer Geburt nicht nur optisch durch ihre Körpergröße, Felddichte und den EOB-Phänotyp von ihren Wurfgeschwistern, sondern zeigen zu frühen adulten Entwicklungsstufen auch Verhaltensauffälligkeiten. Sie gesellen sich vorwiegend zu den Folgewürfen ihrer Eltern und suchen dabei engen Körperkontakt zu ihren Artgenossen (Abb.3.8.D). Auch junge adulte Nullmutante ließen sich mitsäugen, obwohl sie selbständig feste und flüssige Nahrung zu sich nehmen konnten. Weitere Beobachtungen zeigten, dass diese Tiere teilweise Probleme in der Bewegungskoordination, wie auch in der Balance auf einem schmalen Gegenstand hatten (Abb.3.15.F-I). Setzte man die Nullmutanten so am Rand ihres Käfiggitters ab, dass sie ausschließlich Kontakt mit den Vorderextremitäten zum Gitter hatten, gelang es den Tieren nicht, sich aus eigener Kraft am Gitterrand hochzuziehen (Abb. 3.15.F-G). Setzte man sie hingegen so an den Gitterrand, dass sie Vorder- und Hinter-Extremitäten am Gitter ansetzten, konnten sie sich mühelos auf das Käfiggitter hochziehen. Beim Balancieren auf einer dünnen Stange oder beispielsweise einem Lineal versagten Nullmutante bereits nach wenigen Sekunden (Abb.3.15.H,I). Kontrollversuchstiere (Abb.3.15.A-E) konnten sich hingegen mühelos und teilweise akrobatisch auf dem schmalen Gegenstand fortbewegen und dabei sogar einen Richtungswechsel vollziehen (Abb.3.15.C-E).



Abb.3.15. (A-I) Verhaltensanalysen der Bewegungskoordination und Balance bei jungen adulten Mäusen. (A-E) wildtypische Tiere. (A und B) Mühelos halten sich wildtypische Tiere mit einem Bein am Käfiggitter fest, während der Schwanz unterstützend eingesetzt wird. Auch das Balancieren auf der dünnen Stange erfolgt in allen Lebenslagen (C-E). Dabei gelingt Kontrolltieren sogar ein Richtungswechsel. (F-I) Junge adulte Nullmutante können sich nicht über ihre Vorderextremitäten am Käfiggitterrand hochziehen. Die Koordination der hinteren Extremitäten erfolgt nicht zielgerichtet und so gelingt es diesen Tieren nur, sich für wenige Sekunden am Gitterrand zu halten (F-G). Auch das Balancieren auf der dünnen Stange ist für sie nicht möglich, da sie schon nach weniger als einer Sekunde das Gleichgewicht verlieren (H-I).

Durch die beobachteten Gleichgewichts- und Bewegungskordinations-Auffälligkeiten der jungen adulten Nullmutanten wollten wir auch die motorischen Fähigkeiten der Tiere analysieren. Bei diesem motorischen Verhaltenstest standen uns drei junge adulte Nullmutante aus unterschiedlichen Würfen mit ihren Kontrollgeschwistern zur Verfügung. Als erstes wollten wir das Verhalten der Tiere im Laufrad (*Rotarod*) testen (Abb.3.16.). Zur Eingewöhnung wurden die Tiere einem Probelauf unterzogen (Tab.3.11.). In drei aufeinanderfolgenden Testläufen konnte dann die Verweildauer der Tiere auf dem Laufrad gemessen werden. Dabei steigerte sich die Drehgeschwindigkeit des Laufrads langsam. Ein wildtypisches Geschwistertier stellte den Referenzwert dar.

Rotarod-Experiment					
Zeit (Sekunden)	Probe	1. Testlauf	2. Testlauf	3. Testlauf	Average Test 1-3
CRAF ko1	98	38	41	100	59,66
CRAF ko2	75	156	144	210	170
CRAF ko3	89	71	18	130	73
CRAF wt	92	30	220	250	166,66

Tab.3.11. Datensatz zum Rotarod Experiment. Bei den Versuchstieren handelt es sich um junge adulte männliche CD1 Mäuse zum Zeitpunkt P30. Den Referenzwert stellte ein wildtypisches Kontrolltier dar. Alle Tiere wurden vor der Messung einem Probelauf unterzogen. Anschließend wurden drei Messreihen hintereinander durchgeführt. Pro Tier wurden die Einzelmessungen zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die Zeitmessung für das Verweilen auf dem Rotarod wurde durch das Herunterfallen der Tiere auf eine spezielle Klappe gestoppt. Zwei der insgesamt drei analysierten Nullmutanten konnten sich nur knapp eine Minute auf dem Rotarod halten, während ein weiteres Tier 170 Sekunden erreichte. Das Kontrolltier schaffte hingegen nur ~167 Sekunden. Nullmutante Versuchstiere können auf dem Rotarod also gleichwertige Messergebnisse wie ihre wildtypischen Geschwister erreichen und sind demnach in ihren motorischen Fähigkeiten nicht eingeschränkt.

Durch die Messergebnisse aus dem *Rotarod*-Experiment ist davon auszugehen, dass nullmutante Tiere in ihren motorischen Fähigkeiten (auf dem Laufrad) keine Beeinträchtigung haben. Auch wenn zwei Nullmutante eine relativ kurze Verweildauer auf dem Laufrad zeigten (Tab.3.11.), erreichte das zweite experimentelle Tier (ko2) sogar bessere Messergebnisse als das Referenztier. Für einen weiteren Test wurden dieselben Tiere in ein ca. sechs cm tiefes Wasserbecken gesetzt. Die Tiere wurden hier u.a. in ihrem Schwimmverhalten analysiert. Es konnten keine Veränderungen beim Schwimmen im Becken beobachtet werden (Abb.3.16.D). Alle Tiere bewegten sich mit Hilfe von Paddelbewegungen ihrer Extremitäten im Wasser fort und setzten ihren Schwanz zur Steuerung ein. Lediglich das Herausklettern aus dem Becken stellte für einen Teil der Nullmutanten ein Problem dar, während die Kontrolltiere auch dieses Hindernis mühelos überwandern (Abb.3.16.). Eine mögliche Ursache hierfür könnte im Größenunterschied der Tiere liegen, da die Nullmutanten sich auch hier nur durch ihre Vorderextremitäten aus dem Wasserbad herausziehen konnten, während die größeren Kontrolltiere sich am Boden des Wasserbades abstoßen konnten, um aus dem Becken heraus zu kommen (Abb.3.16.). Bei zwei weiteren nullmutanten Tieren konnte ein *Epilepsie*-ähnliches krampfendes Verhalten über mehrere Sekunden beobachtet werden (Abb.3.17.A und C), während sich die Tiere nach dem Krampfanfall wieder völlig normal fortbewegen konnten (Abb.3.17.B). Eines der Tiere zeigte dieses Verhalten bereits am Tag P13, während das zweite auffällige Tier zu den ältesten Nullmutanten mit einem Alter von P54 zählte. In beiden Fällen waren nullmutante Männchen betroffen. Bei beiden Tieren wurden die Anfälle per Zufall beobachtet, so dass zusätzliche *Epilepsie*-ähnliche Anfälle nicht ausgeschlossen werden können.

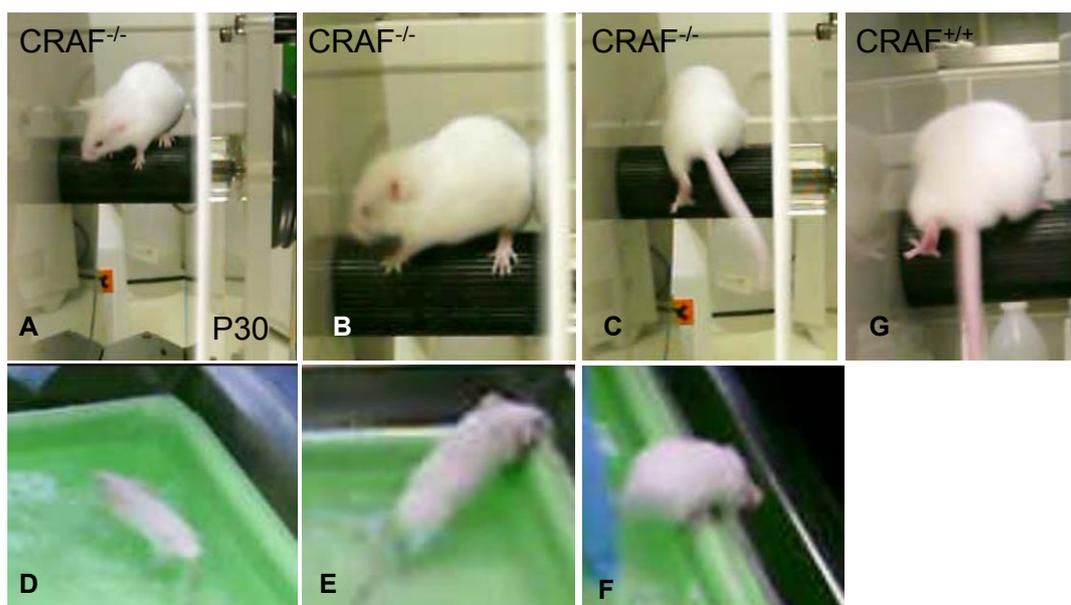


Abb.3.16. Motorische Funktionen wie Laufen auf dem Rotarod (A-C) und Schwimmen (D) sind bei jungen adulten Nullmutanten nicht beeinträchtigt. (A-C) Nullmutante Tiere drehen sich sogar auf dem Rotarod. (G) Kontrolltier. Das Überwinden des Beckenrandes ist für CRAF-defiziente Tiere mit Schwierigkeiten verbunden (E und F).



Abb.3.17. Epilepsie-ähnlicher Phänotyp bei CRAF-defizienten postnatalen Tieren (A und C). (B) Tier A kurz nach einem Anfall.

3.5. Histologische und makroskopische Gewebeanalyse CRAF-defizienter postnataler Tiere

3.5.1. Kleinhirn

Durch die beobachteten Verhaltensauffälligkeiten, wie das fehlende Gleichgewicht der nullmutanten Tiere beim Balancieren auf der Stange (Abb.3.15.), sollte das Gehirn der Tiere in Zusammenarbeit mit Prof. H. Heinsen vom Institut für Psychiatrie, morphologische Hirnforschungseinheit der Universität Würzburg genauer untersucht werden (Abb.3.9.). Dabei zeigten sich auffällige strukturelle Veränderungen im Kleinhirn (Abb.3.18.), dem vor allem Aufgaben zugeordnet werden, die die Motorik betreffen. Zu den physiologischen Aufgaben des Kleinhirns zählt mitunter die Kontrolle über die Halte- und Stützmotorik und die Bewegungskoordination. Gliedert man das Cerebellum nach phylogenetischen Aspekten, so unterscheidet man zwischen dem ältesten Teil, dem Archi-Cerebellum, das aufgrund seiner

Verbindung zum Vestibularorgan häufig auch als Vestibulo-Cerebellum bezeichnet wird, dem Palaeo-Cerebellum, das durch seine Verbindung zum Rückenmark auch Spino-Cerebellum genannt wird, und dem Neo-Cerebellum. Unterteilt man das Kleinhirn in verschiedene transversale Fissuren, entspricht das Archi-Cerebellum, das durch den *Lobus flocculonodularis* repräsentiert wird, nach Larsell (1952) dem Lobus (L) LX. Dem Palaeo-Cerebellum, das wichtige Aufgaben in der Kontrolle der Halte- und Stützmotorik übernimmt, werden die Lobuli LI-V zugeordnet (<http://www.lrz.de/~kolb/lecture/cbl/cbl.htm>).

Klinische Analysen, bei denen cerebelläre Störungen nach phylogenetischen Aspekten betrachtet wurden konnten zeigen, dass Gleichgewichtsstörungen auf Veränderungen im Archi-Cerebellum zurückzuführen sind, während das Palaeo-Cerebellum bei Veränderungen in der Halte- und Stützmotorik verantwortlich gemacht wurde. Veränderungen im Neo-Cerebellum führten hingegen zu einer Beeinträchtigung der Zielmotorik, wodurch die „fehlende Koordination verschiedener Muskelgruppen“ hervorgerufen wurde (<http://www.lrz.de/~kolb/lecture/cbl/cbl.htm>). Die makroskopisch beobachteten Veränderungen des Kleinhirns bei CRAF-defizienten Mäusen könnten eine mögliche Ursache für die beeinträchtigte Bewegung beim Balancieren auf der Stange sein. Um hier eine genauere Aussage treffen zu können, wurden die Gehirnpräparate fixiert und anschließend histologisch analysiert (Abb.3.19.). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass nullmutante Tiere ihren Schwanz nicht als Hilfsmittel in der Stütz- und Haltemotorik einsetzen, wie es bei wildtypischen Tieren am Gitterrand oder beim Balancieren beobachtet wurde. Auch hier könnte die Ursache in den cytoarchitektonischen Veränderungen des Kleinhirns (Abb.3.19.) liegen.

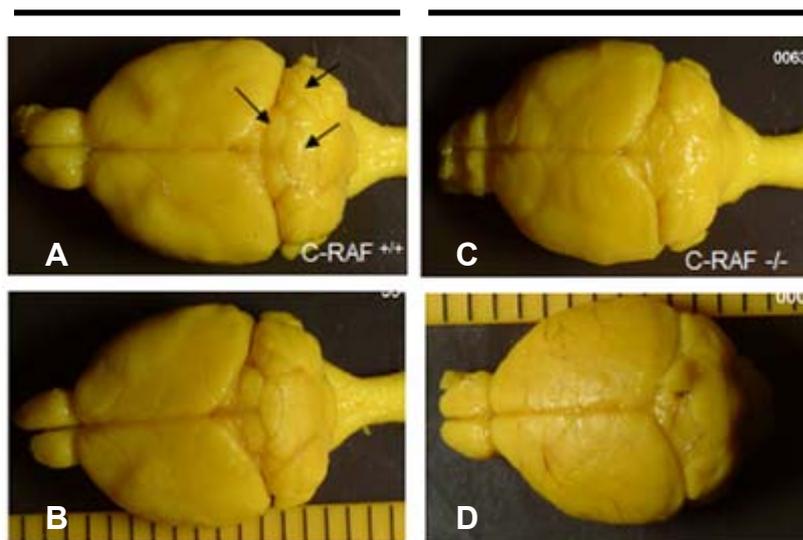


Abb.3.18. Makroskopische Gehirnanalyse junger adulter CD1 Tiere (A-D). (C-D) Junges adultes nullmutantes Tier. (A-B) Kontrolltier. Das Gehirn des CRAF nullmutanten Tieres wirkt kurz und abgerundet, während das Kontrolltiergehirn etwas langgezogener erscheint. Makroskopisch sind bereits Veränderungen im Bereich des Kleinhirns zu erkennen ((A)

Pfeile markieren Bereiche im Kleinhirn des Kontrolltiers, die beim CRAF-defizienten Versuchstier (C) weniger gut ausgebildet sind.)

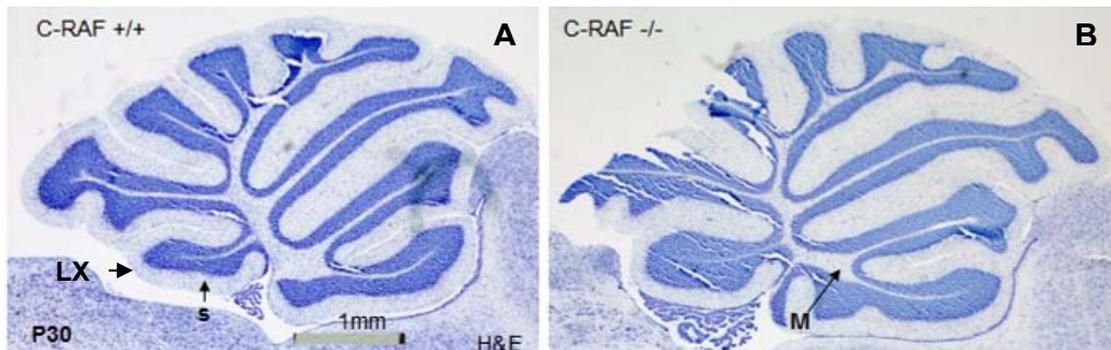


Abb.3.19. Histologische Gewebeanalyse der Gehirnpräparate junger adulter Tiere (P30). Beim Kontrollversuchstier (A) ist der Lobus LX lang ausgezogen. Andeutungsweise ist ein *Sulcus* (s) vorhanden. Der zentrale Markstrahl (M) ist stark ausgebildet. Bei der Nullmutanten (B) ist der zentrale Markstrahl hingegen nur schwach ausgebildet. LX ist sehr plump ausgebildet und hypoplastisch. Teilweise fehlen cytoarchitektonische Teile des Kleinhirns.

3.5.2. Andere Organe

Nachdem von unseren CRAF-defizienten Mäusen nur ~11% älter als P34 wurden (14 von 125 Tieren >P34), sollten Organanalysen von Gewebepreparaten der Lunge, Leber und Niere Aufschluss über eine mögliche organbedingte Todesursache der postnatalen Tiere geben (Tab.3.12.).

P32	Körper	Gehirn	Lunge	Leber	Hoden	Niere	Lunge/Körper	Leber/Körper	Niere/Körper
av ko	6,38	0,4	0,24	0,42	0,07	0,11	0,04	0,066	0,02
%							4.12%	6.59%	2.2%
av wt	26,99	0,52	0,52	2,49	0,31	0,49	0,019	0,09	0,019
%							1.95%	9.06%	1.9%

Tab.3.12. Datensatz der Organgewichte CRAF-defizienter Tiere im CD1 Hintergrund im Verhältnis zum Körpergewicht der Versuchstiere. Gewichtsangaben (g).

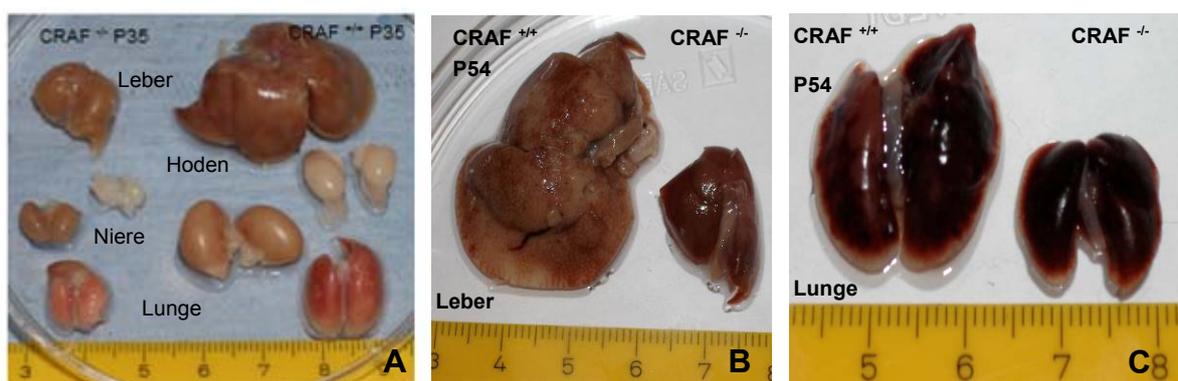


Abb.3.20. Makroskopische Übersicht der Gewebepreparate junger adulter CD1 Tiere. (A) Sektionsübersicht von Leber, Hoden, Niere und Lunge eines adulten CRAF-defizienten (P35) Tieres im Vergleich zum Kontrolltier. (B-C) Nullmutante Tiere (P54) sind deutlich kleiner als ihre Kontrollgeschwistertiere und haben deutlich kleinere Organe.

P32	Lunge	Leber	Niere
CRAF ko	0,24	0,42	0,11
CRAF wt	0,52	2,49	0,49
p-value	0.043	0.0032	0.29
n=	5	5	2

Tab.3.13. Datensatz zur quantitativen Auswertung der Organ-Gewichtsunterschiede CRAF-defizienter CD1 Tiere im Vergleich zu Kontrollversuchstieren. Während keine signifikanten Unterschiede bei der Niere (p-value 0,298; n=2; Δ ko/wt 77%) gefunden wurden, sind die Lunge (p-value 0.043; n=5; Δ ko/wt 54%) und die Leber (p-value 0.0032; n=5; Δ ko/wt 83%) nullmutanter Tiere signifikant in ihren Organgewicht gegenüber Kontrollversuchstieren reduziert.

n=	5	5	2
P32	Lunge/Körper	Leber/Körper	Niere/Körper
CRAF ko	4,12	6,59	2,2
ND			
S.E.M.	0.92	0.24	0.6
CRAF wt	1,74	8,96	2,15
ND			
S.E.M.	0.39	0.79	0.25
p-value	0.05	0.036	0.96

Tab.3.14. Datensatz zur quantitativen Auswertung des Verhältnisses zwischen Organ- und Körpergewicht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte. Die Analyse zeigt ein im Verhältnis von Lunge-/Körpergewicht signifikant vergrößertes Organ bei CRAF-defizienten Tieren, während die Nierendaten (Δ ko/wt 2%) nur minimale Unterschiede aufweisen. Die Datenanalyse der Leber nullmutanter Versuchstiere zeigt ein deutlich kleineres Organ (Δ ko/wt 26%). Die Unterschiede zwischen wildtypischen Versuchstieren und Nullmutanten sind hier signifikant. Zusammengefasst ergibt die Datenanalyse für nullmutante Tiere eine im Verhältnis zum Körpergewicht signifikant vergrößerte Lunge und signifikant verkleinerte Leber, während die Niere in ihrem Gewicht im Vergleich zu Kontrollgeschwistertieren nahezu unverändert ist.

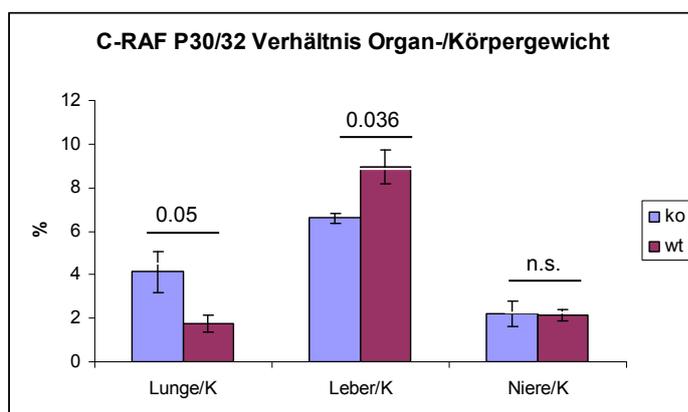


Abb.3.21. Graphische Darstellung von Organ- und Körpergewicht adulter CRAF-defizienter und wildtypischer Versuchstiere. Signifikante Unterschiede zeigen sich im Verhältnis von Leber zu Körpergewicht.

Die Analyse der Fortpflanzungsorgane bei der Sektion junger adulter CRAF-defizienter Männchen sollte Aufschluss über die fehlende Fortpflanzungsbereitschaft der Tiere geben. Während für die Auswertung dieser Arbeit insgesamt mehr männliche Tiere zur Verfügung standen, erreichten nullmutante Weibchen höhere Altersstufen (P52/P55; n=2). Da ein

adultes Weibchen (P52) bei der Sektion sogar trächtig war, scheinen weibliche Nullmutante in ihrer Fortpflanzung nicht beeinträchtigt zu sein. Da aber nur zwei nullmutante Weibchen im fortpflanzungsfähigen Alter (sechs Wochen postnatal) analysiert werden konnten, sind tiefergehende Aussagen aufgrund der geringen Anzahl an Versuchstieren hier nicht möglich. Adulte nullmutante Männchen sind nicht nur deutlich kleiner als Kontrolltiere (Abb.3.23.A), sie zeigen teilweise auch Veränderungen an den Fortpflanzungsorganen (Abb.3.22.). Während die meisten adulten männlichen Nullmutanten ($n > 6$) völlig normal entwickelte Fortpflanzungsorgane hatten (Abb.3.23.), zeigte die Sektion von zwei adulten CRAF-defizienten Tieren Anomalien auf. Ein Männchen war hermaphrodit. Es hatte also äußerlich männliche Geschlechtsorgane, während im Bauchraum Eierstöcke gefunden wurden. Bei einem zweiten männlichen Tier waren die Hoden in den Bauchraum verschoben und deshalb äußerlich nicht erkennbar (Abb.3.22.A und C).

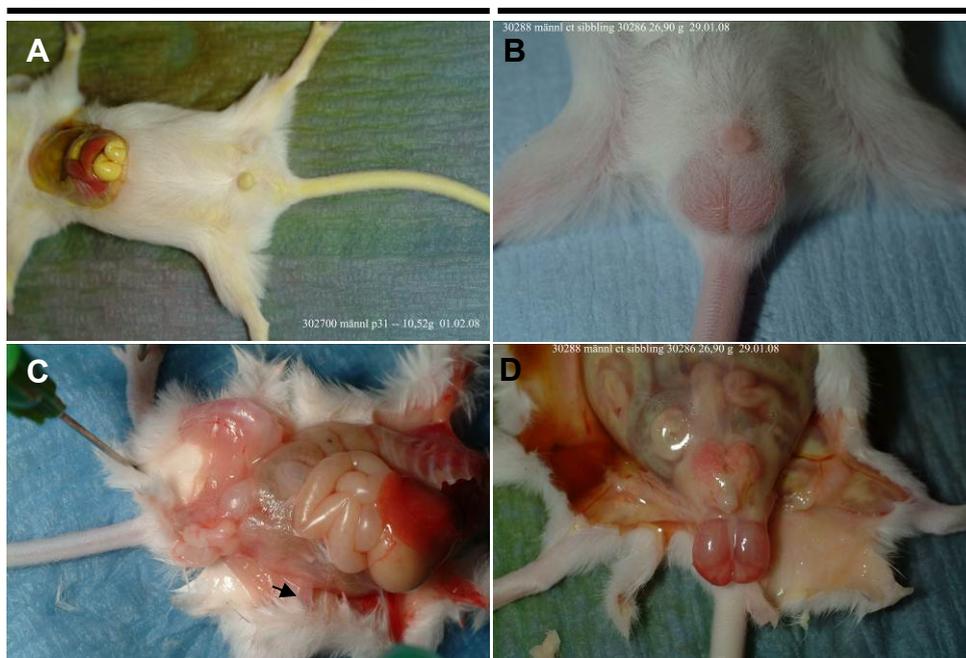


Abb.3.22. Makroskopische Analyse des Gastrointestinaltraks junger adulter CD1 Tiere. (A) Bei dem nullmutanten Männchen (P31) sind äußerlich keine Hoden zu erkennen. (C) Die Sektion des nullmutanten Männchens zeigt eine Fehllokalisierung der Hoden in den Bauchraum. (B und D) Beim Kontrollversuchstier sind die Hoden bereits äußerlich gut sichtbar.

Adulte CRAF-defiziente Tiere lassen sich noch mitsäugen und sitzen in ihrer buckeligen Haltung dicht an ihre Artgenossen gedrängt im Käfig (Abb.3.8.D). Nullmutante sind zudem deutlich kleiner als ihre Wurfgeschwister (Abb.3.23.A). Zusammen mit den beobachteten Anomalien an den Fortpflanzungsorganen könnte hier die Ursache für die fehlende Fortpflanzungsbereitschaft CRAF-defizienter Männchen liegen.

Nachdem die makroskopische Gewebeanalyse der Niere, Leber und Lunge (Abb.3.20.) bereits signifikante Unterschiede im Organgewicht der Lunge & Leber aufzeigen konnte,

wurden diese beiden Organe auch einer histologischen Analyse unterzogen (Abb.3.24.). Da die histologische Analyse der adulten Organe keine morphologischen Auffälligkeiten zeigt, wurde der Betrachtungszeitraum der Organanalyse auch auf sehr frühe postnatale Entwicklungszeitpunkte gelegt.

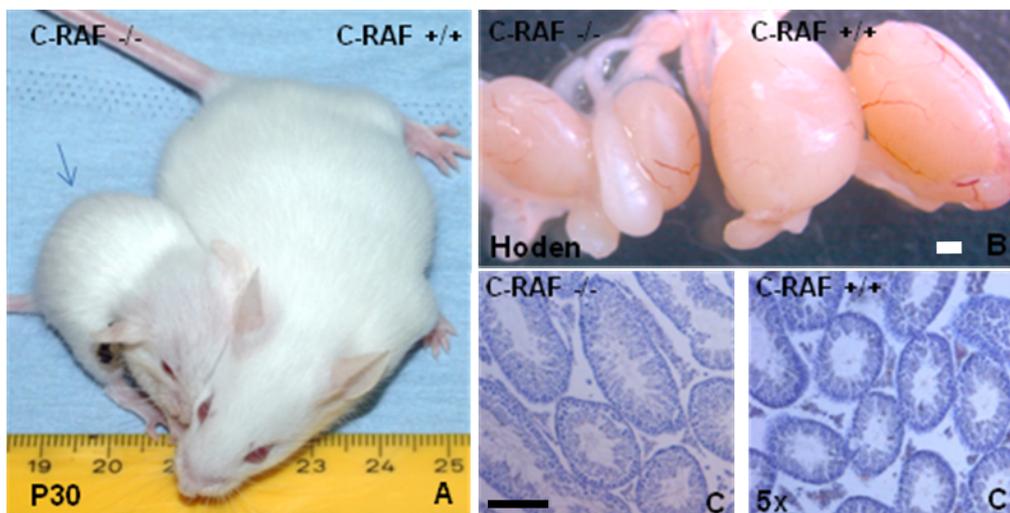


Abb.3.23. Analyse der Fortpflanzungsorgane adulter nullmutanter Männchen. (A) Größenunterschied am Tag P30. Der Pfeil markiert das nullmutante Männchen. (B) Makroskopische Übersicht der Hoden. Größenstandard 1mm. (C-C') Histologische Übersichtsfärbung der Hoden durch H&E. Es sind keine generellen morphologischen Veränderungen der Spermatiden und Spermien beim nullmutanten Männchen (C) im Vergleich zum wildtypischen Kontrolltier (C') erkennbar. Größenstandard 100µm.

Bei CRAF-defizienten Tieren wird die höchsten Letalitätsrate (67%, Abb.3.1.) um den Zeitpunkt der Geburt (P0) beobachtet. Aus diesem Grund sollten die Organe von lebenden und toten neugeborenen Mäusen genauer betrachtet werden. Die histologische Analyse der Lunge und Leber nullmutanter Neugeborener zeigt keine morphologischen Veränderungen (Abb.3.25.). Auch die Organe toter Neugeborener sind pathologisch ohne Befund. Um dennoch Aufschluss über eine mögliche organbedingte Todesursache zu bekommen, wurden die Gewebepreparate immunhistologisch durch eine aktivierte Caspase-3 Färbung, zur Detektion apoptotischer Zellen, weiter untersucht (Abb.3.26.).

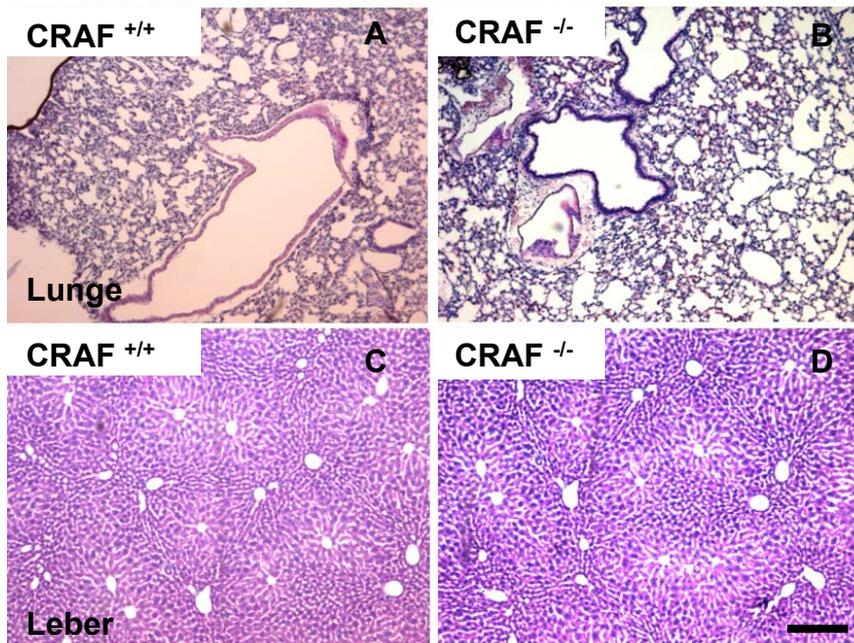


Abb.3.24. Histologische Analyse der Lunge und Leber adulter CRAF-defizienter und wildtypischer Tiere durch H&E. (A-D) Die Übersichtsfärbung zeigt keine generellen morphologischen Veränderungen in der Lunge oder Leber. (A,C) CRAF^{+/+} P44, (B,D) CRAF^{-/-} P44 (Vergrößerung 5x). Größenstandard 100µm.

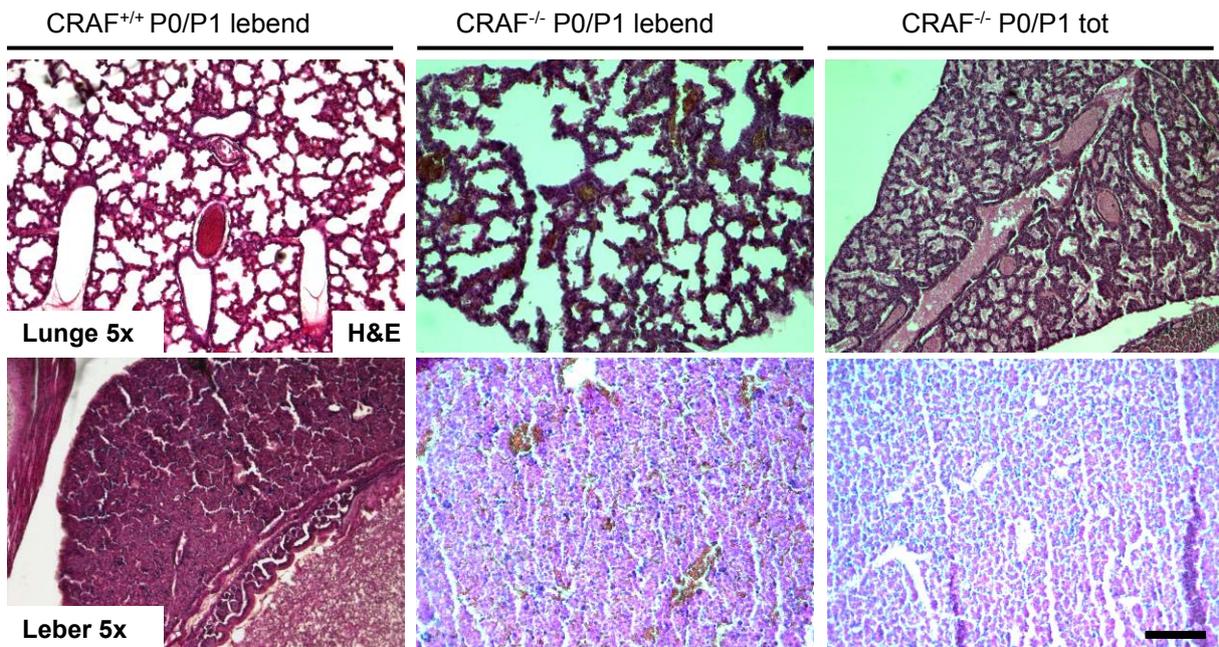


Abb.3.25. Übersichtsfärbung (H&E) der Organe neugeborener CRAF CD1 Tiere. Auch nullmutante tote Neugeborene zeigen keinen pathologischen Befund in der Lunge oder der Leber. Größenstandard 100µm.

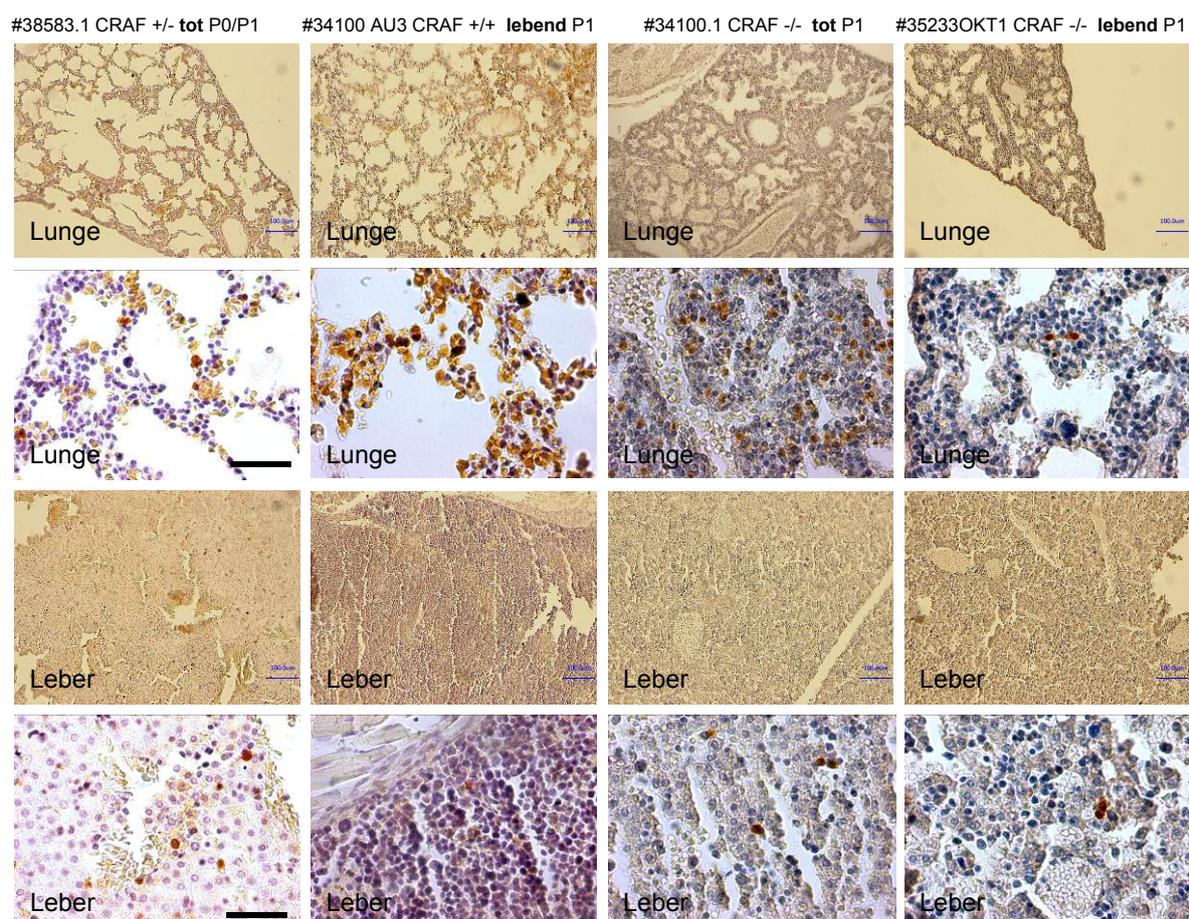


Abb.3.26. Aktivierte Caspase-3 Färbung der Lunge und Leber neugeborener Tiere. Lebende und tote Versuchstiere wurden kurz nach ihrer Geburt analysiert um Aufschluss über eine möglicherweise organbedingte Todesursache der Tiere zu bekommen. Größenstandard 10µm.

Caspase-3 IHC P0/P1	Lunge	Leber
Caspase-3 positive Zellen/mm³		
CRAF ko lebend, n=4	5,1	3,63
S.E.M.	1.44	2.28
CRAF wt lebend, n=7	0,28	3,44
S.E.M.	0.12	1.94
p-value	0.000058	n.s.
CRAF ko tot, n=6	59,66	36,97
S.E.M.	37.14	21.39
CRAF wt tot, n=2	24,81	47,17
S.E.M.	2.29	35.64
p-value	n.s.	n.s.

Tab.3.15. Datensatz zu Abb.3.27.

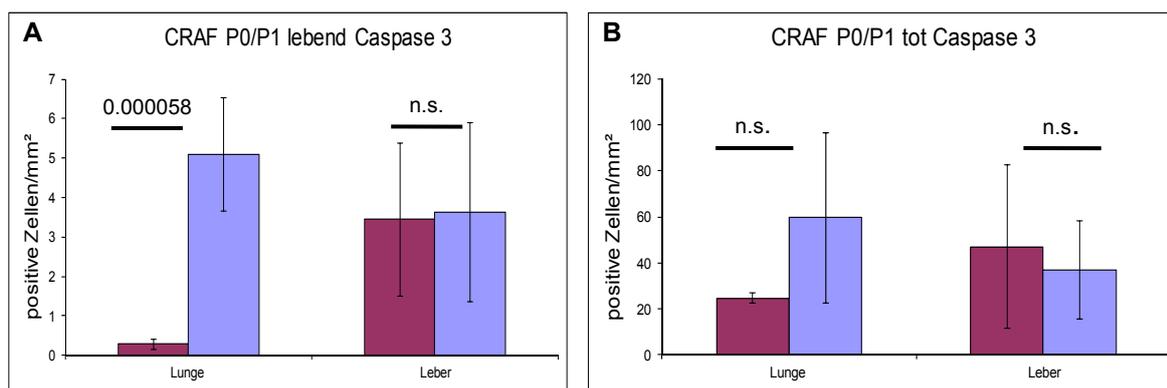


Abb.3.27. Graphische Darstellung der quantitativen Auswertung aktivierter Caspase-3 Immunfärbung neugeborener Tiere. (A) Signifikante Unterschiede zeigen sich in der Anzahl apoptotischer Zellen in der Lunge lebend detektierter Nullmutanten im Vergleich zu Kontrollversuchstieren, während die Auswertung der Leber nur minimale Unterschiede aufweist. (B) Auch bei toten CRAF-defizienten Neugeborenen wurden deutlich mehr apoptotische Zellen in der Lunge gefunden als bei Kontrollversuchstieren. Die statistische Auswertung liefert aber durch die große Standardabweichung bei den Nullmutanten keine Signifikanz. Die Auswertung der Leber ergibt nur minimale Unterschiede zwischen Nullmutanten und Kontrollversuchstieren.

Vergleicht man die Auswertung der aktivierten Caspase-3 Immunfärbung lebender und tot aufgefundener Neugeborener miteinander, scheint es einen Schwellenwert zu geben, ab dem die Tiere nicht mehr lebensfähig sind (Abb.3.27.). Bei toten neugeborenen Kontrollversuchstieren wurden $25 (\pm 2,3; n=2)$ Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Lunge und $47 (\pm 35,6; n=2)$ Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Leber gefunden. Lebende neugeborene Kontrollversuchstiere haben nur $0,3 (\pm 0,1; n=7)$ Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Lunge und $3,4 (\pm 1,9; n=7)$ Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Leber. Auch bei lebenden neugeborenen Nullmutanten werden nur $5,1 (\pm 1,4; n=4)$ Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Lunge und $3,6 (\pm 2,3; n=4)$ Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Leber gezählt, während tote neugeborene Nullmutante $59,7 (\pm 37,1; n=6)$ Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Lunge und $37 (\pm 21,4; n=6)$ Caspase-3-positive Zellen in der Leber haben. Vergleicht man anschließend die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen/mm² von toten neugeborenen Kontrollversuchstieren mit lebend detektierten neugeborenen Nullmutanten sind 4,9-mal mehr apoptotische Zellen in der Lunge und 13-mal mehr apoptotische Zellen in der Leber bei toten neugeborenen Kontrollversuchstiere nachweisbar (Tab.3.15./Abb.3.27.). Die Analyse lebend detektierter (Abb.3.27.A) und toter Neugeborener (Abb.3.27.B) zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl Caspase-3-positiver Zellen in der Leber zwischen CRAF-defizienten und Kontrollversuchstieren. Lebend detektierte neugeborenen CRAF-defiziente Tiere zeigen jedoch signifikant mehr apoptotische Zellen/mm² in der Lunge als lebende neugeborene Kontrollversuchstiere (Abb.3.27.A).

3.6. Histologische Analyse embryonaler Entwicklungsstufen

Nachdem die quantitative Auswertung der aktivierten Caspase-3 Immunfärbung deutliche Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen in der Lunge der neugeborenen Tiere aufgezeigt hat (Abb.3.27.A), wurden in diese Analyse nun auch embryonale Entwicklungsstufen (E16.5 und E18) mit einbezogen (Tab.3.16.). Die quantitative Auswertung der Caspase-3 Immunfärbung zeigt signifikante Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen/mm² in der Leber bei Nullmutanten und Kontrollembryonen zum Zeitpunkt E16.5 (Abb.3.28.). Es werden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen/mm³ in der Lunge bei den Versuchstieren zum Zeitpunkt E16.5 gefunden. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wurden auch keine toten Embryonen detektiert. Auch die Übersichtsfärbung durch H&E zeigt keine morphologischen Auffälligkeiten (Abb.3.29.). Zu diesem embryonalen Entwicklungszeitpunkt scheint die Abwesenheit von CRAF keine große Rolle für die morphologische Entwicklung der Tiere zu spielen.

Caspase-3 IHC E16.5-E18 Caspase-3 positive Zellen/mm³	Lunge	Leber
CRAF ko E16.5 (n=3)	12,9	35,72
S.E.M.	7.12	17.2
CRAF ct E16.5 (n=3)	11,27	10,75
S.E.M.	6.04	6.71
p-value	n.s.	0.017
CRAF ko E18 (n=4)	115,23	134,7
S.E.M.	36.2	56.9
CRAF wt E18 (n=4)	6,09	17,48
S.E.M.	3.96	11.87
p-value	<0.001	<0.001

Tab.3.16. Datensatz zu Graphik in Abb.3.28. und Abb.3.30.

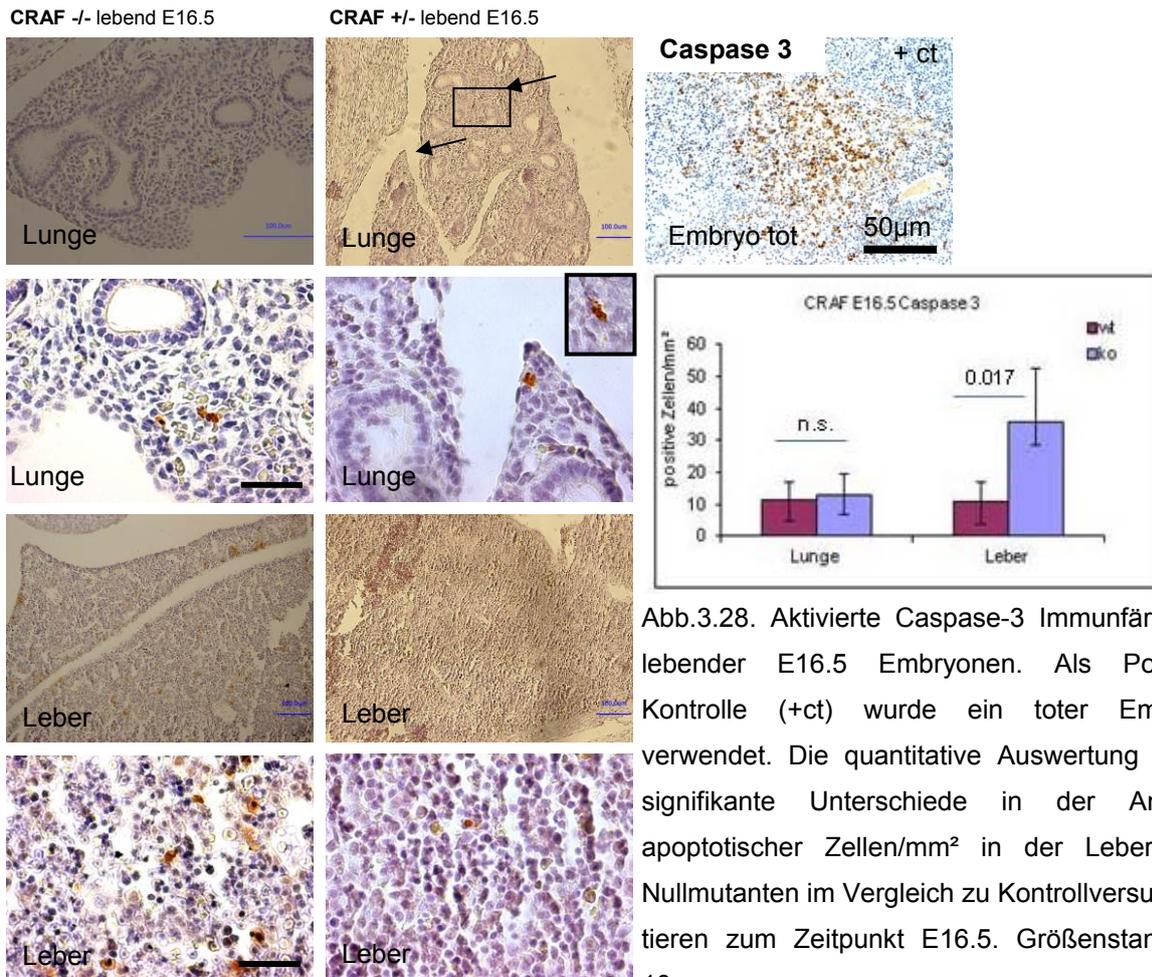


Abb.3.28. Aktivierte Caspase-3 Immunfärbung lebender E16.5 Embryonen. Als Positiv-Kontrolle (+ct) wurde ein toter Embryo verwendet. Die quantitative Auswertung zeigt signifikante Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen/mm² in der Leber bei Nullmutanten im Vergleich zu Kontrollversuchstieren zum Zeitpunkt E16.5. Größenstandard 10µm.

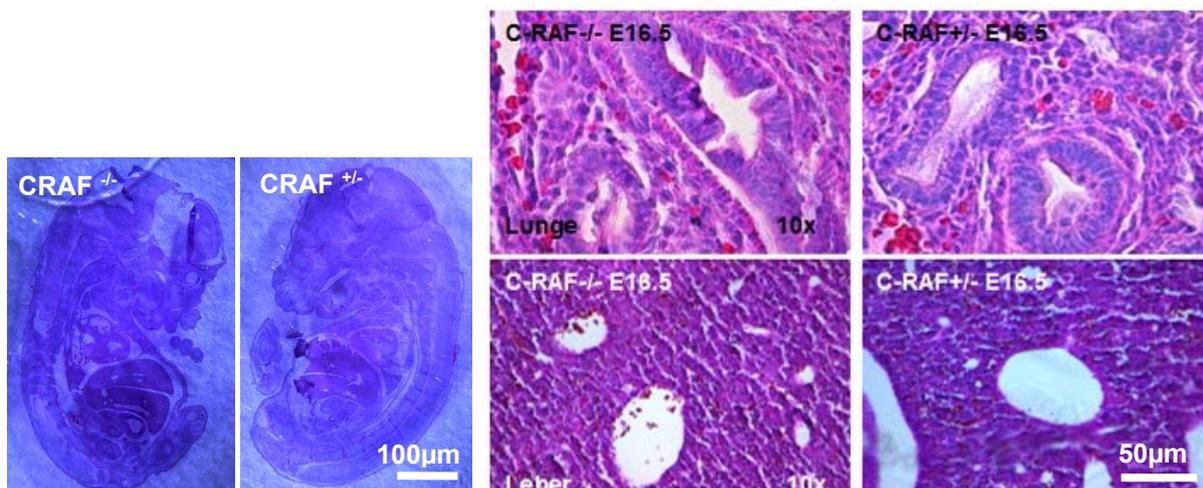


Abb.3.29. Mikroskopische Übersichtsfärbung durch H&E. Die Sagittalschnitte zeigen keine generellen morphologischen Unterschiede zwischen Nullmutanten und Kontrollembryonen zum Zeitpunkt E16.5. Alle Embryonen sind vollständig ausgebildet und vital. Lunge und Leber sind normal entwickelt und zeigen keinen pathologischen Befund.

Zum Zeitpunkt E18 wurden deutlich mehr Caspase-3-positive Zellen/mm² in der Lunge und Leber gefunden, als bei lebend detektierten neugeborenen (P0/P1) Tieren. E18 Embryonen zeigen zudem signifikante Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen/mm² in der Lunge

und Leber (Tab.3.16./Abb.3.30), während bei lebend detektierten neugeborenen Nullmutanten nur die Anzahl apoptotischer Zellen/mm² in der Lunge im Vergleich zu Kontrollversuchstieren signifikant erhöht war (Abb.3.27.A).

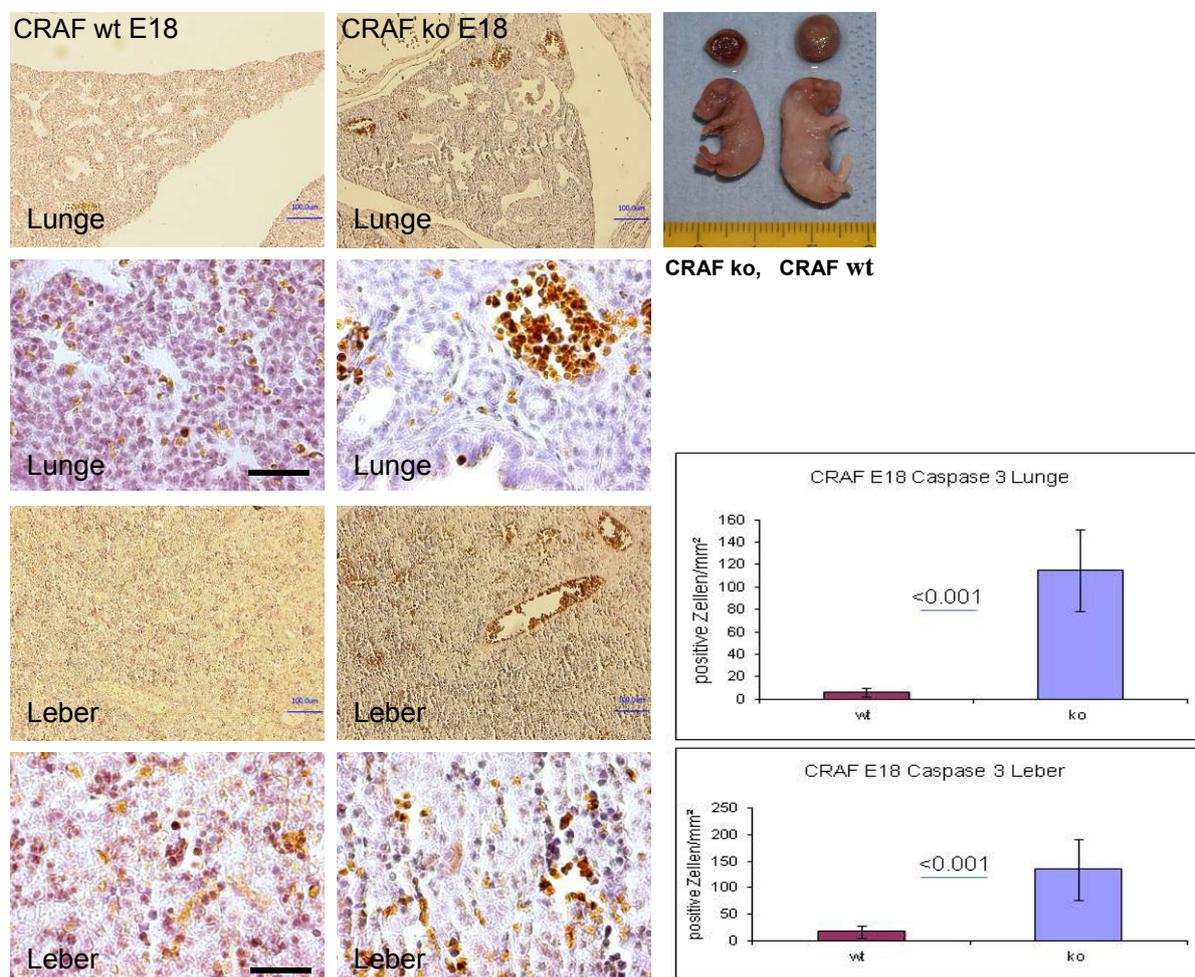


Abb.3.30. Aktivierte Caspase-3 Immunfärbung in lebenden Embryonen zum Zeitpunkt E18. In CRAF-defizienten Embryonen wurden signifikant mehr apoptotische Zellen/mm² in der Lunge und Leber gefunden als in Kontrollversuchstieren. Größenstandard 10µm.

3.7. Kann der Phänotyp CRAF-defizienter Tiere durch eine Verpaarung mit SPC CRAF-transgenen Tieren gerettet werden?

3.7.1. Phänotypische Analyse SPC CRAF-transgener Tiere

Nachdem die Auswertung der Caspase-3 Immunfärbung signifikant mehr apoptotische Zellen in der Lunge CRAF-defizienter Tiere ab dem embryonalen Entwicklungszeitpunkt E18 aufgezeigt hat, wollten wir durch in einer weiteren Analyse testen, ob eine Verkreuzung mit SPC CRAF-transgenen Tieren (Kerkhoff et al., 2000) eine Phänotyprettung der CRAF-defizienten Tiere bewirken könnte. SPC-positive CRAF-defiziente transgene Tiere exprimieren durch die Anwesenheit des SPC-Promotors in ihrer Lunge CRAF. Alle anderen Organe haben eine Deletion dieser RAF Kinase. SPC-negative CRAF-defiziente Tiere exprimieren keinen SPC-Promotor in ihrer Lunge und sind folglich genau wie CRAF-

defiziente CD1 Tiere der Apoptose in den Typ II Pneumozyten in den Alveolen, bzw. deren Vorläuferzellen, ausgesetzt. CRAF wird eine präventive apoptotische Wirkung zugesprochen (Wang et al., 1996 a, b), so dass bei SPC CRAF-transgenen Nullmutanten eine verminderte Apoptose in der Lunge zu erwarten ist, durch die die Tiere möglicherweise eine höhere Lebenserwartung haben. Bei CRAF-defizienten SPC-negativen Versuchstieren sollte dieselbe Lebenserwartung wie bei CRAF-defizienten CD1 Tieren beobachtet werden.

Da für diese Studie nur SPC CRAF-transgene C57Bl6 Tiere zur Verfügung standen, kam es nach der Verpaarung mit CRAF ko CD1 Tieren zu einem vermischten Hintergrund. In dem Versuchszeitraum von April 2008 bis einschließlich Juni 2009 konnten mit sechs Permanentverpaarungen aus SPC CRAF-transgenen heterozygoten Tieren insgesamt fünf SPC-positive CRAF-transgene Versuchstiere generiert werden (Tab.3.17./Abb.3.31.).

Versuchszeitraum April 2008- Juni 2009			
Versuchsjahr	2008	2009	Summe
Permanentverpaarungen	4	4	6*
Wurfanzahl	10	9	19
Anzahl Neugeborene	153	111	264
Nullmutante ohne SPC	1	0	1
Nullmutante mit SPC	1	4	5

Tab.3.17. Darstellung der Verpaarungen, Geburtenraten und Anzahl detektierter CRAF-defizienter und SPC CRAF-transgener Tiere in einem Zeitraum von 14 Monaten. Aus insgesamt sechs Permanentverpaarungen (zwei Paare waren 2008/2009

in Verpaarung) konnte ein adultes CRAF-defizientes Tier und fünf SPC CRAF-transgene Tiere gewonnen werden.

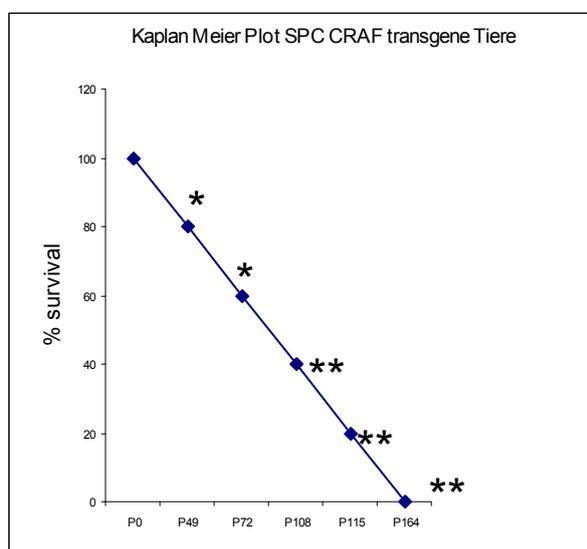


Abb.3.31. Kaplan Meier Plot SPC CRAF-transgener Tiere im gemischten CD1/C57Bl6 Hintergrund. Aufgrund geringer Tierzahlen (n=264) sind Aussagen bezüglich einer möglichen Phänotyp-Rettung nur bedingt möglich. 19 Jungtiere (7%) verstarben bereits vor Eintritt in die adulte Entwicklungsphase und konnten genetisch leider nicht erfasst werden. Lediglich 2,3% der verbliebenen 245 Tiere wurden als CRAF nullmutant genotypisiert. Von den sechs CRAF nullmutanten Tieren kamen drei Tiere aus demselben Wurf, der eine Gesamtwurf-

größe von neun Tieren hatte. Alle drei Tiere waren SPC CRAF-transgen. Ein transgenes Tier wurde zum Zeitpunkt P49 tot aufgefunden, die beiden anderen transgenen Nullmutanten erreichten ein Lebensalter von ~vier Monaten postnatal (P108 und P115). Das älteste transgene Tier war ein P164 Weibchen. Bei der SPC CRAF Verpaarung konnten prozentual nicht mehr Nullmutante als bei der CRAF CD1 Verpaarung detektiert werden. (*Tier gestorben; ** Tier wurde getötet).

Die quantitative Analyse der SPC CRAF Verpaarung zeigt einen Anteil von 2,3% CRAF-defizienter Tiere an der Gesamtzahl neugeborener Tiere (Tab.3.17.). Die sechs CRAF-defizienten Tiere kamen dabei aus drei unterschiedlichen Würfen. Fünf CRAF-defiziente Tiere waren SPC-positiv und erreichten adulte Entwicklungszeitpunkte von bis zu 164 Tagen postnatal (Abb.3.31.). Unter den SPC CRAF-transgenen Tieren waren drei Weibchen und zwei Männchen. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die Expression von CRAF in der Lunge der SPC CRAF-Transgenen Einfluss auf die Lebenserwartung der Tiere hat.

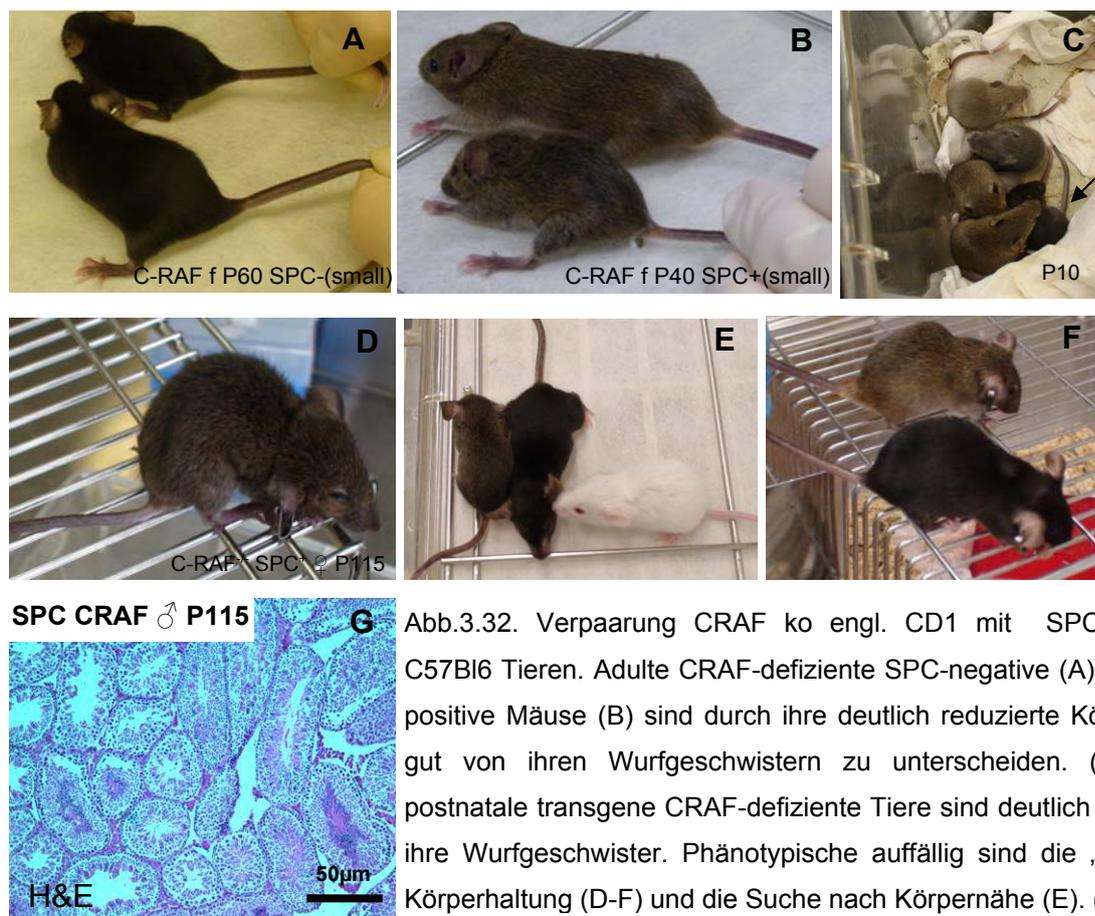


Abb.3.32. Verpaarung CRAF ko engl. CD1 mit SPC CRAF87 C57Bl6 Tieren. Adulte CRAF-defiziente SPC-negative (A) und SPC-positive Mäuse (B) sind durch ihre deutlich reduzierte Körpergröße gut von ihren Wurfgeschwistern zu unterscheiden. (C) Junge postnatale transgene CRAF-defiziente Tiere sind deutlich kleiner als ihre Wurfgeschwister. Phänotypische auffällig sind die „buckelige“ Körperhaltung (D-F) und die Suche nach Körpernähe (E). (E) CRAF-defiziente junge adulte Tiere in verschiedenen genetischen Hintergründen (links: CRAF^{-/-} SPC⁺ ♀ P115 braun, Mitte: CRAF^{-/-} SPC⁺ ♀ P164 schwarz, rechts: CRAF^{-/-} CD1 P34 ♂ weis). (F) SPC CRAF^{-/-} transgene Tiere sind fertil (braun ♀ (P164), schwarz ♂ (P115)). (G) Makroskopische Übersicht der Hoden des P115 Tage alten Männchens (D) durch H&E.

SPC CRAF-transgene Tiere erreichen höhere adulte Entwicklungsstufen (P164, Abb.3.31.) als CRAF ko CD1 Nullmutante (P55). Dabei ist die Frequenz an CRAF-defizienten Tieren vergleichsweise gering (Tab.3.17.). Adulte SPC CRAF-transgene Tiere sind durch ihre deutlich reduzierte Körpergröße und ihre phänotypischen Auffälligkeiten gut von ihren Wurfgeschwistern zu unterscheiden (Abb.3.32.). Männliche und weibliche SPC CRAF-transgene Versuchstiere sind fertil (Abb.3.32.F). Bei der Sektion eines ~sechs Monate alten SPC CRAF-transgenen Weibchens (Abb.3.32.F) konnten E16.5 Embryonen isoliert werden

(Abb.3.33.A). Ein Embryo war bereits tot und stark zurückgebildet (Abb.3.32.A, links), während ein weiterer Embryo lebend isoliert werden konnte (Abb.3.33.A, rechts). Der tote Embryo (Abb.3.33.B) diente als Positiv-Kontrolle für die Caspase-3 Immunfärbung (Abb.3.28.). Bei dem adulten fertilen SPC CRAF-transgenen Männchen (Abb.3.32.F) sind die Hoden makroskopisch normal lokalisiert und äußerlich gut erkennbar. Die histologische Analyse durch H&E zeigt keine generellen morphologischen Veränderungen (Abb.3.32.G). Während bei CRAF-defizienten CD1 Tieren keine Fertilität der Männchen gezeigt werden konnte, wurde bei SPC CRAF-transgenen CD1/C57Bl6 Tieren eine Trächtigkeit durch ein transgenes Männchen analysiert. Weibliche Tiere sind im CD1 und im gemischten CD1/C57Bl6 Hintergrund fertil.

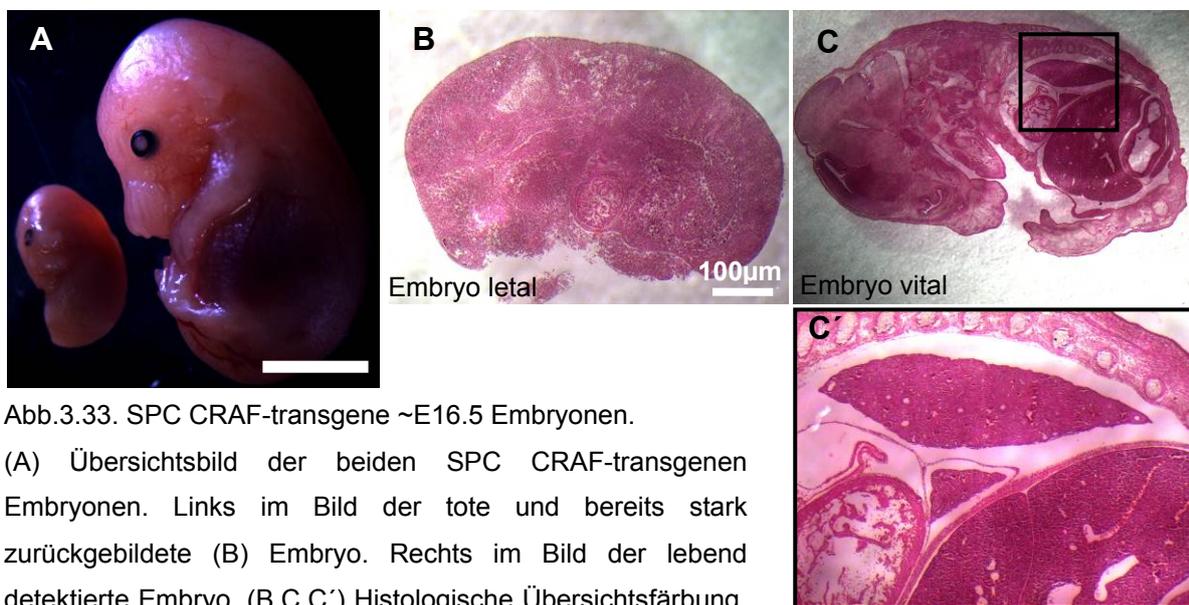


Abb.3.33. SPC CRAF-transgene ~E16.5 Embryonen.

(A) Übersichtsbild der beiden SPC CRAF-transgenen Embryonen. Links im Bild der tote und bereits stark zurückgebildete (B) Embryo. Rechts im Bild der lebend detektierte Embryo. (B,C,C') Histologische Übersichtsfärbung. (B) Toter Embryo. (C-C') Lebend detektiertes Embryo.

Die makroskopische Organanalyse zeigt eine deutlich kleinere Lunge, Milz und Niere bei CRAF-defizienten transgenen Tieren (Abb.3.34.). Quantitative Analysen sind aufgrund der geringen Versuchstierzahlen nicht möglich (Tab.3.18.). Die mikroskopische Analyse der H&E gefärbten Lungengewebepräparate zeigt auffällige Veränderungen bei den transgenen Tieren, die in der CRAF Immunfärbung große Tumore mit einer starken CRAF-Expression in den CRAF-defizienten SPC-positiven transgenen Tieren erkennen lassen (Abb.3.35.).

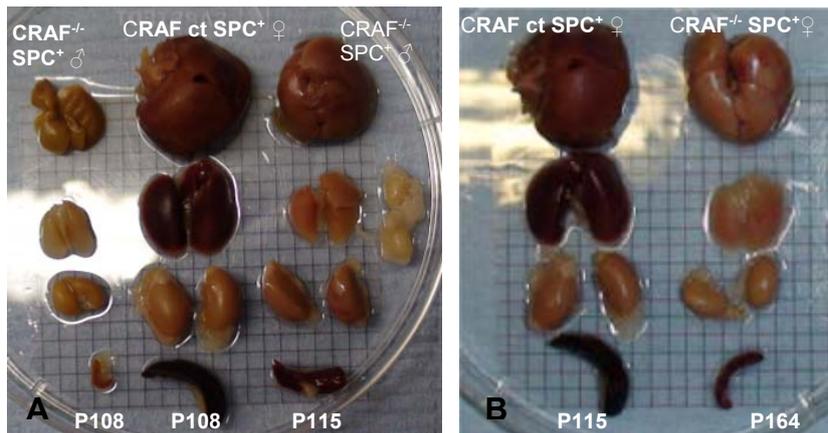


Abb.3.34. Makroskopische Übersicht der Leber, Lunge, Niere, Milz und Hoden adulter SPC CRAF-transgener Tiere im gemischten CD1/C57Bl6 Hintergrund. (A) Links: SPC CRAF-defizientes transgenes Männchen (P108). Mitte: Kontrollversuchstier (P108). Rechts: SPC CRAF-defizientes transgenes Männchen (P115). (B) Links: Kontrollversuchstier (P115). Rechts: SPC CRAF-defizientes transgenes Weibchen (P164).

SPC CRAF	Körperg./g	Gehirng./g	Lungeng./g	Leberg./g	Niereng./g
♀ ct P108	31,25	0,49	0,66	2,6	0,45
♂ ko SPC+ P108	7,82	0,38	0,07	0,33	0,15
♂ ko SPC+ P115	24,76	0,51	0,18	1,56	0,55
♀ ko SPC+ P164	21,11	0,51	0,3	1,6	0,06

Tab.3.18. Datensatz zur Gewichtsanalyse (in Gramm (g)) adulter SPC CRAF-transgener Tiere im Vergleich zu Kontrollversuchstieren. (Körperg.=Körpergewicht).

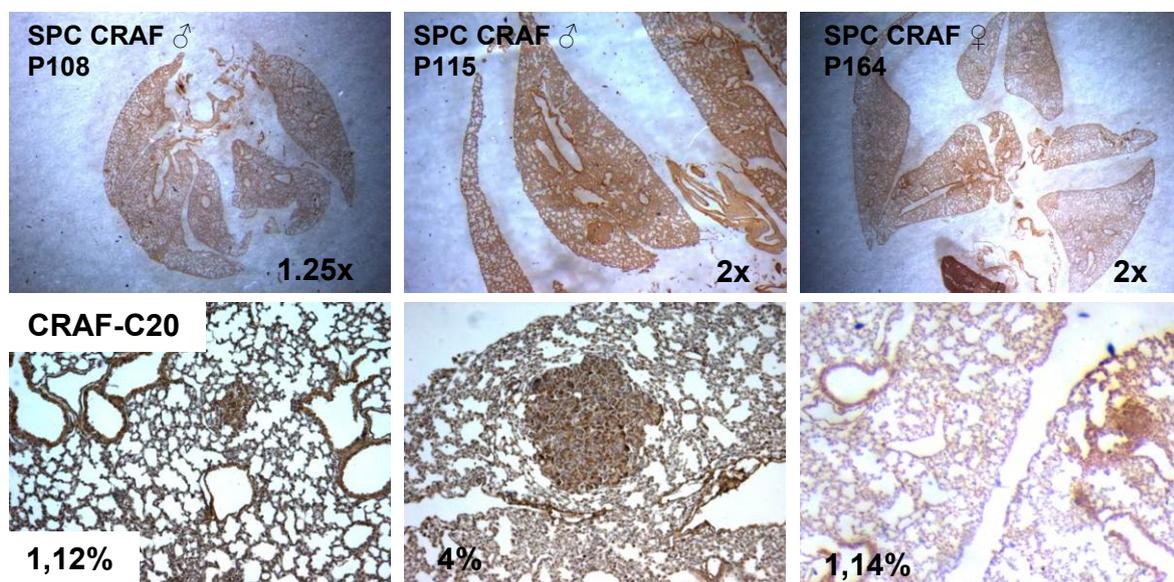


Abb.3.35. CRAF-Immunfärbung der Lunge SPC CRAF-defizienter transgener adulter Tiere. Die Tumorphläche (unten) ist im Verhältnis zur Organgröße (oben) in % angegeben.

Ob die Expression von CRAF in der Lunge der SPC CRAF-defizienten transgenen Tiere für die höhere Vitalität der Tiere verantwortlich ist, konnte durch die geringen Tierzahlen in dieser Arbeit leider nicht ermittelt werden. Um diesbezüglich genauere Aussagen machen zu

können, müssten größere Versuchstierzahlen analysiert werden. Die CRAF-Immunfärbung der CRAF-defizienten transgenen Lungengewebepräparate zeigt deutlich sichtbare Tumore, die aus „Zellklustern“ mit starker CRAF-Expression bestehen (Abb.3.35.). Das Auffinden von Tumoren ist bei transgenen Tiere zu erwarten, jedoch zeigen unsere SPC CRAF-defizienten transgenen Mäuse schon im Alter von ~4 Monaten große Tumore und teilweise zahlreiche Metastasen (Abb.3.35.). Auch wenn die transgenen CRAF-defizienten Tiere deutlich höhere Altersstufen wie CRAF ko CD1 Nullmutanten erreichen können, ist ihre Lebenserwartung durch den Tumor eingeschränkt. Eine „Phänotyp-Rettung“ konnte somit nicht erreicht werden.

3.8. Proteinbiochemischer Nachweis der RAF Kinasen im postnatalen Gehirn

Um die Auswirkung einer Deletion der RAF Kinase CRAF im postnatalen und adulten Gehirn zu analysieren war es wichtig zu zeigen, dass RAF Kinasen auch im postnatalen Gehirn Expressionsmuster aufweisen. Die Proteinexpression der RAF Kinase CRAF im postnatalen Hippocampus war essentielle Grundvoraussetzung für die weitere Durchführung der Experimente. Literaturstudien („Allen Brain Atlas“ (<http://mouse.brain-map.org/atlas/index.html>)) ließen den Schluss zu, dass die RNA aller drei in Säugetieren vorkommenden RAF Kinasen (ARAF, BRAF und CRAF) im adulten Gehirn von Mäusen vorhanden ist. Hippocampusextrakte autopsierter Maus-Gehirnpräparate sollten durch Western Blot Analysen auf die Proteinexpression der RAF Kinasen untersucht werden. Hüser et al. (2001) hatten bereits die Proteinexpression von CRAF an heterozygoten und wildtypischen adulten Tieren gezeigt. Durch die bestätigte Proteinexpression bei postnatalen

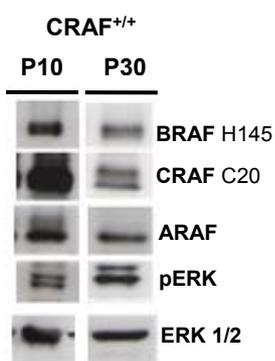


Abb.3.36. Nachweis der RAF-Proteinexpression im Hippocampus zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungszeitpunkten. Hippocampus-extrakte, die aus autopsierten Gehirnpräparaten unterschiedlicher postnataler Entwicklungsstufen extrahiert wurden, konnten durch Western Blot Analysen auf das Vorhandensein der drei RAF Isoformen untersucht werden. Zum Entwicklungszeitpunkt P10 & P30 exprimieren wildtypische Kontrolltiere ARAF, BRAF und CRAF. ERK1/2 dient als Ladekontrolle.

wildtypischen Kontrollversuchstieren (Abb.3.36.) wollten wir die Deletion von CRAF bei postnatalen Tieren zunächst auf translationaler Ebene zeigen. Dazu wurden Gehirngewebeextrakte CRAF-defizienter Tiere isoliert und proteinbiochemisch untersucht. Das Gehirn wurde präparatorisch in *Bulbus olfactorius*, *Präfrontaler Cortex*, *Hippocampus* und Kleinhirn (*Cerebellum*) unterteilt.

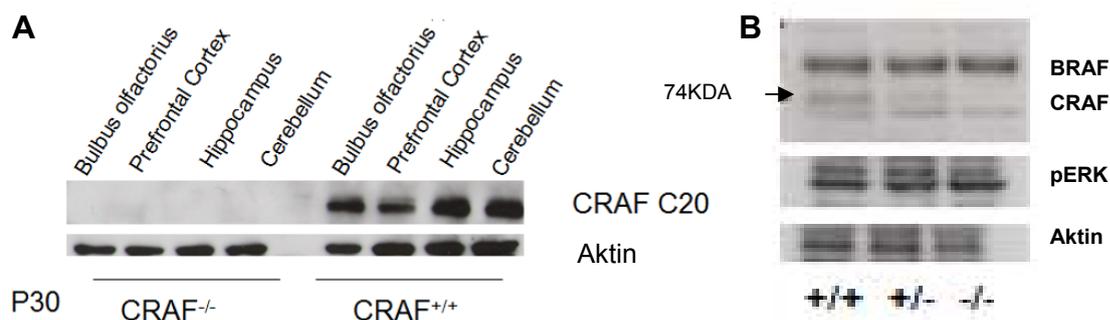


Abb.3.37. Nachweis der CRAF Protein-Deletion bei CRAF Knockouttieren. (A) Unterschiedliche Gehirngewebeextrakte junger adulter Tiere zum Zeitpunkt P30. Als Kontrolle dient ein wildtypisches Geschwistertier. (B) Hippocampusextrakte P30 Tage alter Mäuse unterschiedlicher Genotypen. (+/+) Wildtyp, (+/-) heterozygotes Tier, (-/-) CRAF-defizientes Tier. Aktin dient als Ladekontrolle.

Die Deletion von CRAF konnte bei CRAF-defizienten postnatalen Tieren auch auf Proteinebene bestätigt werden. Während heterozygote Tiere deutlich weniger CRAF exprimierten als wildtypische Kontrollversuchstiere, fehlte das 74kDa große Protein vollständig bei CRAF-defizienten Tieren (Abb.3.37.A-B). Dabei wurde keine Kompensation für das Fehlen von CRAF durch Überexpression einer anderen RAF Kinase, wie beispielsweise BRAF beobachtet (Abb.3.37.B), und keine Unterschiede in der Expression von pERK gefunden (Abb.3.37.B). Nachdem eine vorausgegangene Verhaltensstudie in Zusammenarbeit mit Prof. K.-P. Lesch Unterschiede im Angstverhalten zwischen unseren adulten heterozygoten und wildtypischen Tieren aufgezeigt hat, wurden auch Gewebeextrakte der Amygdala in die proteinbiochemische Analyse von CRAF mit einbezogen. Auch in der Amygdala konnte keine Kompensation durch ARAF oder BRAF nach CRAF-Deletion, bzw. bei einer verminderten CRAF-Expression der heterozygoten Tiere beobachtet werden (Abb.3.38). Es wurden keine Unterschiede im pERK Signal bei den unterschiedlichen Genotypen gefunden (Abb.3.38).

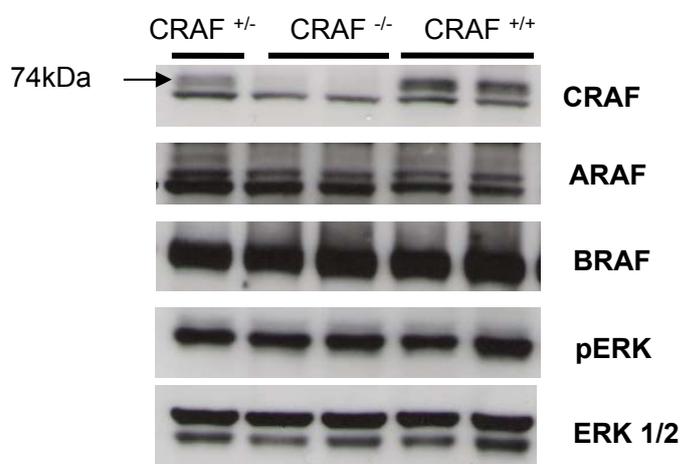


Abb.3.38. Proteinbiochemischer Nachweis der RAF Kinasen ARAF, BRAF und CRAF in der Amygdala bei jungen adulten Versuchstieren zum Zeitpunkt P30. ERK1/2 dient als Ladekontrolle.

3.9. Histologische und morphologische Charakterisierung von Gehirnpräparaten

Um eine möglichst genaue histologische Analyse der Gehirnpräparate durchführen zu können, wurden sagittale 10µm dicke 10er-Serienschnitte angefertigt (M&M Abb.2.11.). Dies ermöglichte eine Analyse durch unterschiedliche Antikörper an gleichwertigen Gewebeabschnitten. Je immunhistologischer Analyse wurde ein Objektträger aus den verschiedenen Zehnerserien entnommen und gefärbt. Ausgewertet wurde jeweils eine vollständige Hippocampushälfte (Abb.3.39.A-D).

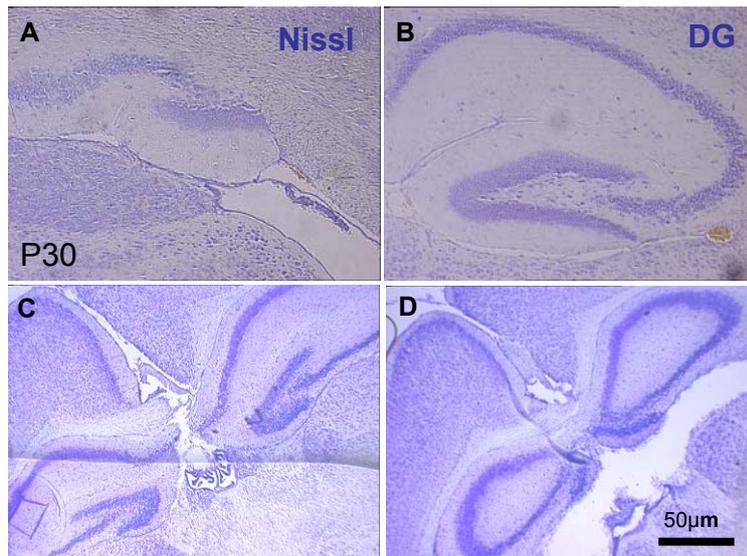


Abb.3.39. Nissl Immunfärbung des hippocampalen gyrus dentatus (DG). Gewebepreparate der Zehner-serien wurden ab beginnendem Hippocampus (A) bis zur Fusion (D) in die jeweiligen Analysen einbezogen

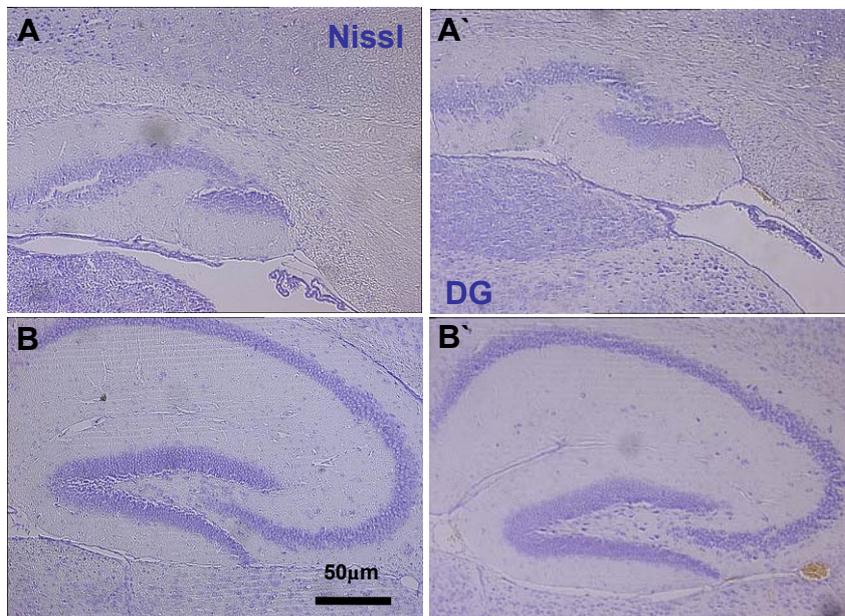


Abb.3.40. Nissl Immunfärbung des DG zum Zeitpunkt P30. Morphologisch sind keine Unterschiede zwischen den Präparaten der Nullmutanten (A'-B') und des Kontrollversuchstiers (A-B) zu erkennen.

Auch die immunhistologische Analyse bestätigte die Expression von RAF im postnatalen Gehirn. Dabei zeigten alle drei in Säugetieren vorkommenden RAF Kinasen ein starkes

Expressionsmuster im postnatalen Gehirn. Auffällig ist die starke Expression im Kleinhirn und im hippocampalen *gyrus dentatus* (Abb.3.41.).

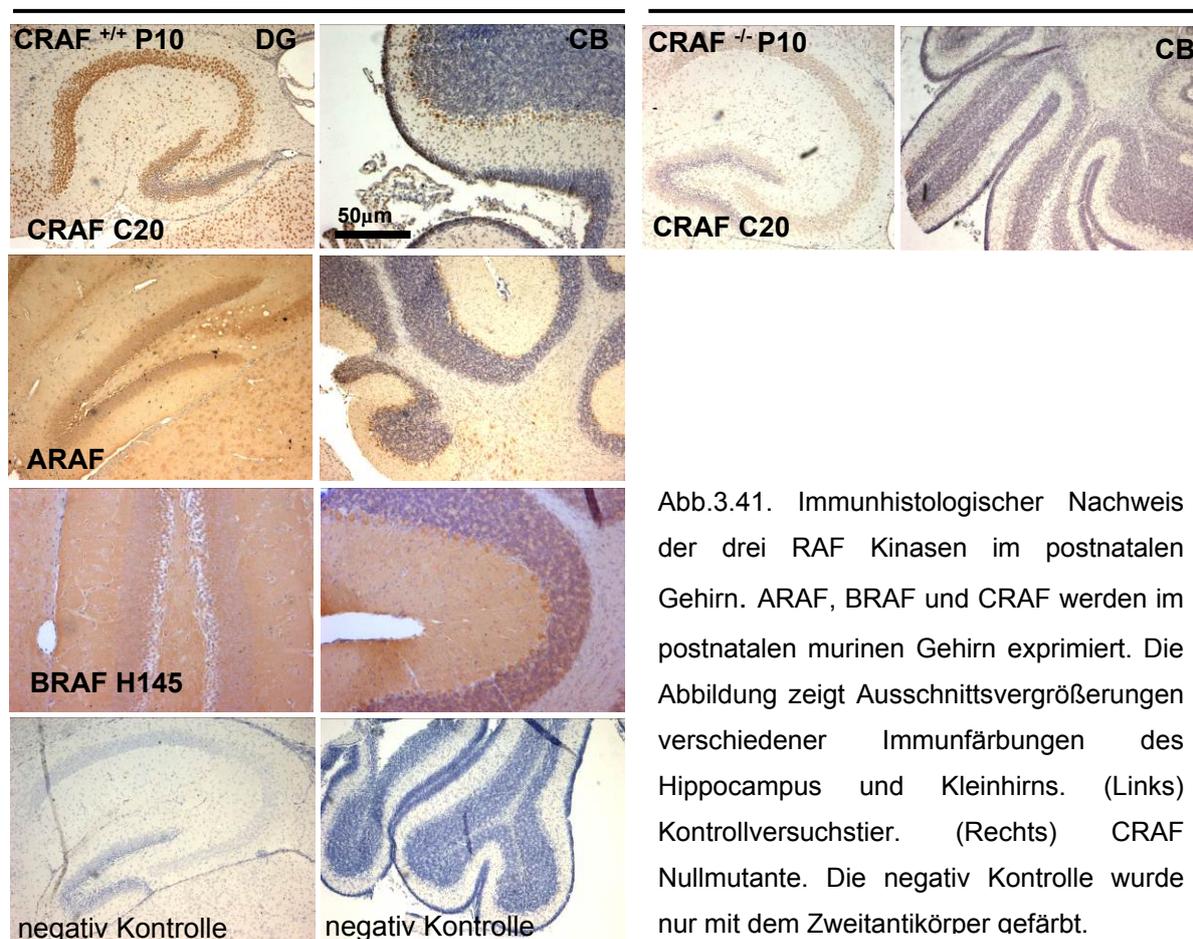


Abb.3.41. Immunhistologischer Nachweis der drei RAF Kinasen im postnatalen Gehirn. ARAF, BRAF und CRAF werden im postnatalen murinen Gehirn exprimiert. Die Abbildung zeigt Ausschnittsvergrößerungen verschiedener Immunfärbungen des Hippocampus und Kleinhirns. (Links) Kontrollversuchstier. (Rechts) CRAF Nullmutante. Die negativ Kontrolle wurde nur mit dem Zweitantikörper gefärbt.

3.9.1. Histologische Analyse durch Nissl und H&E Färbung

Nachdem die histologische Analyse des Hippocampus keine generellen morphologischen Veränderungen bei CRAF-defizienten postnatalen Tieren ergeben hat (Abb.3.40.), den RAF Kinasen aber eine Rolle bei der Proliferation, Differenzierung und dem Zellüberleben zugesprochen wird, sollte der *gyrus dentatus* besonders in den adult-neurogenen Zonen genauer betrachtet werden. Dabei zeigen Nissl und H&E Immunfärbungen an postnatalen Nullmutanten zum Zeitpunkt P10-P30 auffällige „Zellkluster“ dunkel gefärbte Zellen in der Grenzschicht zwischen Hilus und Subgranulärzone (SGZ) (Abb.3.42.). Morphologisch vergleichbare „Zellkluster“ dunkel gefärbter Zellen wurden bereits in der Literatur als proliferierende Vorläuferzellen beschrieben (Altman und Das, 1965, Cameron et al., 1993, Kaplan und Bell, 1984). Neuere Arbeiten klassifizieren diese Vorläuferzellen weiter in unterschiedliche *D-Zelltypen* (Seri et al., 2004). Im Rahmen der histologischen Analyse unserer Gehirnpräparate wurden die Entwicklungsstufen P10 und P30 genauer betrachtet. Die Volumenbestimmung des *gyrus dentatus* erfolgte graphisch mit Hilfe des *Leica Laser Microdissection V5.0* Programms anhand der Nissl Immunfärbung (Abb.3.63.) (analog

Sadgrove et al., 2006 Fig.3) an einer Gehirnhälfte (siehe M&M 2.3.2.2. und 2.3.6.2.1.). Die errechneten Werte wurden mit der jeweiligen Schnittdicke von 10µm multipliziert und aufaddiert. Für die Nissl-Volumenbestimmung wurde der jeweils erste Objektträger der Zehnerreihen verwendet. Das errechnete DG Volumen konnte dann als Referenz für die ermittelte Zellzahl der jeweiligen Immunfärbungen verwendet werden. Vergleichende Analysen erfolgten anhand normierter Ergebnisse in (Zellen/mm³).

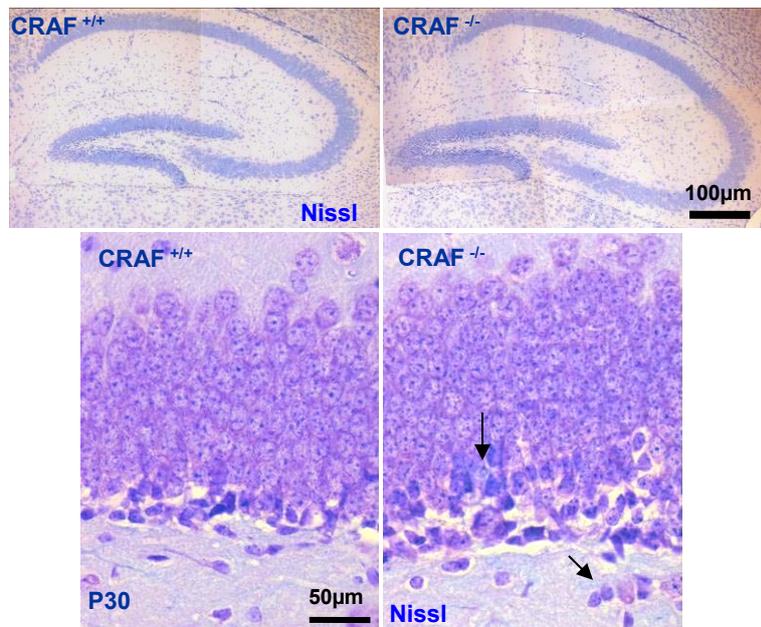


Abb.3.42. Nissl Immunfärbung des gyrus dentatus postnataler Gehirne. Während die makroskopische Analyse keine morphologischen Auffälligkeiten ergeben hat, zeigt die mikroskopische Betrachtung auffällige „Zellkluster“ dunkel gefärbter Zellen bei Nullmutanten (Pfeile) in der Grenzschicht zwischen Hilus und Subgranulärzone des gyrus dentatus.

DG Nissl-Volumen (mm ³)				ko/wt
	n=	Nissl (V/mm ³)	ND	p-value
CRAF P10 24h BrdU				0.98
CRAF ko	7	0,14	ND	
S.E.M.		0.02		
CRAF ct	7	0,14	ND	
S.E.M.		0.006		
Δ CRAF ko/wt//wt		0,03	ND	0.00001
S.E.M.		0.009		

Tab.3.19. Datensatz zu Abb.3.43.

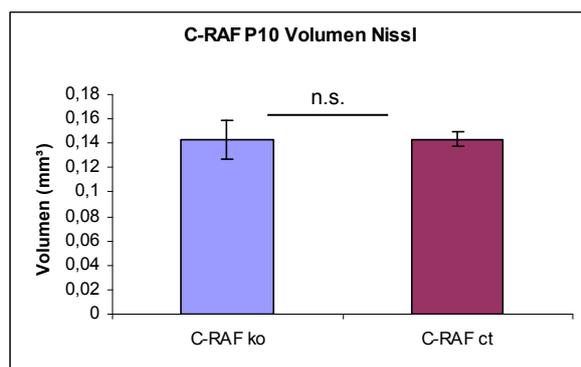


Abb.3.43. Graphische Darstellung der Nissl DG Volumen postnataler Tiere zum Zeitpunkt P10.

Quantitative Analysen der DG Nissl-Volumenbestimmung zeigen keine Unterschiede zwischen Nullmutanten und Kontrollversuchstieren zum Zeitpunkt P10 (Tab.3.19/Abb.3.43.). Bei jungen adulten Nullmutanten (P30) ist das DG Nissl-Volumen jedoch signifikant gegenüber dem Volumen wildtypischer Kontrollversuchstiere reduziert (Tab.3.20.). Vergleicht man die DG Nissl Daten der verschiedenen Analysenzeitpunkte (P10, P30) miteinander, ergeben sich auch signifikante Unterschiede in der DG-Volumenzunahme. Während sich das DG Volumen wildtypischer Kontrollversuchstiere im Zeitraum von P10 bis P30 signifikant um Δ 39% vergrößerte, liegt die Volumenzunahme nullmutanter Tiere nur bei Δ 33% (Tab.3.23.). Das bedeutet, dass nicht nur das Gehirn nullmutanter junger adulter Tiere unter Standardtierhaltungsbedingungen zum Zeitpunkt P30 signifikant in seinem Gewicht gegenüber dem wildtypischer Kontrollversuchstiere reduziert ist, sondern auch einzelne Strukturen im Gehirn in ihrer Größe mit betroffen sind. Vergleicht man das DG Volumen junger adulter Tiere, die in einer angereicherten Umgebung gehalten wurden, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstieren (Tab.3.21.). Auch die Analyse genetisch gleicher Tiere unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen zeigt keine signifikanten Unterschiede (Tab.3.22). Eine direkte Auswirkung der Tierhaltungsbedingung auf das DG Volumen der Tiere konnte nicht gesehen werden.

CRAF P30 Nissl NC				ko/wt
	n=	Volumen (μm^3)	ND	p-value
CRAF ko	30	0,21	ND	0.0117
S.E.M.		0.005		
CRAF wt	30	0,24	ND	
S.E.M.		0.007		

Tab.3.20. Datensatz zur Nissl DG Volumenbestimmung postnataler Tiere zum Zeitpunkt P30 unter Standard-tierhaltungsbedingungen (zu Abb.3.44.).

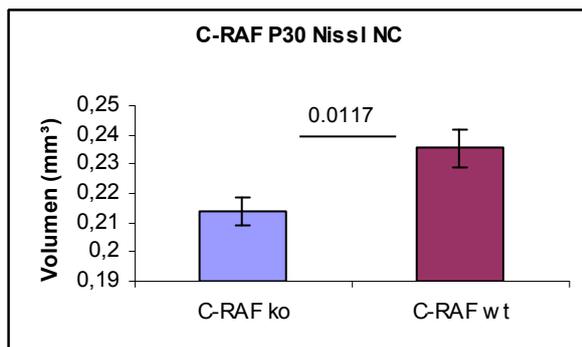


Abb.3.44. Graphische Darstellung der Nissl DG Volumenbestimmung zum Zeitpunkt P30. Junge adulte Nullmutante haben ein signifikant kleineres DG Volumen als Kontrollversuchstiere.

	n=	Volumen (mm³)	ND	p-value (ko/wt)
CRAF ko	5	0,2122	ND	0.0777
S.E.M.		0.08		
CRAF wt	5	0,239	ND	
S.E.M.		0.0056		

Tab.3.21. Datensatz zum DG Nissl Volumen junger adulter Versuchstiere in einer angereicherten Umgebung (ERV).

NC P30 LP	n=4	ERV P30 LP	n=4
av ko	0,22	av ko	0,23
S.E.M. ko	0.02	S.E.M. ko	0.02
av wt	0,26	av wt	0,25
S.E.M. wt	0.009	S.E.M. wt	0.009
p-value ko NC/ERV			0.14
p-value wt NC/ERV			0.11

Tab.3.22. Datensatz zum DG Nissl Volumen junger adulter Tiere bei unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen. (NC) Standardtierhaltungsbedingungen. (ERV) Tierhaltung in einer angereicherten Umgebung.

Nissl P10-P54	n=7	n=30	n=5	n=4	n=1
	P10 NC	P30NC	P30ERV	P38 NC	P54ERV
CRAF ko	0,14	0,21	0,21	0,24	0,24
S.E.M.	0.02	0.005	0.008	0.007	
CRAF wt	0,14	0,24	0,24	0,25	0,29
S.E.M.	0.006	0.007	0.006	0.02	
p-value	0.98	0.012	0.08	0.47	
p-value wt P10/P30		0.04			
p-value ko P10/P30		0.104			

Tab.3.23. Datensatz zur DG Nissl Volumen Zeitkurve (Abb.3.45.).

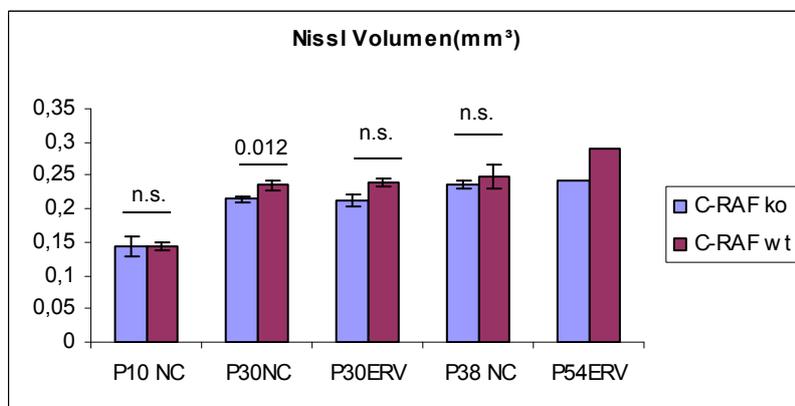


Abb.3.45. DG Nissl-Volumendaten in zeitgraphischer Darstellung.

3.10. Experimentelles Design zur Determinierung des NSC-Pools

Um die Auswirkung der Deletion von CRAF auf die postnatale Neurogenese bei nullmutanten Mäusen genauer untersuchen zu können, wurden Zellmarkierungsstrategien über das Thymidinanalogon BrdU verwendet. Dieses Basenanalogon wird nach i.p. Applikation in die DNA mitotischer Zellen eingebaut und kann, über einen längeren Zeitraum beobachtet, Aufschluss über die Neusynthese und das Zellschicksal der markierten Zellen geben. Gerade bei postnatalen Tieren ist die Neurogenese im Hippocampus auf ganz bestimmten Zellschichten lokalisiert. Kommt es durch die CRAF-Deletion zu einer veränderten Neusynthese in diesen Schichten, hätte dies möglicherweise auch Auswirkungen auf das DG Volumen, welches sich ja bereits zum Zeitpunkt P30 signifikant verändert zeigt.

3.10.1. IHC Auswertung der BrdU-Zellmarkierung zum Zeitpunkt P10

Postnatal erfolgt die Neurogenese der Körnerzellen aus einem Pool mitotisch aktiver Vorläuferzellen zunächst im Hilus. Später, ab dem Entwicklungszeitpunkt P10, findet die Neusynthese vor allem in der sich bildenden SGZ, die sich zwischen Hilus und der inneren Körnerzellschicht befindet, statt. Als frühesten Analysenzeitpunkt für die BrdU-Zellmarkierungsexperimente wurden postnatale Tiere zum Zeitpunkt P10 ausgewählt. Für diese BrdU-Kurzzeitstudie wurde eine chase-Phase von 24h gewählt (Abb.3.46.), da nach dieser Zeit bereits ein kompletter Zellzyklus durchlaufen ist (Cameron et al., 2001). In diesem frühen postnatalen Entwicklungsstadium kann ein hormoneller Einfluss (Seri et al., 2004) auf die Neusynthese der NPCs ausgeschlossen werden. Es erfolgte keine Trennung zwischen männlichen und weiblichen Versuchstierpaaren in der Analyse. BrdU Einzelfärbungen sollten Aufschluss über das NPC Neusynthesepotential geben, während Mehrfachfärbungen für die Differenzierungs- und neuronale Reifungsanalyse verwendet wurden. Quantitative Analysen der immunhistologischen Auswertung zeigen eine signifikante Erhöhung BrdU-positiver Zellen in der Körnerzellschicht (GCL) des *gyrus dentatus* und im Hilus junger postnataler CRAF-defizienter Tiere zum Zeitpunkt P10 (Abb.3.47.).

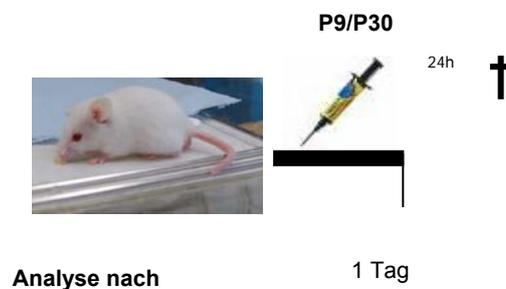


Abb.3.46. Experimentelles Design der BrdU-Kurzzeitstudie mit einer chase-Phase von 24h. Jungen postnatalen Versuchstieren wurde am Tag neun nach ihrer Geburt (P9) das Thymidinanalogon BrdU i.p. (50mg/kg Körpergewicht) appliziert und die Tiere nach einer chase-Phase von 24h analysiert.

Die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen erfolgte analog zu Kempermann et al. (2003). Eine weitere zonenspezifische Analyse der Körnerzellschicht zeigt zudem signifikante Unterschiede in der mittleren Zone (MZ) (Abb.3.49.). Immunhistologische Färbungen durch den Stammzellmarker Nestin und den Gliazellmarker GFAP zur Markierung radialer Gliazellen, die als Vorläuferzellen der Neurone gelten, sollten den proliferationsstarken NPC Pool der jungen Nullmutanten weiter charakterisieren.

CRAF P10 24h BrdU			ko/wt	Δ /wt		ko/wt	
n=7	BrdU DG	ND	p-value	p-value	BrdU Hilus	ND	p-value
			0.0024				0.025
CRAF ko	5446,57	ND			3368,43	ND	
S.E.M.	592						
CRAF ct	3949,86	ND			2003,57	ND	
S.E.M.	453,23						
Δ CRAF ko/wt/wt	1496,86	ND		0.0024		ND	
S.E.M.	298,39						

Tab.3.24. Datensatz der BrdU-Quantifizierung am Tag P10 nach einer chase-Phase von 24h.

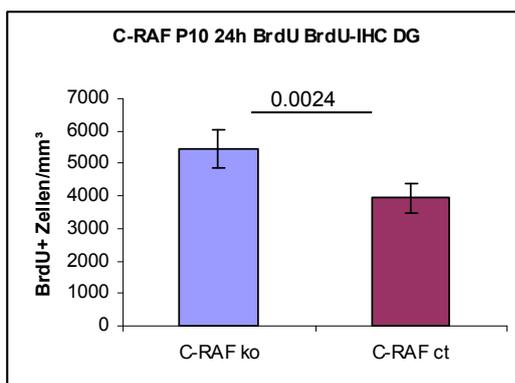


Abb.3.47. Graphische Darstellung der BrdU IHC-Auswertung im DG zum Zeitpunkt P10.

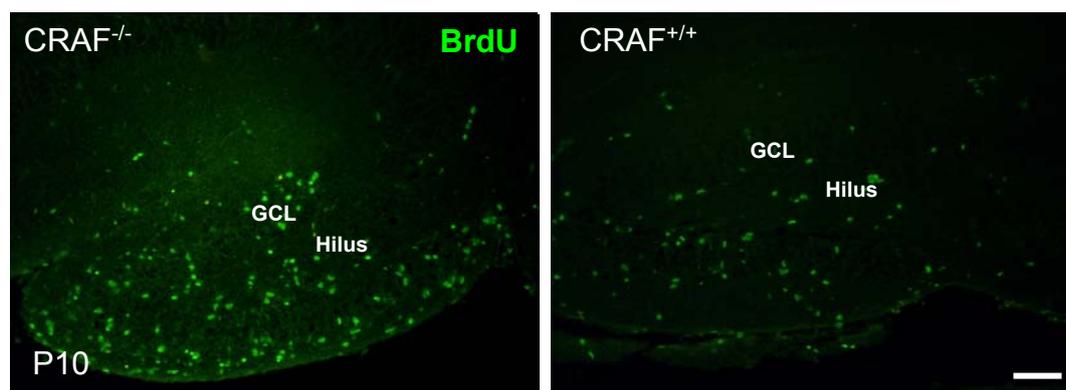


Abb.3.48. IHC Auswertung der BrdU-Immunfärbung zum Zeitpunkt P10 nach einer chase-Phase von 24h. CRAF-defiziente Tiere haben signifikant mehr BrdU-markierte mitotische Zellen im DG und Hilus als wildtypische Kontrollversuchstiere. Die Schichtenspezifische Quantifizierung erfolgte analog zu Kempermann et al. (2003). Größenstandard 100 μ m.

Die statistische Auswertung zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Nestin/GFAP bzw. BrdU/GFAP Immunfärbung zwischen den Versuchstieren (Abb.3.50.,Abb.3.52.). In der PSA NCAM Immunfärbung sind bei dem wildtypischen Kontrollversuchstier bereits nach einer chase-Phase von 24h zahlreiche BrdU-markierte Zellen mit dem Zelladhäsionsmolekül NCAM kolokalisiert (Abb.3.54.). Infolge weiterer Differenzierungsprozesse verlieren die in der Literatur als *D-Zellen* (Seri et al., 2004) beschriebenen Vorläuferzellen ihren Zusammenhalt und exprimieren dann Differenzierungsmarker wie NeuroD (Schwab et al., 2000; Boutin et al., 2010; D'Amico et al., 2013) bzw. nach ihrer neuronalen Reifung den postmitotischen Neuronenmarker NeuN. Nachdem für die Kurzzeitstudie der P10 Tiere nur eine chase-Phase von 24h für die Differenzierungsanalyse der BrdU-markierten Zellen zur Verfügung stand, konnte die neuronale Reifung zu postmitotischen, NeuN exprimierenden Neuronen nicht betrachtet werden (Abb.3.55.).

P10 24h BrdU, BrdU IHC					
n=8	SGZ	MZ	OZ	ML	Hilus
av ko	2480,88	1211,63	1854,38	4060,63	3370,25
av wt	2155,11	750,56	1002,67	2901,67	2128,11
S.E.M. ko	269	264	411	906	494
S.E.M. wt	159	89	223	454	285
p-value	0.19	0.01	0.13	0.09	0.02

Tab.3.25. Datensatz zur zonenspezifischen BrdU Quantifizierung junger post-nataler Tiere zum Zeitpunkt P10 (Abb.3.49.).

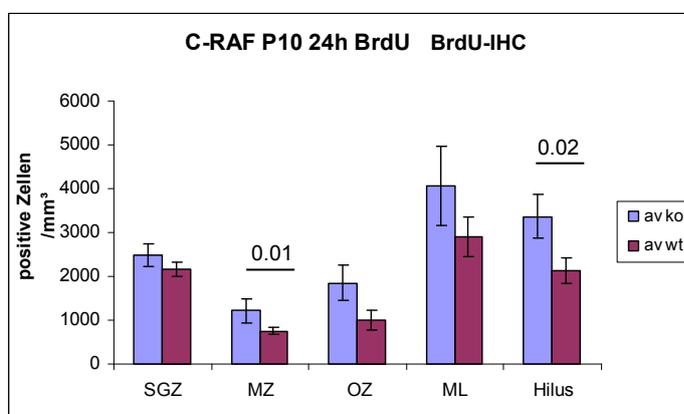


Abb.3.49. Graphische Darstellung der zonenspezifischen BrdU Analyse zum Zeitpunkt P10. Signifikante Unterschiede gibt es in der mittleren Zone (MZ) und im Hilus.

CRAF ko P10, BrdU chase-Phase von 24h, GFAP/Nestin-positive Zellen/mm³ im DG	n=3
av CRAF ^{-/-}	204,33
S.E.M. CRAF ^{-/-}	63,65
av CRAF ^{+/+}	84,33
S.E.M. CRAF ^{+/+}	43,7
p-value CRAF ^{+/+} /CRAF ^{-/-}	0.29
Δko/wt	Δ41%

Tab.3.26. Datensatz zur quantitativen Analyse der GFAP/Nestin IHC im DG zum Zeitpunkt P10 (Abb.3.50.).

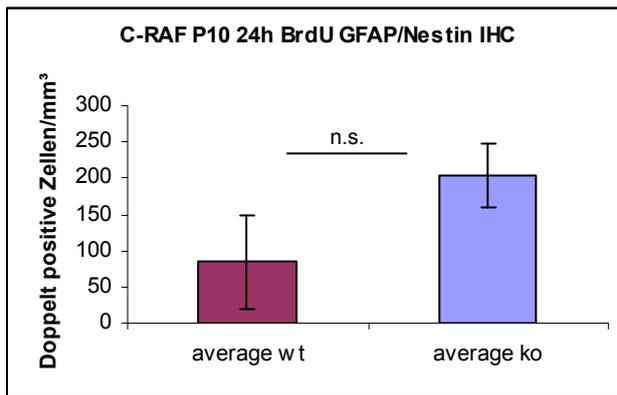


Abb.3.50. Graphische Darstellung der Nestin/GFAP IHC Auswertung im DG junger postnataler Versuchstiere zum Zeitpunkt P10. Die quantitative Analyse der Nestin/GFAP IHC Auswertung zeigt keine signifikanten Unterschiede.

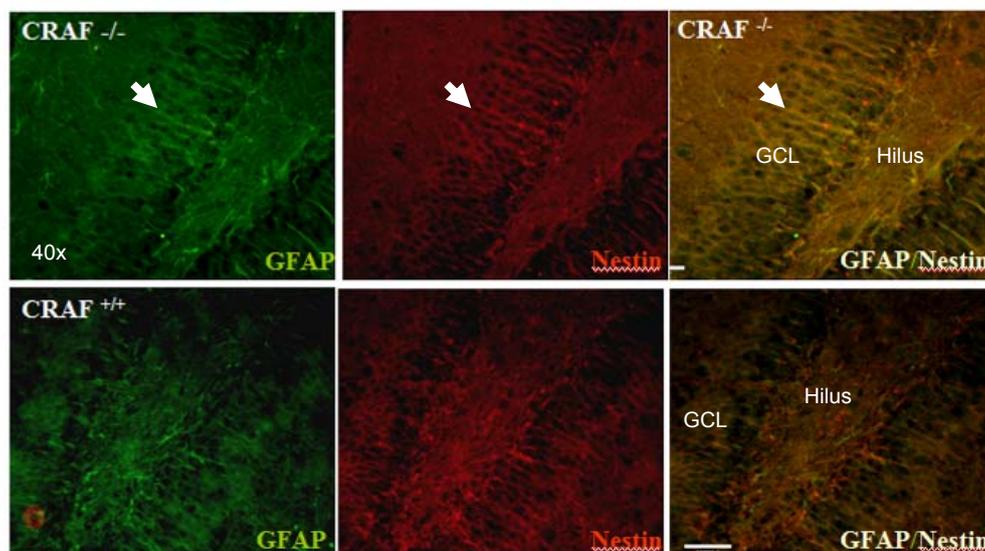


Abb.3.51. GFAP/Nestin IHC zum Zeitpunkt P10 nach einer chase-Phase von 24h.

CRAF ko P10, BrdU chase-Phase von 24h, BrdU/GFAP-positive Zellen/mm³ im DG	n=4
Mittelwert CRAF -/-	86,75
S.E.M. CRAF -/-	19,21
Mittelwert CRAF +/+	51,25
S.E.M. CRAF +/+	17,61
p-value CRAF +/+/ CRAF -/-	0.22
p-value CRAF +/+/ Δ	0.48
Δko/wt	Δ59%

Tab.3.27. Datensatz zur quantitativen Analyse BrdU/GFAP-positiver Zellen mit radialer Morphologie (rA) im DG (Abb.3.52.).

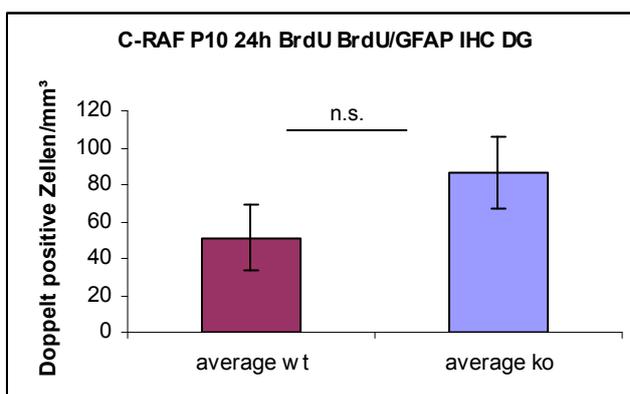


Abb.3.52. Graphische Darstellung der BrdU/GFAP IHC Auswertung im DG. Zum Zeitpunkt P10 sind keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen mit radialer Morphologie erkennbar.

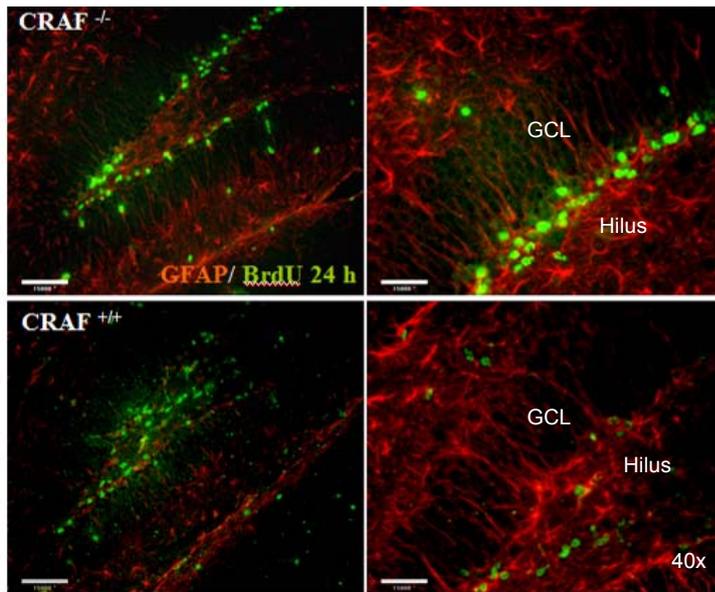


Abb.3.53. BrdU/GFAP IHC zum Zeitpunkt P10 nach einer chase-Phase von 24h. Junge postnatale CRAF-defiziente Tiere haben deutlich mehr BrdU-markierte proliferierende Zellen.

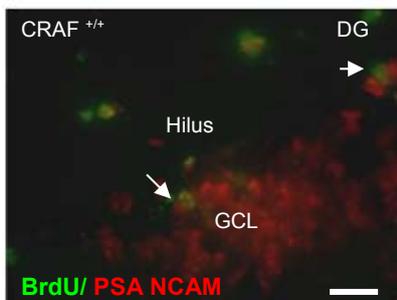


Abb.3.54. BrdU/PSA-NCAM IHC zum Zeitpunkt P10 nach einer chase-Phase von 24h. Das wildtypische Kontrollversuchstier zeigt bereits einige BrdU-markierte Zellen, die mit dem Zelladhäsionsmolekül NCAM kolokalisieren. Das neuronale Zellschicksal dieser BrdU-markierten Zellen ist bereits nach einer chase-Phase von 24h erfolgt. Größenstandard 50µm.

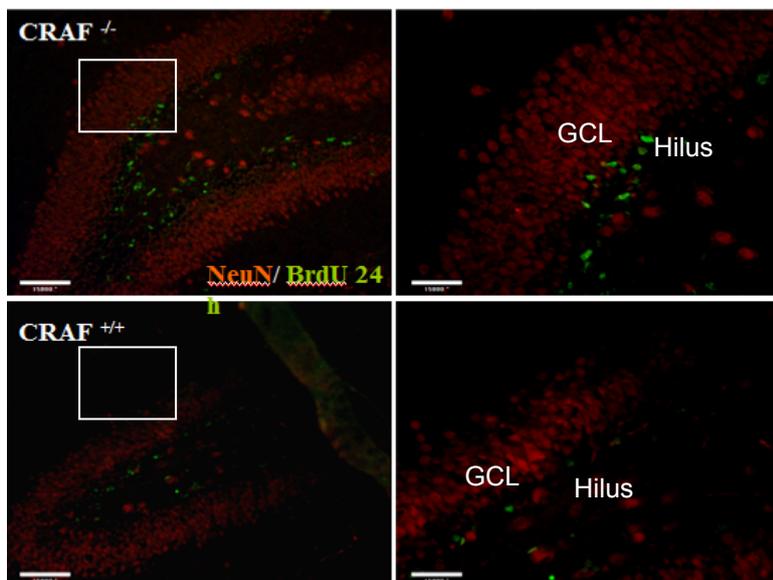


Abb.3.55. BrdU/NeuN IHC zum Zeitpunkt P10 nach einer chase-Phase von 24h.

Die zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungszeitpunkten (P10/P30) beobachteten „Zellkluster“ dunkel gefärbter Nisszellkörper sollten auch einer Zelltodanalyse unterzogen werden. Dunkel gefärbte Zellen, wie sie vor allem bei jungen postnatalen Nullmutanten in der Nissl und H&E Übersichtsfärbung der Gehirnpräparate gefunden wurden, können auf

proliferierende NPCs hinweisen (Altman und Das, 1965, Cameron et al., 1993, Kaplan und Bell, 1984), deren Chromatin während der Mitose stark kondensiert ist. Aber auch apoptotische Zellkerne haben ein ähnliches Erscheinungsbild. Die Zelltodanalyse durch TUNEL zeigt keine apoptotischen Zellen im DG junger postnataler Tiere (P10). Bei der Positiv-Kontrolle dieser Immunfärbung wurde ein DNase-Verdau gemacht.

Die Nissl „Zellkluster“ sind demzufolge mitotisch aktive NPCs, die mit Hilfe von Zellmarkierungsexperimenten (BrdU) auf einen größeren Anteil proliferierender Vorläuferzellen hinweisen. BrdU-markierte Zellen kommen bei CRAF-defizienten Tieren auch in Form von „Zellklustern“ vor.

3.10.2. IHC Auswertung der BrdU-Zellmarkierung zum Zeitpunkt P30

Zelldifferenzierungsanalysen über einen Zeitraum von 24h (Abb.3.46.) wurden auch bei jungen adulten Tieren (P30) durchgeführt. Die BrdU Applikation erfolgte analog der P10 Analyse. Da bei jungen adulten Tieren der DG bereits vollständig ausgebildet ist, findet die Neusynthese der Nervenzellen ausschließlich in der SGZ statt. Die quantitative Auswertung der BrdU Immunfärbung zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl proliferierender Zellen im DG junger adulter Tiere (Tab.3.28./Abb.3.56.). Auch bei der zonenspezifischen Analyse der Körnerzellschicht wurden keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl BrdU-markierter Zellen in den einzelnen GCL-Schichten gefunden (Tab.3.29./Abb.3.57./Abb.3.58.). Dafür zeigen sich signifikante Unterschiede in der Anzahl BrdU-markierter Zellen im Hilus der jungen adulten Nullmutanten (Abb.3.57./Abb.3.58.), obwohl die DG Bildung zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen sein sollte und somit keine weiteren einwandernden Zellen aus dem Hilus zu erwarten sind (Altman und Das, 1965, Altman und Bayer, 1990 a, b).

CRAF P30, BrdU chase-Phase von 24h			ko/wt	Δ /wt			ko/wt	wt/ Δ	ko/ Δ
n= 8	BrdU DG	ND	p-value	p-value	BrdU Hilus	ND	p-value	p-value	p-value
CRAF ko	467,75	ND	0.108	0.463	254,88	ND	0.007	0.47	0.013
S.E.M.	54.69				19.13				
CRAF ct	323,75	ND			101,38	ND			
S.E.M.	59.61				30.75				

Tab.3.28. Datensatz zur BrdU IHC Auswertung nach einer chase-Phase von 24h zum Zeitpunkt P30.

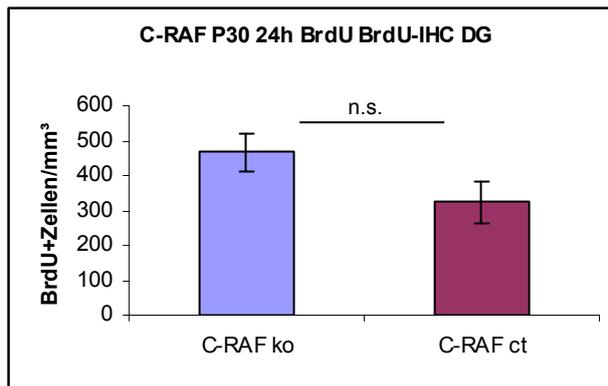


Abb.3.56. Graphische Darstellung der BrdU-IHC Auswertung am Tag P30 im DG.

CRAF P30 BrdU chase-Phase von 24h	Total SZ	Total MZ	Total OZ	Total ML	Total Hilus
CRAF ko, n=8	406,88	12,63	32,13	127,88	254,88
CRAF wt, n=8	327	10,4	17,7	89,9	134,7
S.E.M. ko	49	5	5	33	19
S.E.M. wt	90	4	5	21	35
p-value	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.007

Tab.3.29.Datensatz zur zonenspezifischen BrdU-Quantifizierung zum Zeitpunkt P30 nach einer chase-Phase von 24h.

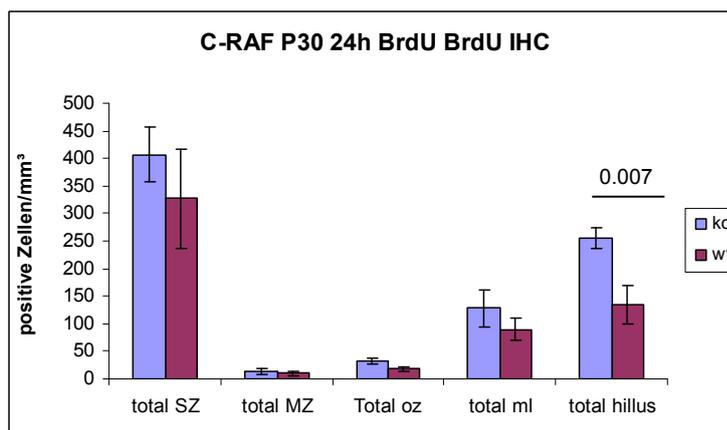


Abb.3.57. Graphische Darstellung der zonenspezifischen BrdU Auswertung zum Zeitpunkt P30.

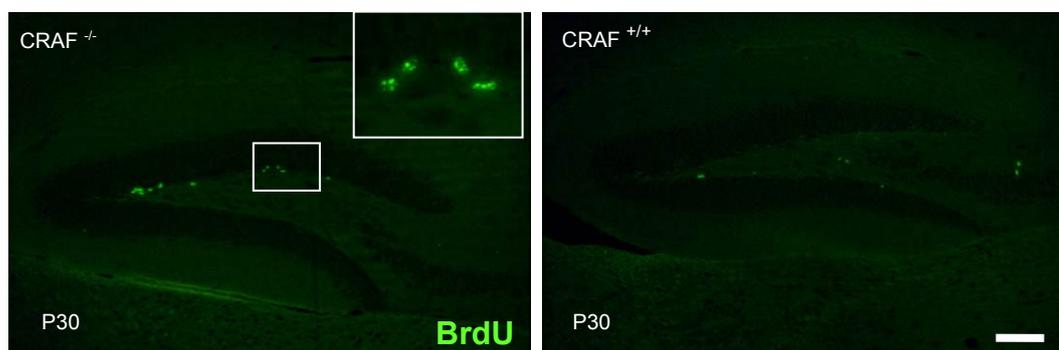


Abb.3.58. IHC Auswertung der BrdU-Immufärbung zum Zeitpunkt P30 Tieren nach einer chase-Phase von 24h. CRAF-defiziente Tiere zeigen deutlich mehr proliferierende Zellen im Hilus als Kontrolltiere. Größenstandard 50µm.

3.10.3. Zellzyklusanalyse der 24h BrdU Applikation

Um den „Pool“ an proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) genauer untersuchen zu können wurden Mehrfachfärbungen mit den Proliferationsmarkern BrdU und Ki67 durchgeführt. Dabei stellen doppelt-positive Zellen (BrdU/Ki67) den aktiv proliferierenden G1-S-G2/M „Pool“ dar, während BrdU-einzelpositive Zellen einen Zellzyklusaustritt und die damit verbundene G0 Phase definieren (Abb.3.59.).

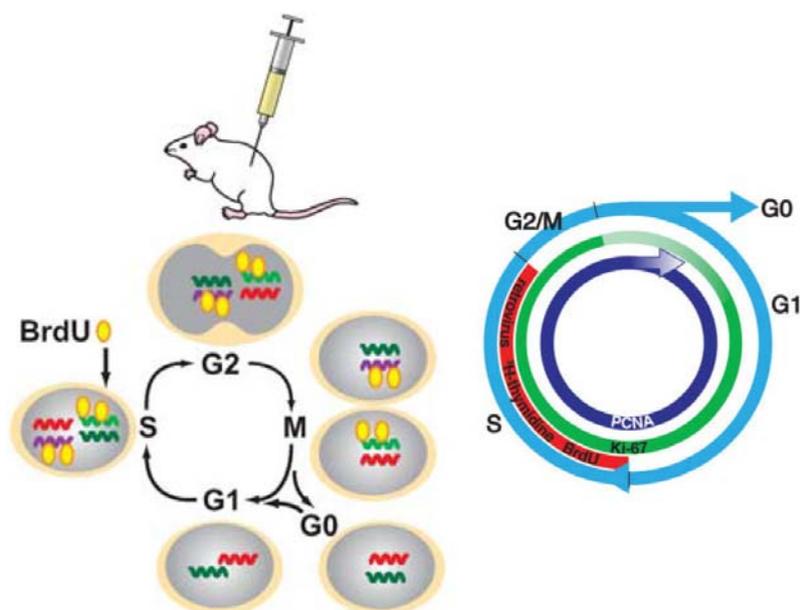


Abb.3.59. Schematische Darstellung der BrdU-Markierung und Zellzyklusanalyse durch BrdU und Ki67. Während das Thymidinanalogon BrdU spezifisch in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA proliferierender Zellen inseriert und diese permanent markiert, werden Ki67 und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) nur während der aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und M, nicht aber G0) exprimiert (verändert nach Ming und Song 2005, Christi und Cameron, 2006).

Die quantitative Auswertung der BrdU/Ki67 Immunfärbung zeigt signifikante Zellzyklus-Unterschiede bei jungen adulten CRAF-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Tab.3.30.). Im DG CRAF-defizienter Tiere sind signifikant mehr BrdU-markierte Zellen, die 24h nach der BrdU Applikation nicht mit dem Proliferationsmarker Ki67 kolokalisieren (BrdU „alone“) (Abb.3.60.B/Abb.3.62.). Im Hilus ist die Anzahl Ki67-positiver Zellen bei CRAF-defizienten Tieren signifikant erhöht (Abb.3.60.A, Abb.3.61.).

CRAF P30, BrdU chase-Phase von 24h									
BrdU/Ki67 IHC		DG			Hilus		% kolok DG	% kolok. Hilus	
n=3	Total Brdu DG	Total Ki67 DG	BrdU+Ki67	BrdU „alone“	Ki67 hilus	BrdU+Ki67			BrdU „alone“
av ko	851	853	356	494	367	130	230	45	36
av wt	443	636	248	195	97	44	111	53	27
S.E.M. ko	75	50	32	113	47	38	38		
S.E.M. wt	148	228	112	23	45	35	35		
p-value	0.15	0.31	0.69	0.048	0.03	0.203	0.08	0.42	0.28

Tab.3.30. Datensatz zur BrdU/Ki67 IHC bei jungen adulten Tieren nach einer Chase-Phase von 24h.

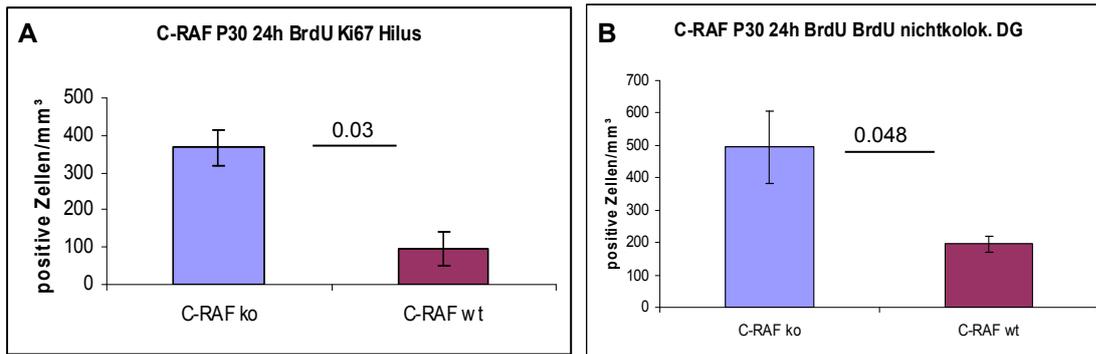


Abb.3.60. Graphische Darstellung der BrdU/Ki67 IHC bei jungen adulten Tieren nach einer chase-Phase von 24h. (A) Im Hilus CRAF-defizienter Tiere sind signifikant mehr Ki67-positive Zellen. (B) Im DG CRAF-defizienter Tiere sind signifikant mehr BrdU-markierte Zellen, die nach einer chase-Phase von 24h nicht mit dem Proliferationsmarker Ki67 kolokalisieren.

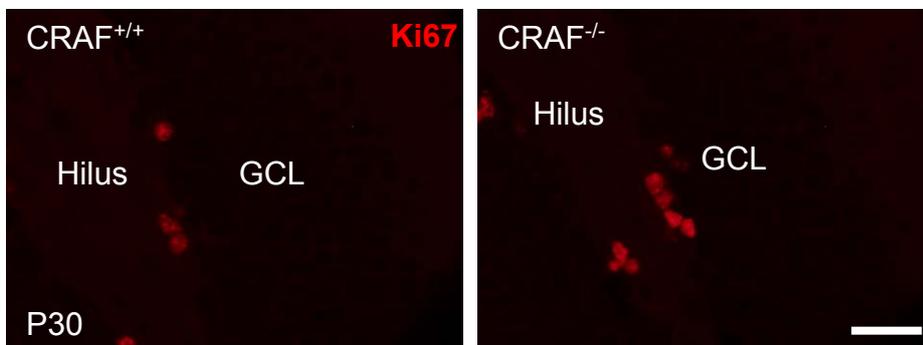


Abb.3.61. Ki67 Immunfärbung bei jungen adulten Tieren. Im Hilus der Nullmutanten sind signifikant mehr Ki67-positive Zellen als bei Kontrollversuchstieren. Größenstandard 50µm.

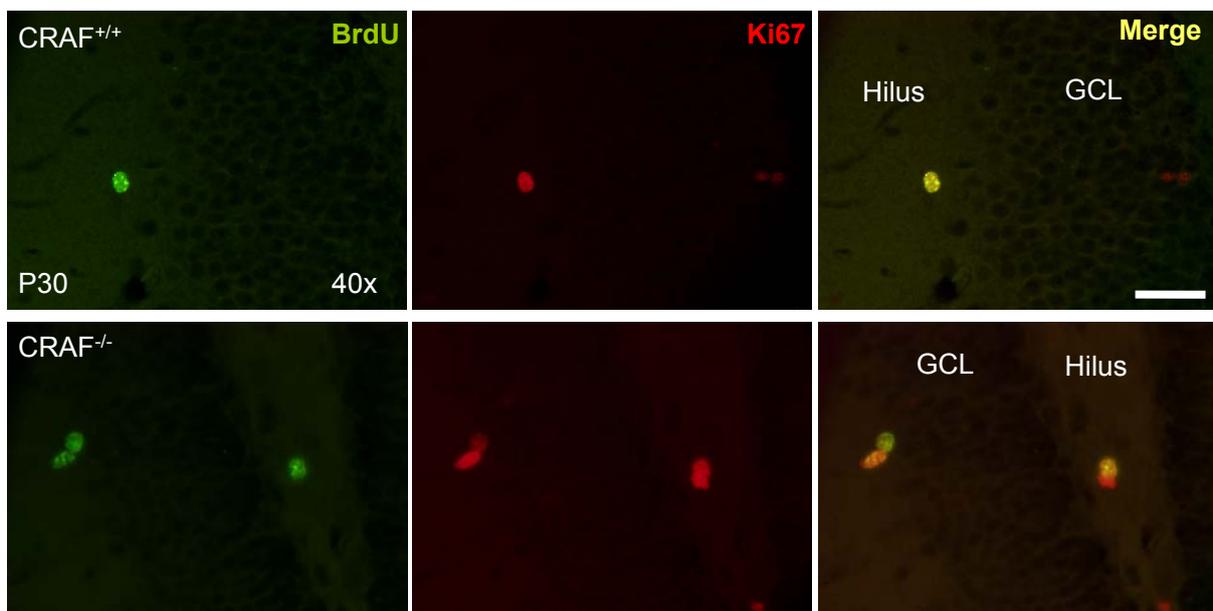


Abb.3.62. BrdU/Ki67 IHC junger adulten Tiere 24h nach einmaliger BrdU Applikation. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU/Ki67 doppelt-positiver Zellen im DG und Hilus gefunden. Die Anzahl BrdU-einzelpositiver Zellen ist im DG CRAF-defizienter Tiere signifikant höher als bei Kontrollversuchstieren. Größenstandard 50µm.

3.11. Bestimmung der Körnerzellschichtdicke durch NeuN

Die Bestimmung der Körnerzellschichtdicke durch NeuN (siehe Abb.3.63./Abb.3.65.) sollte das erhöhte Proliferationspotential bei jungen adulten Nullmutanten weiter charakterisieren. Würden zum Zeitpunkt P30 weitere Zellen aus dem Hilus in die Körnerzellschicht des DG einwandern und dort zu Neuronen heranreifen, müsste sich dies in einer flächenmäßigen Zunahme des GCL äußern. Quantitative Analysen der NeuN IHC Auswertung zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Körnerzellschichtdicke bei adulten Tieren (Tab.3.31.). Auch der Einfluss einer angereicherten Umgebung (3.12.1.2.) scheint keine Auswirkung auf die Körnerzellschichtdicke zu haben (Tab.3.32.). Demzufolge bedeutet eine erhöhte Proliferationsrate im Hilus nicht gleichzeitig auch eine Zunahme an reifen Körnerzellen im DG.

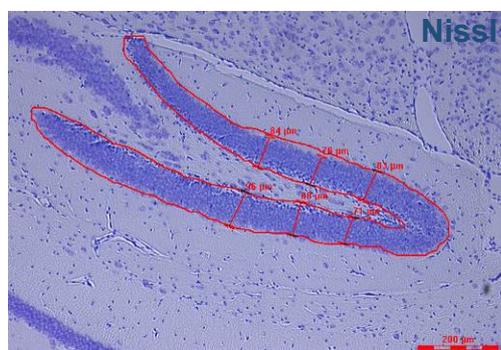


Abb.3.63. Schematische Darstellung der DG Flächenbestimmung durch Nissl. Die Flächenbestimmung der NeuN gefärbten Körnerzellschicht erfolgte analog der Nissl Auswertung durch das Leica Microdissection Mikroskop bei Rotfluoreszenz. Zusätzlich wurde die dorsale und die ventrale Dicke des DG gemessen. Größenstandard 200µm.

NeuN Fläche P30/P39L.P.	P30 NC m	P30 ERV	P39LP NC
CRAF ko P30m Fläche (µm²)	2,07	2,15	2,35
S.E.M.	0.14	0.15	0.09
CRAF wt	2,29	2,21	2,39
S.E.M.	0.16	0.21	0.22
p-value	0.29	0.75	0.59
n=	3	4	3
CRAF ko P30m dDicke (µm)	80,71	74,87	86,23
S.E.M.	3.61	2.41	1.96
CRAF wt	84,27	76,65	78,6
S.E.M.	1.66	0.63	3.37
p-value	0.46	0.92	0.27
CRAF ko P30m vDicke (µm)	80,39	75,68	84
S.E.M.	0.19	3.43	2.25
CRAF wt	92,11	76,88	76,47
S.E.M.	3.28	4.30	3.61
p-value	0.07	0.35	0.28

Tab.3.31. Datensatz zur Bestimmung der NeuN Fläche und der dorsalen (d) und ventralen (v) Dicke der Körnerzellschicht adulter Tiere. (m) Männchen.

NeuN Körnerzellschicht					p-value	
CRAF P30 NC/ERV Bedingung	CRAF ko NC	CRAF wt NC	CRAF ko ERV	CRAF wt ERV	ko/ko	wt/wt
NeuN Fläche/µm ²	2,07	2,29	2,23	2,30	0.27	0.59
S.E.M.	0.14	0.16	0.13	0.17	ND	ND
					n=3	n=3

Tab.3.32. Datensatz zur quantitativen Analyse der NeuN Körnerzellschicht adulter Versuchstiere unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen.

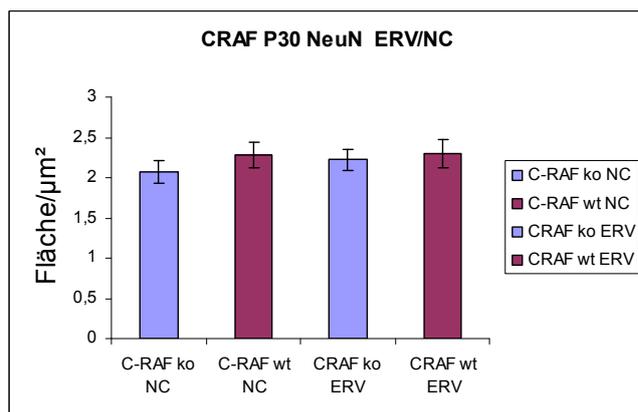


Abb.3.64. Graphische Darstellung der NeuN Körnerzellschicht adulter Tiere unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen.

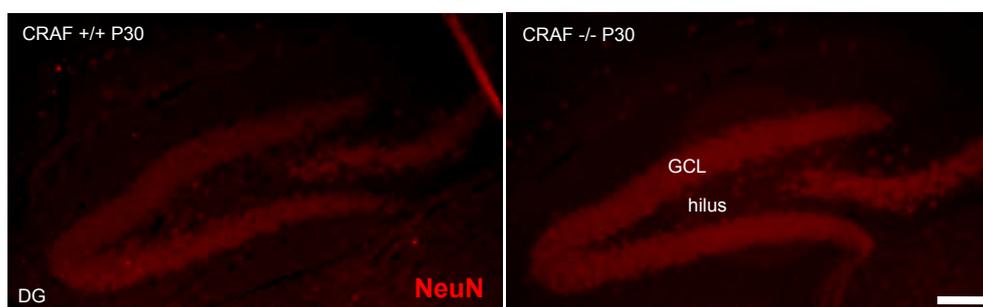


Abb.3.65. NeuN Immunfärbung des DG adulter Tiere zum Zeitpunkt P30. Morphologisch lassen sich keine Unterschiede zwischen den Versuchstieren erkennen. Auch die quantitative Körnerzellschichtbestimmung zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstieren. Größenstandard 50µm.

3.12. Experimentelles Design für die neuronale Determinierung des NPC-Pools

Um das Zellschicksal der BrdU-markierten proliferierenden Vorläuferzellen im Hilus adulter CRAF-defizienter Tiere besser charakterisieren zu können, wurden verschiedene Langzeitstudien mit unterschiedlicher BrdU Applikation durchgeführt. Langzeitstudien mit multipler BrdU Applikation (Abb.3.66.) führen zu einer insgesamt größeren Zellpopulation (Palmer et al., 2000, Kempermann et al., 2003, 2004), während Langzeitstudien mit einmaliger BrdU Applikation (Abb.3.67.) eine bessere Differenzierung ermöglichen. Nach Kempermann et al. (2004) ist die höchste Differenzierungsrate BrdU-markierter Zellen zu postmitotischen, NeuN exprimierenden Zellen nach drei bis sieben Tagen chase-Phase zu erwarten.

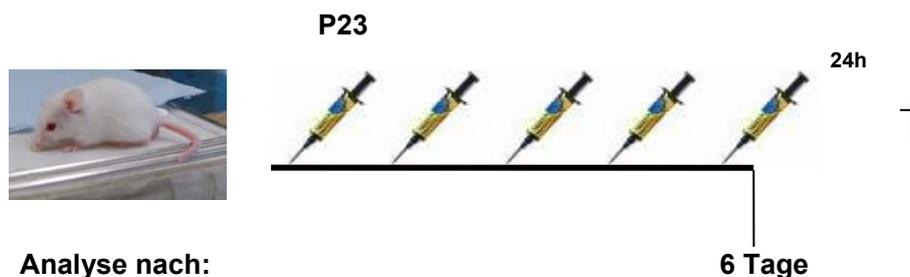


Abb.3.66. Experimentelles Design der Langzeitstudie (Ip) mit multipler BrdU Applikation. Um den „Zellpool“ BrdU-markierter Zellen zu erhöhen, erhielten die Versuchstiere über fünf aufeinander folgenden Tagen, zu genau definierten Tageszeiten, eine tägliche BrdU Applikation von 50mg/kg Körpergewicht i.p.. Die Versuchstiere wurden 24h nach der letzten BrdU Applikation analysiert.

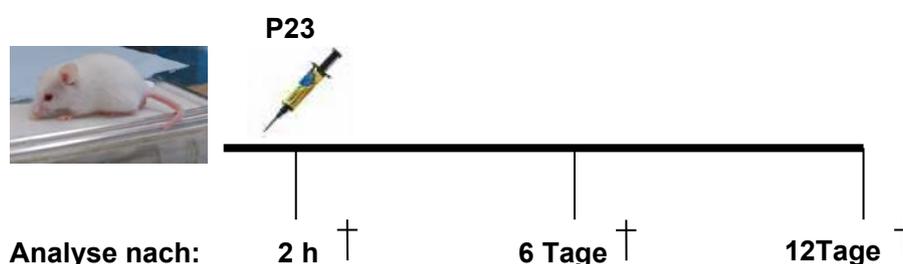


Abb.3.67. Experimentelles Design der Langzeitstudien mit einmaliger BrdU Applikation. Für eine bessere Differenzierungsdiagnose der markierten Zellen über einen bestimmten Zeitraum erhielten die Versuchstiere eine einmalige BrdU Applikation. Die Analyse der markierten Zellen erfolgte dann nach sechs und zwölf Tagen. Zwei Stunden nach BrdU Applikation wurde das Proliferationsverhalten neuraler Zellen zu Beginn des Versuchs dokumentiert. Zudem wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt. Der Beginn der Studie wurde so gewählt, dass auch nullmutante Versuchstiere das Zelldifferenzierungsexperiment über eine chase-Phase von zwölf Tagen lebend passieren konnten.

3.12.1. IHC Auswertung der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation

Die immunhistologische Differenzierungsanalyse mit multipler BrdU Applikation (Abb.3.66.) wurde unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen durchgeführt. Dabei sollte beobachtet werden, ob der Einfluss einer angereicherten Umgebung (ERV) Auswirkungen auf die Proliferation und das Überleben der BrdU-markierten Zellen hat.

3.12.1.1. Langzeitstudien mit multipler BrdU Applikation bei Standardlabortierhaltung

Die Differenzierungsanalyse der Langzeitexperimente mit multipler BrdU Applikation (Abb.3.66.) zeigt signifikante Unterschiede in der Zellproliferation (Abb.3.68.A) und in der Zelldifferenzierung der BrdU-markierten Zellen zu reifen postmitotischen Neuronen (Abb.3.68.B/Abb3.69.). Dabei erreichen prozentual weniger BrdU-markierte Zellen bei CRAF-defizienten Tieren eine neuronale Differenzierung (NeuN⁺), obwohl das Proliferationsverhalten bei Nullmutanten deutlich höher ist (Tab.3.33./Abb.3.68.B).

Multiple BrdU Applikation: 5x BrdU Puls				
n=5	Nissl Volumen	BrdU DG	BrdU+NeuN DG	Anteil B+N kolok.
P30 Ip BrdU	ND			
av ko	0,22	2038,2	50,6	0,0248
S.E.M.	0.01	254	9.03	0.005
av wt	0,25	1222,6	59,2	0,048
S.E.M.	0.01	210	18.28	0.02
p-value	0.0099	0.043	0.69	0.04

Tab.3.33.Datensatz zur Langzeitstudie (Ip) mit multipler BrdU Applikation bei Standardlabortierhaltung.

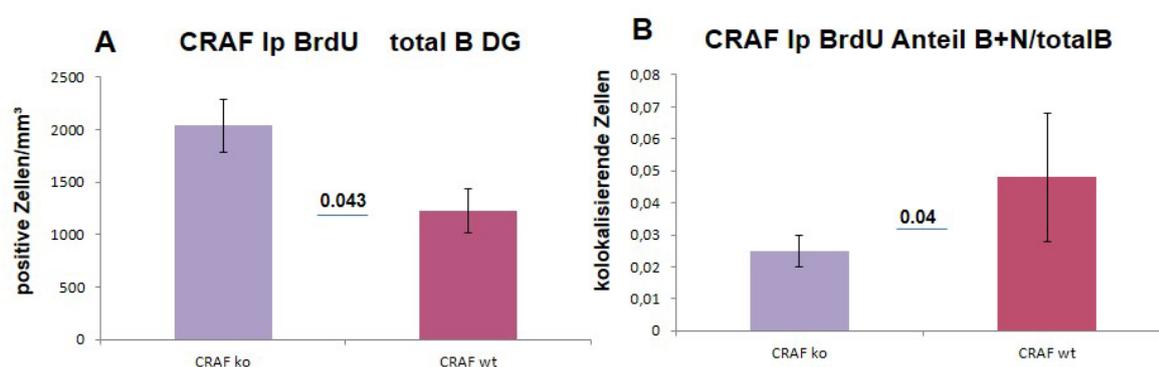


Abb.3.68. Graphische Darstellung der BrdU-IHC Auswertung junger adulter Tiere der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation unter Standardlabor-Tierhaltungsbedingungen. (A) BrdU-positive Zellen/mm³. (B) Anteil neuronal differenzierter (NeuN⁺) BrdU-markierter Zellen.

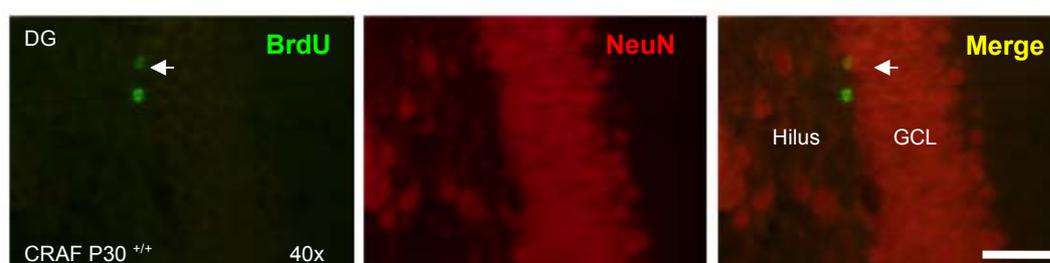


Abb.3.69. BrdU/NeuN IHC der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation. Größenstandard 50µm.

3.12.1.1.1. Zellzyklusanalyse der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation

Die Zellzyklusanalyse der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation erfolgte nur bei den Tieren, die unter Standard-Labortierhaltungsbedingungen gehalten wurden. Die quantitative Analyse der BrdU/Ki67 Immunfärbung zeigt signifikante Unterschiede in der DG-Zellproliferation zwischen CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren (Tab.3.34.). Im DG CRAF-defizienter Tiere sind signifikant mehr BrdU-markierte Zellen, die nach einem Differenzierungszeitraum von sechs Tagen (nach multipler BrdU Applikation, Abb.3.66.) eine Kolokalisation mit dem Proliferationsmarker Ki67 aufweisen (Abb.3.70.B). Auch der prozentuale Anteil BrdU/Ki67-doppelt-positiver Zellen ist im DG CRAF-defizienter Tiere signifikant erhöht (Abb.3.70.C).

Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation unter Standardlabortierhaltungsbedingungen							
BrdU Ki67 IHC							
n=4	DG Total BrdU	DG Ki67	DG Kolok. BrdU+Ki67	Hilus BrdU	Hilus Ki67	BrdU+ Ki67 kolok/ Total BrdU (%) im DG	BrdU+ Ki67 kolok/ Total BrdU (%) im Hilus
av ko	2443,4	906	145	633	282	6	6
av wt	1463	808	40	347	158	3	6
S.E.M. ko	192	116	14.8	153	61	1	1
S.E.M. wt	193	94	8.9	110	43	0.7	1
p-value	0.04	0.45	0.007	0.014	0.13	0.007	1

Tab.3.34. Datensatz zur BrdU/Ki67 Immunfärbung der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation unter Standardlabortierhaltungsbedingungen.

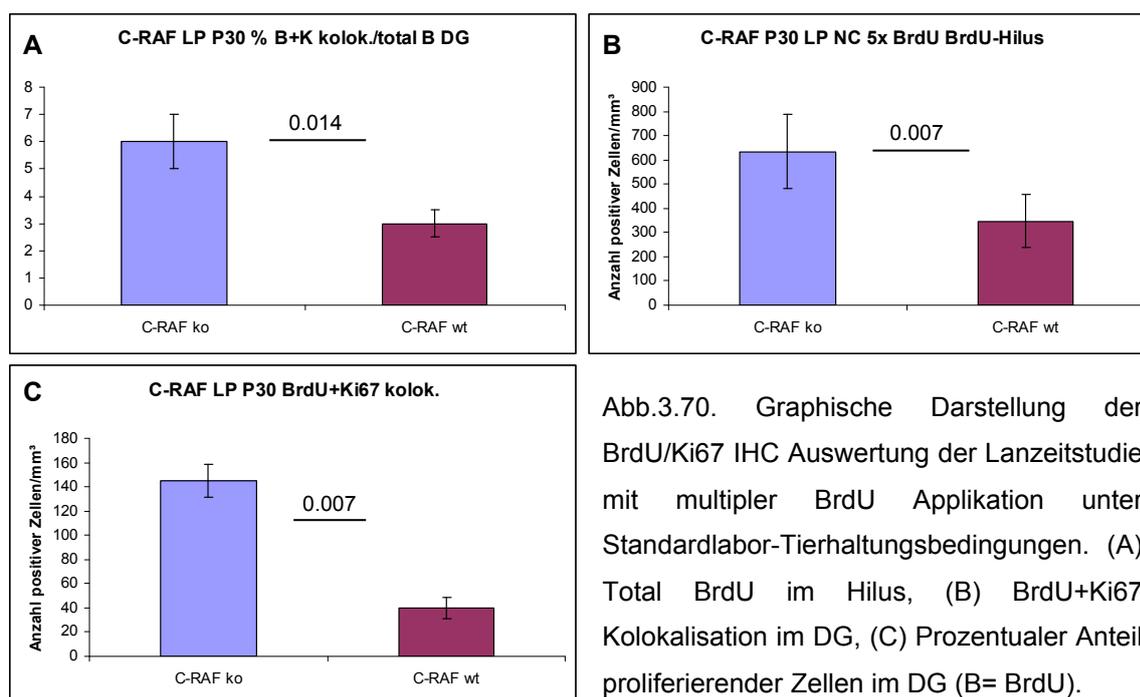


Abb.3.70. Graphische Darstellung der BrdU/Ki67 IHC Auswertung der Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation unter Standardlabor-Tierhaltungsbedingungen. (A) Total BrdU im Hilus, (B) BrdU+Ki67 Kolokalisation im DG, (C) Prozentualer Anteil proliferierender Zellen im DG (B= BrdU).

3.12.1.2. Langzeitstudien mit multipler BrdU Applikation in einer angereicherten Umgebung

Auch in der angereicherten Umgebung zeigt die Differenzierungsanalyse der BrdU-markierten Zellen signifikante Unterschiede in der neuronalen Determinierung zu postmitotischen, NeuN exprimierenden Zellen zwischen CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren (Abb.3.71.).

Erlebnisstall 5x BrdU (LP P30)				
n=4	absolut BrdU DG	BrdU+NeuN DG	%B+N/B DG	Kolokalisation B+N/Total B
av ko	1870	22,25	1,93 %	0,02
S.E.M.	442	3,59	0,896	0,009
av wt	1237,75	80	7,75 %	0,08
S.E.M.	292	7.5	1.887	0.02
p-value	0.20	0.003	0.049	0.02

Tab.3.35. Datensatz zur Langzeitstudie mit multipler BrdU Applikation in einer angereicherten Umgebung.

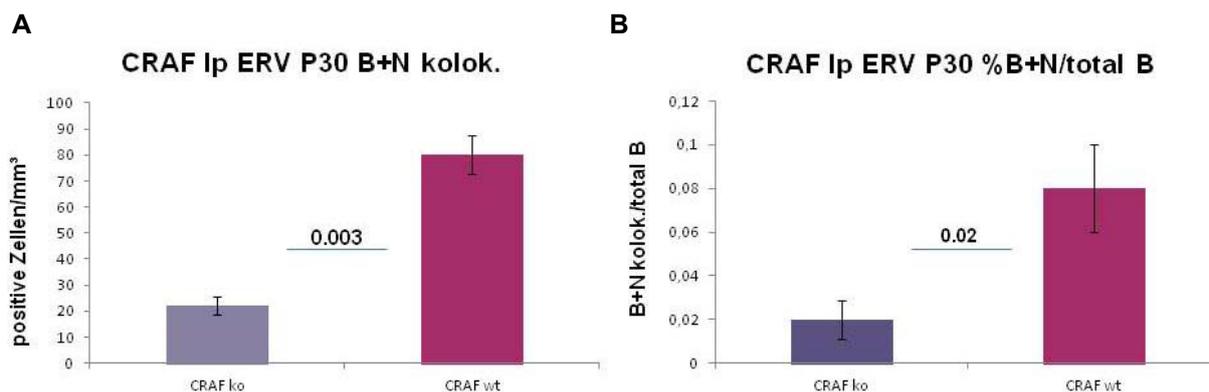


Abb.3.71. Graphische Darstellung der Langzeitexperimente mit multipler BrdU Applikation in einer angereicherten Umgebung. Signifikante Unterschiede gibt es in der Anzahl BrdU/NeuN exprimierender Zellen (A), aber auch der prozentuale Anteil postmitotischer Zellen mit BrdU Markierung ist bei CRAF-defizienten Tieren signifikant geringer als bei Kontrollversuchstieren (B).

3.12.1.3. Gegenüberstellung der unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen

Die Langzeitexperimente mit multipler BrdU Applikation zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU-markierter Zellen im DG bei unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen (Tab.3.36.). Es kann jedoch eine leichte Proliferationszunahme ($\Delta 1.3\%$) im DG bei Kontrollversuchstieren in der angereicherten Umgebung beobachtet werden, während Nullmutanten eine Proliferationsabnahme ($\Delta 8.2\%$) unter ERV-Tierhaltungsbedingungen aufzeigen (Abb.3.72.). Die Differenzierungsanalyse der BrdU-markierten Zellen zu reifen postmitotischen Neuronen zeigt signifikante Unterschiede bei CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren. Bei Kontrolltieren differenzieren signifikant mehr BrdU-markierte Zellen in der angereicherten Umgebung zu NeuN-positiven Neuronen, während bei CRAF-defizienten Tiere signifikant weniger neuronale Differenzierung unter ERV-Bedingungen erfolgt (Tab.3.37.). Der prozentuale Anteil neuronal differenzierter Zellen zeigt bei CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren keine signifikanten Unterschiede bei der unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen (Tab.3.38.).

Vergleich BrdU im DG (Total BrdU)			
CRAF ko ERV	1870	CRAF wt ERV	1238
S.E.M.	442	S.E.M.	292
CRAF ko NC	2038,2	CRAF wt NC	1223
S.E.M.	254	S.E.M.	210
n=	4	n=	4
p-value (ko/ko)	0.55	p-value (wt/wt)	0.94

Tab.3.36. Datensatz zur BrdU Analyse der Langzeitstudien mit multipler BrdU Applikation unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen (Abb.3.72.).

Vergleich Differenzierungsanalyse BrdU+NeuN/Total BrdU im DG			
CRAF ko ERV	22,25	CRAF wt ERV	80
S.E.M.	3.6	S.E.M.	7.5
CRAF ko NC	50,6	CRAF wt NC	59,2
S.E.M.	9.03	S.E.M.	18.28
n=	4	n=	4
p-value (ko/ko)	0.046	p-value (wt/wt)	0.024

Tab.3.37. Datensatz der BrdU/NeuN doppelt-positiven Zellen im Vergleich zur BrdU-Gesamtzahl im DG bei unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen.

Vergleich ERV/NC % kolok B+N/Total B DG			
CRAF ko ERV	1,93	CRAF wt ERV	7,75
S.E.M.	0.89	S.E.M.	1.88
CRAF ko NC	2,44	CRAF wt NC	4,99
S.E.M.	0.53	S.E.M.	3.9
n=	4	n=	3,98
p-value (ko/ko)	0.47	p-value (wt/wt)	0.72

Tab.3.38. Datensatz zur BrdU/NeuN Differenzierungsanalyse des prozentualen Anteils BrdU/NeuN-doppelt-positiver Zellen im Verhältnis zur BrdU-Gesamtzahl im DG unter verschiedenen Tierhaltungsbedingungen.

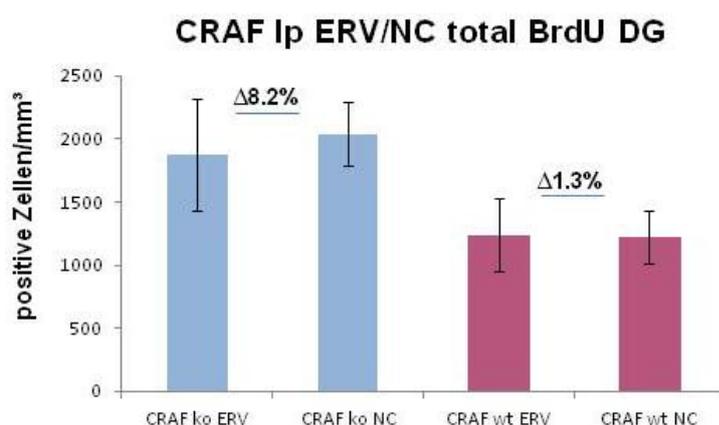


Abb.3.72. Graphische Darstellung BrdU-markierter Zellen im DG nach multipler BrdU Applikation bei unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen.

3.12.2. IHC Auswertung der Langzeitstudie mit einmaliger BrdU Applikation

Die immunhistologische Differenzierungsanalyse mit einfacher BrdU Applikation erfolgte ausschließlich unter Standard-Labortierhaltungsbedingungen. Für die Rahmenbedingungen der gesamten Studie (Abb.3.67.) war die zeitlich limitierte Lebenserwartung der adulten CRAF-defizienten Versuchstiere maßgeblich. Die Differenzierungsanalyse nach sechs und zwölf Tagen ermöglichte eine genaue Diagnose über die Reifungsdauer und das Zellschicksal der BrdU-markierten Zellen. Die 2h chase-Phase bestimmte den „Pool“ proliferierender BrdU-markierter NPCs zu Beginn der Studie (Abb.3.59, Abb.3.67.).

3.12.2.1. 2h BrdU chase-Phase für die NPC Determinierung der Langzeitstudie

Die quantitative Analyse der 2h BrdU chase-Phase im DG und Hilus von CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren zeigt signifikante Unterschiede in der Anzahl BrdU-markierter Zellen, die nicht mit dem Proliferationsmarker Ki67 kolokalisieren (BrdU „alone“) (Tab.3.39./Abb.3.73.A). Zudem zeigen sich signifikante Unterschiede in der prozentualen Darstellung von BrdU/Ki67 doppelt-positiven Zellen zur Gesamtzahl an BrdU-einzelpositiven Zellen im DG (Tab.3.39./Abb.3.73.B).

P23	2h BrdU BrdU/Ki67, DG				Hilus				DG B+K/t. B %		Hilus B+K/t. B %	
	BrdU „alone“ DG	BrdU absolut DG	Ki67 absolut DG	DG kolok. B+K	BrdU „alone“	BrdU	Ki67	BrdU+ Ki67 kolok.	ko	wt	ko	wt
av ko	29	679	2118	650	32	180	359	149	96		87	
S.E.M.	6.7	139			21.6							
av wt	11	557	1767	547	7	186	500	179		98		97
S.E.M.	5.8	123			3.65							
p-value	0.03	0.41	0.39	0.47	0.005	0.91	0.06	0.47	0.02		0.21	

Tab.3.39. Datensatz zur BrdU/Ki67 Immunfärbung nach einer chase-Phase von 2h am Tag P23. (t=total, B=BrdU, K=Ki67).

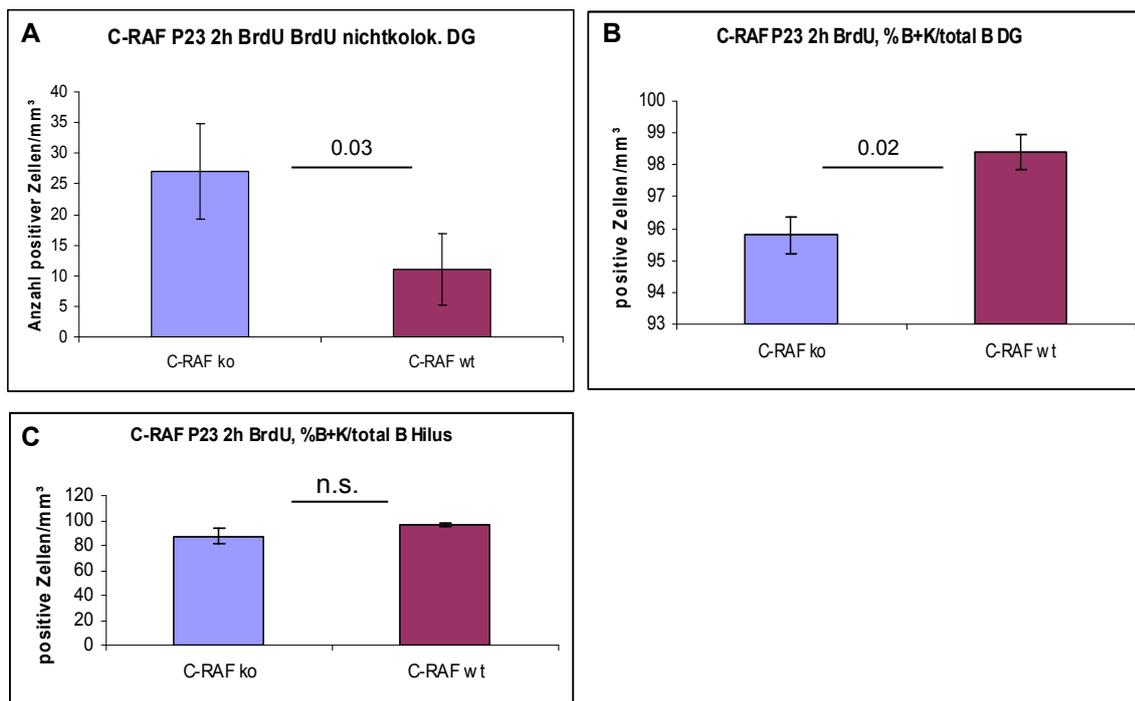


Abb.3.73. Graphische Darstellung der BrdU/Ki67 IHC Auswertung 2h nach einmaliger BrdU Applikation. (A) BrdU-markierte Zellen die nicht mit Ki67 kolokalisieren definieren einen Zellzyklusaustritt und damit die G0 Phase. (B) Prozentualer Anteil BrdU-markierter Ki67-positiver Zellen im DG im Vergleich zur Gesamtzahl BrdU-markierter Zellen. (C) Prozentualer Anteil BrdU-markierter Ki67-positiver Zellen im Hilus im Vergleich zur Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen.

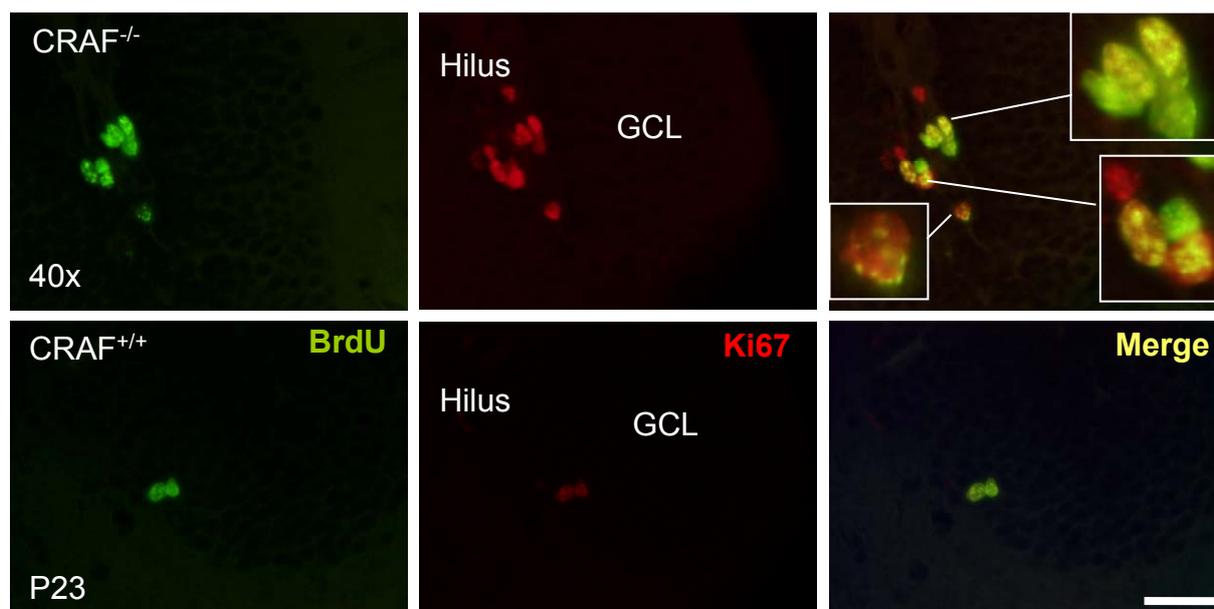


Abb.3.74. BrdU/Ki67 Immunfärbung im DG am Tag P23, 2h nach einmaliger BrdU Applikation. Größenstandard 50µm.

Durch die eindeutige Zuordnung der beiden Marker (BrdU & Ki67) auf bestimmte Phasen der Zellzyklusprogression (Abb.3.59.) kann ein veränderter Zellzyklus bei CRAF-defizienten Tieren in der 2h BrdU chase-Phase Analyse festgestellt werden. Im DG der CRAF-defizienten Tiere werden 2h nach BrdU Applikation signifikant weniger markierte Zellen gefunden, die gleichzeitig den Proliferationsmarker Ki67 exprimieren (Tab.3.39.). Bei CRAF-defizienten Tieren mussten also bereits mehr BrdU-markierte Zellen aus dem Zellzyklus ausgetreten sein und sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden (Abb.3.59.). Es werden auch signifikant mehr BrdU-einzelpositive Zellen im DG der CRAF defizienten Tiere in der 2h BrdU chase-Phase Analyse gefunden (Tab.3.39.). Auch im Hilus können Zellzyklus-abnormalitäten bei CRAF-defizienten Tieren nachgewiesen werden. CRAF-defiziente Versuchstiere haben im Hilus signifikant mehr BrdU-einzelpositive Zellen, die nicht mit Ki67 kolokalisieren (Tab.3.39.). Die signifikanten Unterschiede in der BrdU/Ki67 IHC Auswertung könnten auf einen kürzeren Zellzyklus und den damit verbundenen schnelleren Eintritt der BrdU-markierten Zellen in die G0-Phase des Zellzyklus bei CRAF-defizienten Tieren hindeuten (Abb.3.74.).

3.12.2.2. Differenzierungsanalyse der einmaligen BrdU Applikation nach sechs Tagen

Die Differenzierungsanalyse der einmaligen BrdU Applikation zeigt nach einer chase-Phase von sechs Tagen signifikante Unterschiede in der Anzahl postmitotischer, NeuN⁺ BrdU-markierter Zellen (Tab.3.40./Abb.3.75.A). Auch die prozentuale Auswertung der neuronalen Reifung zeigt signifikante Unterschiede zwischen CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren (Tab.3.40./Abb.3.75.B). Außerdem werden signifikant mehr BrdU-markierte

Zellen im Hilus der CRAF-defizienten Tiere detektiert (Tab.3.40.). Dies konnte bereits in der Kurzzeitanalyse bei P30 CRAF-defizienten Versuchstieren (Abb.3.57.) beobachtet werden.

1x BrdU, 6 Tage chase-Phase BrdU/NeuN IHC									
n=6	Nissl	DG	OZ		MZ		Hilus	B+N/total B DG (%)	
	Volumen/mm ³	BrdU+ NeuN	BrdU	BrdU NeuN	BrdU	BrdU NeuN	BrdU	ko	wt
av ko	0,22	38,5	62,83	1,67	28,33	2	290	6%	36%
S.E.M.	0.02	7.9	26.82	1.67	6.08	0.93	54.58		
av wt	0,28	191,83	16,33	0,83	15,33	6,33	147,33		
S.E.M.	0.04	56.59	4.66	0.83	5.71	2.76	40.69		
p-value		0.03	0.14	0.165	0.11	0.22	0.03	0.011	

Tab.3.40. Datensatz zur BrdU/NeuN IHC, nach einer chase-Phase von sechs Tagen.

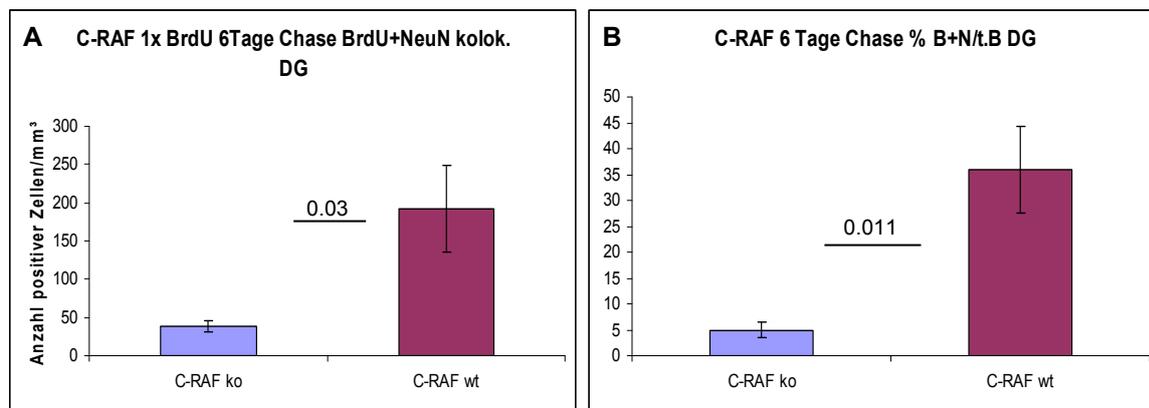


Abb.3.75. Graphische Darstellung der BrdU/NeuN IHC Auswertung nach einmaliger BrdU Applikation und einer chase-Phase von sechs Tagen. (A) Anzahl neuronal-differenzierter NeuN-positiver, BrdU-markierter Zellen im DG/mm³. (B) Prozentualer Anteil differenzierter, BrdU-markierter Zellen zur Gesamtzahl an BrdU im DG.

3.12.2.2.1. Zellzyklusanalyse sechs Tage nach einmaliger BrdU Applikation

Die quantitative Auswertung der BrdU/Ki67 Immunfärbung zeigt signifikante Unterschiede in der Proliferation im DG (Abb.3.76.A, B, D) und im Hilus (Abb.3.76.C, E, F) der CRAF-defizienten Tiere im Vergleich zu Kontrollversuchstieren sechs Tage nach einmaliger BrdU Applikation (Tab.3.41.). CRAF-defiziente Tiere haben signifikant mehr proliferierende NPCs (Abb.3.76.A, C, E), und signifikant mehr BrdU-markierte Zellen, die anhaltend proliferativ aktiv sind (Abb.3.76.B, F).

Zellzyklusanalyse nach einer chase-Phase von sechs Tagen und einmaliger BrdU Applikation											
BrdU/Ki67 IHC			Kolok. DG			Kolok. Hilus		% kolok.B+K/t.B. DG		% kolok. Hilus	
n= 6	DG Total BrdU	DG Total Ki67	B+K	BrdU Hilus	Ki67 Hilus	BrdU+ Ki67	ko	wt	ko	wt	
av ko	929,43	750,7	123,5	263,83	309,6	45,83	12,33		16		
av wt	656,57	679,4	21,17	89	130,6	11,67		3,2		19,83	
S.E.M. ko	127		28	32.9	55.3	11.1	2.2				
S.E.M. wt	104		3.6	16	28	6.4	0.3				
p-value	0.02	0.53	0.007	0.0003	0.0014	0.04		0.009		0.65	

Tab.3.41. Datensatz zur BrdU/Ki67 IHC Auswertung nach einer chase-Phase von sechs Tagen.

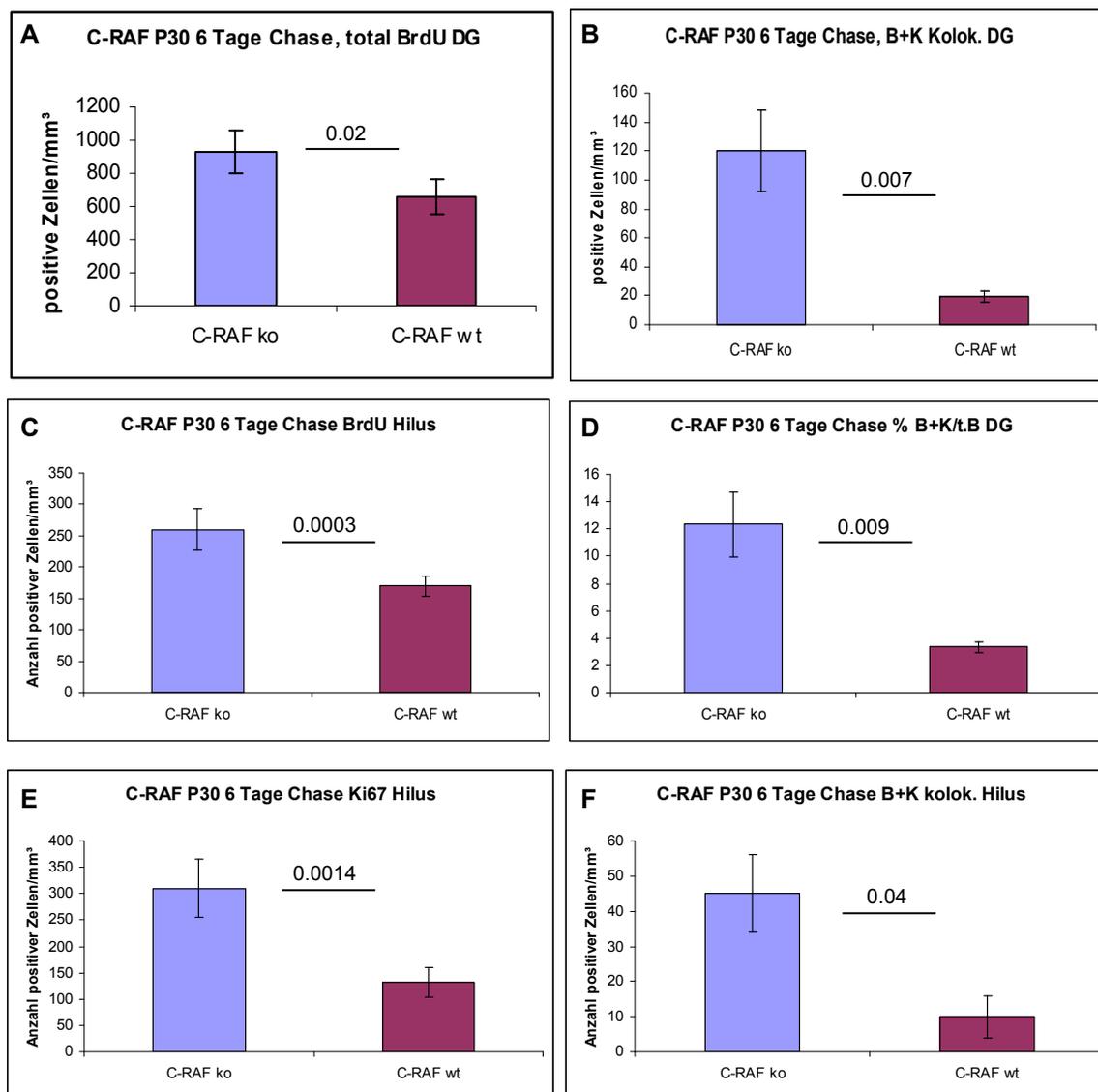


Abb.3.76. Graphische Darstellung der BrdU/Ki67 IHC Auswertung sechs Tage nach einmaliger BrdU Applikation. Junge adulte CRAF-defiziente Versuchstiere haben signifikant mehr BrdU-markierte Zellen im DG (C) und im Hilus (B). (E) Zudem werden signifikant mehr Ki67-positive Zellen im Hilus der Nullmutanten gefunden. Die Zellzyklusanalyse zeigt signifikant mehr proliferierende Zellen sechs Tage nach einmaliger BrdU Applikation bei CRAF-defizienten Tieren im DG (B und D) und Hilus (F) im Vergleich zu Kontrollversuchstieren.

3.12.2.3. Differenzierungsanalyse zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation

Die Differenzierungsanalyse der einmaligen BrdU Applikation zeigt nach einer chase-Phase von zwölf Tagen signifikante Unterschiede in der Anzahl postmitotischer, NeuN⁺ BrdU-markierter Zellen im DG zwischen CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren (Tab.3.42./Abb.3.77./Abb.3.78.). In der zonenspezifischen Auswertung können signifikante Unterschiede in der MZ der Körnerzellschicht gefunden werden (Tab.3.42./Abb.3.77.B). Die prozentuale Darstellung der neuronalen Reifung zeigt signifikant weniger neuronale Differenzierung nach zwölf Tagen Differenzierungszeitraum bei CRAF-defizienten Tieren im

Vergleich zu Kontrollversuchstieren (Tab.3.42./Abb.3.77.C). Im Hilus werden nach diesem Differenzierungszeitraum keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU-markierter Zellen gefunden (Tab.3.42.).

P23-P34		1x BrdU zwölf Tage Chase BrdU/NeuN IHC								
n=6	Nissl Volumen	Total BrdU	BrdU NeuN		OZ BrdU NeuN	MZ BrdU	MZ BrdU NeuN	Hilus BrdU	% B+N/Total B	
			Kolok. DG	BrdU OZ					ko	wt
av ko	0,27	621,33	166,5	41,33	15	59,17	22,17	124,83	27,17	55
av wt	0,28	651	352,17	30,5	17,4	48	33,83	159,17		
S.E.M. ko	0.019	20.67	20.7	10.92	5,19	14.65	9.5	27.66	2.4	
S.E.M. wt	0.02	44.58	44.5	7.28	4,38	10.86	7.2	27.35	3.1	
p-value	0.77	0.81	0.0098	0.38	0.68	0.379	0.012	0.38	0.0003	

Tab.3.42. Datensatz zur BrdU/NeuN IHC nach einer chase-Phase von zwölf Tagen.

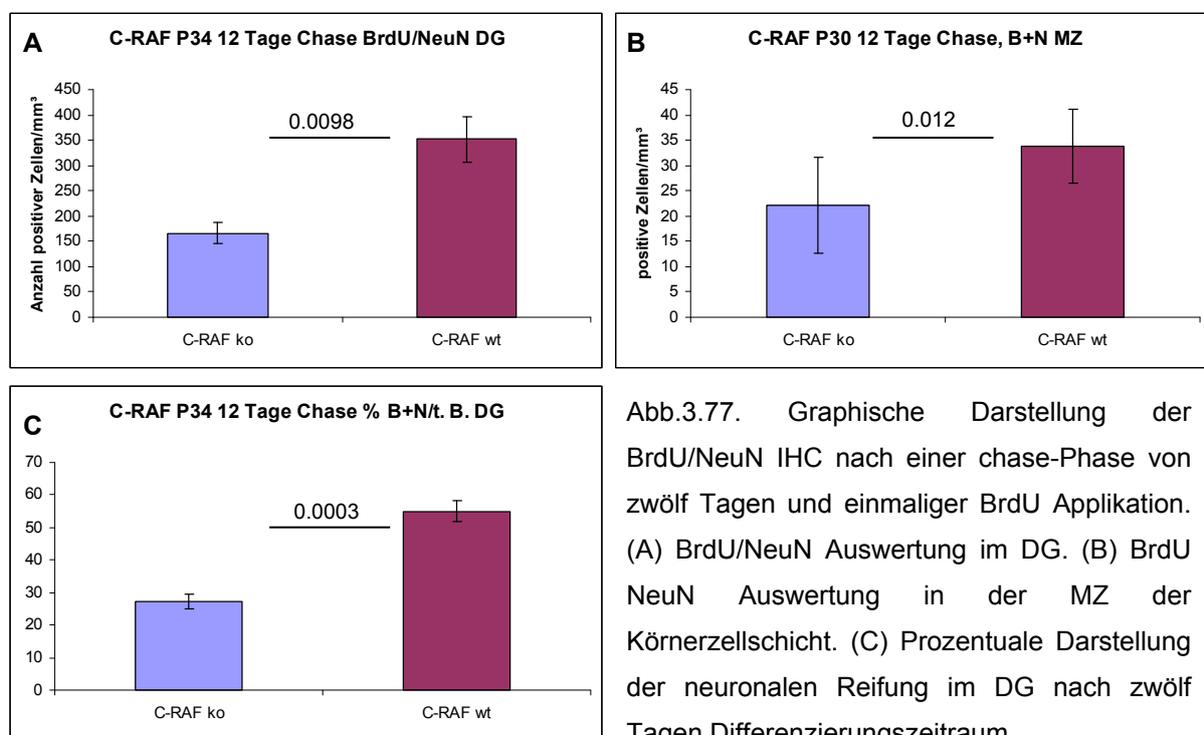


Abb.3.77. Graphische Darstellung der BrdU/NeuN IHC nach einer chase-Phase von zwölf Tagen und einmaliger BrdU Applikation. (A) BrdU/NeuN Auswertung im DG. (B) BrdU NeuN Auswertung in der MZ der Körnerzellschicht. (C) Prozentuale Darstellung der neuronalen Reifung im DG nach zwölf Tagen Differenzierungszeitraum.

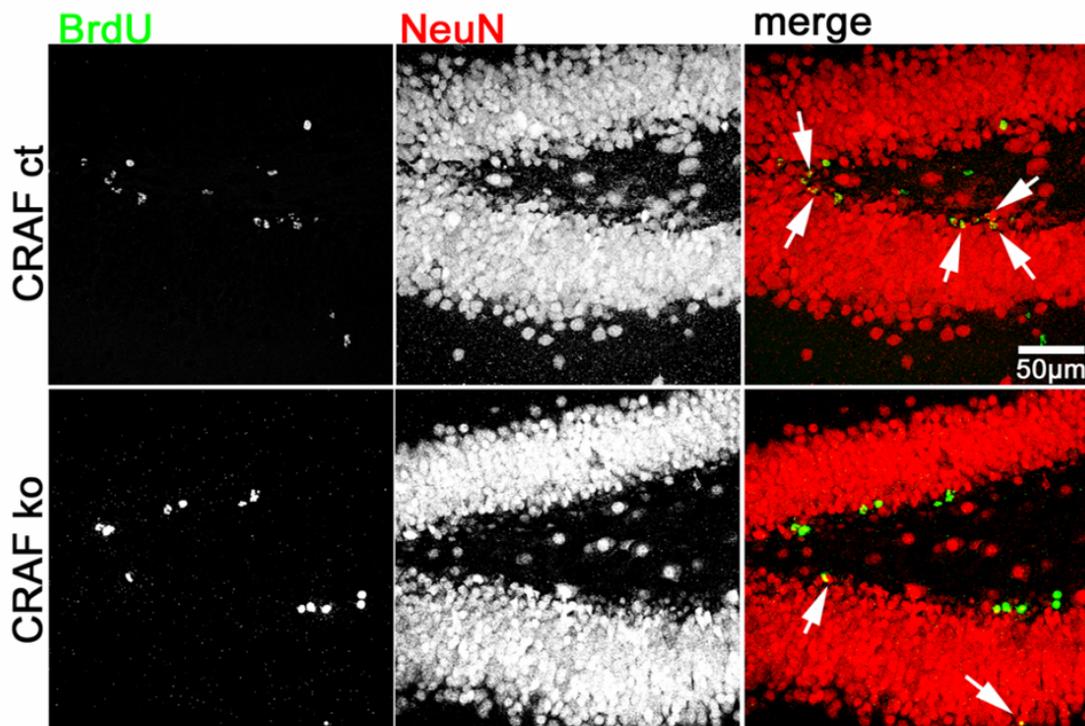


Abb.3.78. BrdU/NeuN IHC im DG am Tag P34 nach einer chase-Phase von zwölf Tagen.

3.12.2.3.1. Zellzyklusanalyse zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation

Zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation können keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation im DG beobachtet werden (Tab.3.43.), während im Hilus der CRAF-defizienten Tieren signifikant mehr Ki67-positive Zellen als bei Kontrollversuchstieren gefunden wurden (Abb.3.79./Abb.3.80.).

Zellzyklusanalyse zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation										
BrdU Ki67 IHC	DG		Kolok. DG	Hilus		Kolok. Hilus	% kolok.B+B/t.B DG		% kolok. Hilus	
	BrdU absolut	Ki67 absolut	BrdU+Ki67	BrdU absolut	Ki67 absolut	BrdU+ Ki67	ko	wt	ko	wt
n=6										
av ko	542	1415	13	111	398	6	2		7	
av wt	578	1336	8	149	260	1	1,6		1,5	
S.E.M. ko	93.47	110.4	5.4	32.3	64.4	2.6	0.6		3.3	
S.E.M. wt	100.8	83.6	2.4	29.7	25.2	1.02	0.4		1.5	
p-value	0.68	0.26	0.29	0.26	0.049	0.19	0.57		0.217	

Tab.3.43. Datensatz zur BrdU/Ki67 IHC Auswertung zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation.

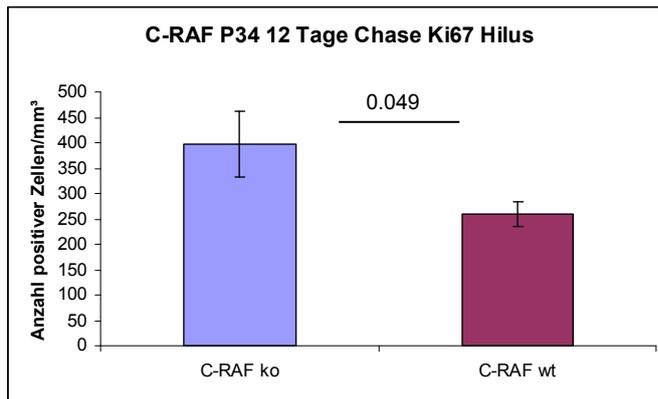


Abb.3.79. Graphische Darstellung der Ki67 IHC im Hilus zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation.

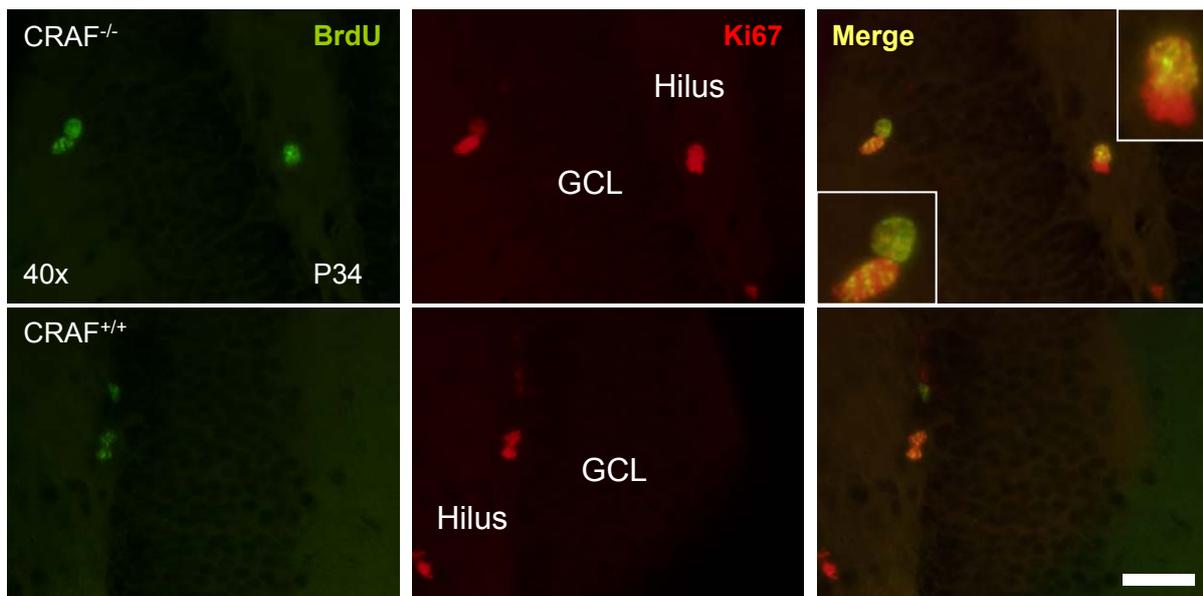


Abb.3.80. BrdU/Ki67 IHC nach einer chase-Phase von zwölf Tagen. Größenstandard 50µm

3.12.2.3.2. Zellschicksalsanalyse zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation

Die BrdU-Markierungsexperimente zeigen eine signifikante Erhöhung der Proliferation im DG (6 Tage Chase 1x BrdU/ 5x BrdU) und Hilus (P30 24h BrdU, 6 Tage Chase 1x BrdU/5x BrdU) bei jungen adulten CRAF-defizienten Tieren. Diese Daten können durch den Proliferationsmarker Ki67 im DG (6 Tage Chase 5x BrdU) und Hilus (2h BrdU, 6 & 12 Tage Chase 1x BrdU/ 6 Tage Chase 5x BrdU) bestätigt werden. Die Zellzyklusanalysen der Langzeitexperimente bestätigen nicht nur das erhöhte Proliferationspotential der CRAF-defizienten NPCs (6 Tage Chase 1x BrdU/5x BrdU), sondern deuten auch auf einen schnelleren Zellzyklus bei CRAF-defizienten Vorläuferzellen hin (2h BrdU, 24h BrdU). Diese Befunde legen die Frage nach dem zellulären Schicksal der BrdU-markierten Zellen nahe, die auch nach einer chase-Phase von zwölf Tagen keine neuronale Reifung erfahren haben. Um diese Frage zu beantworten, wurden BrdU/GFAP Immunfärbungen hinzugezogen, um mögliche neuronale Fehldifferenzierungen in Richtung eines RG-Phänotyps analysieren zu können. Diese Färbung sollte hierbei prüfen, ob durch die Nullmutation von CRAF mehr

BrdU-markierte Zellen zu GFAP-positiven Gliazellen differenzieren, anstatt ein NeuN⁺ neuronales Zellschicksal zu erfahren.

Das Thymidin analoge BrdU wird in die DNA von S-Phasen Zellen aufgenommen und im Zellkern der markierten Zellen exprimiert. Das intracytoplasmatische GFAP Protein konstituiert einen Teil des Astrocyten Cytoskeletts und wird in hippocampalen glialen Zellen mit astrozytärem Charakter hochexprimiert. Die Kolokalisation der beiden Marker erfolgte über mikroskopische Analyse von x,y-z Immunfärbungen (Abb.3.83.). Die Unterscheidung hippocampaler Astrozyten-Typen erfolgte anhand der morphologischen Orientierung nach Seri et al. (2004). Hierbei sind radiale Astrozyten (rA) *Typ 1* hippocampale Vorläuferzellen oder *B-Zellen* mit radialen Fortsätzen und Astrozyten-ähnlicher Zellmorphologie. Horizontale Astrozyten (hA) haben keine radialen Projektionen sondern verzweigte Fortsätze, die parallel zur SGZ der Körnerzellschicht verlaufen (Seri et al., 2004). Die quantitative Auswertung der BrdU/GFAP Immunfärbung zeigt keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU-markierter Zellen mit horizontaler oder radialer Zellmorphologie zwischen CRAF-Nullmutanten und Kontrollversuchstieren (Tab.3.44./Abb.3.82.).

1x BrdU zwölf Tage Chase				% DG		% DG		rA/hA	rA/hA
BrdU/GFAP IHC		rA	hA	rA/total B.		hA/total B.		ko	wt
n=6	BrdU	BrdU+GFAP	BrdU+GFAP						
	total DG	total DG	total DG	ko	wt	ko	wt		
rA								156,7	138,2
hA								27,2	19,3
S.E.M. rA								40.4	19.5
S.E.M. hA								13.4	7.8
av ko	449	156,7	27,2	34		6			
av wt	522	138,2	19,3		24		4		
S.E.M. ko	56.7	40	13.4	7.6		2			
S.E.M. wt	60	19.5	7.8	5.3		1.1			
p-value	0.53	0.61	0.29	0.22		0.25		0.02	0.0008

Tab.3.44. Datensatz zur BrdU/GFAP IHC nach einer chase-Phase von zwölf Tagen.

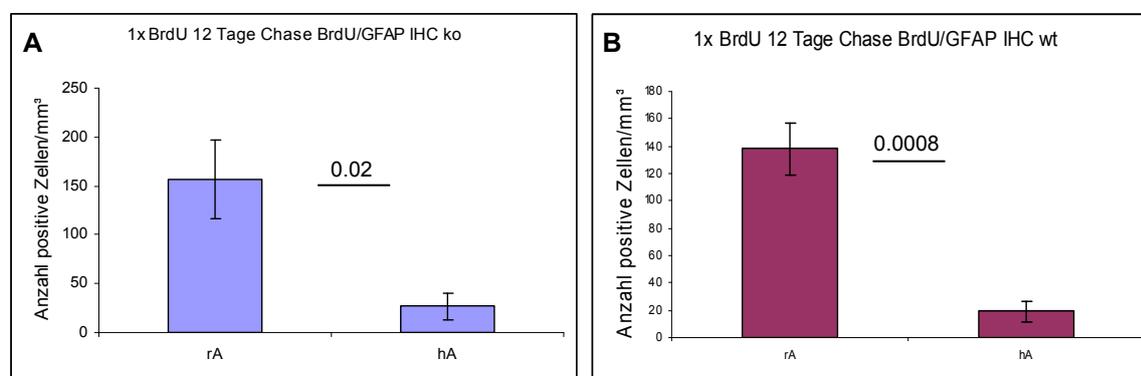


Abb.3.81. Graphische Darstellung der BrdU/GFAP IHC zwölf Tage nach einmaliger BrdU Applikation. (A) Verhältnis zwischen rA und hA bei jungen adulten Nullmutanten. (B) Verhältnis zwischen rA und hA bei Kontrollversuchstieren.

Vergleicht man das Verhältnis zwischen rA und hA, ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen (ko, wt) (Abb.3.81.). Dabei werden bei CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren signifikant mehr BrdU-markierte GFAP-positive Astrozyten mit radialer Zellmorphologie gefunden als BrdU-markierte horizontale Astrozyten (Tab.3.44.).

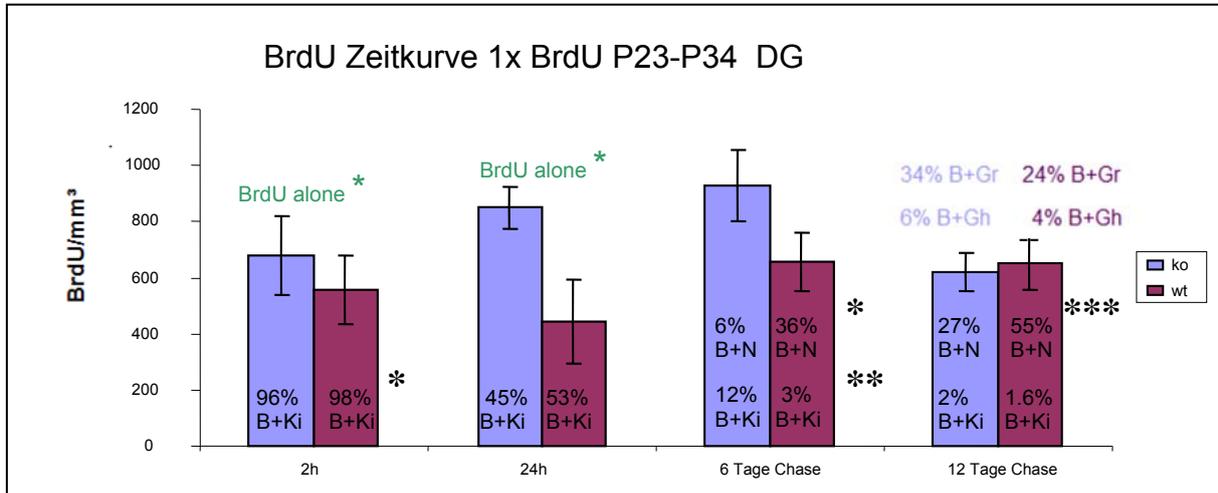


Abb.3.82. Graphische Darstellung der BrdU Zeitkurve mit Differenzierungsanalyse.

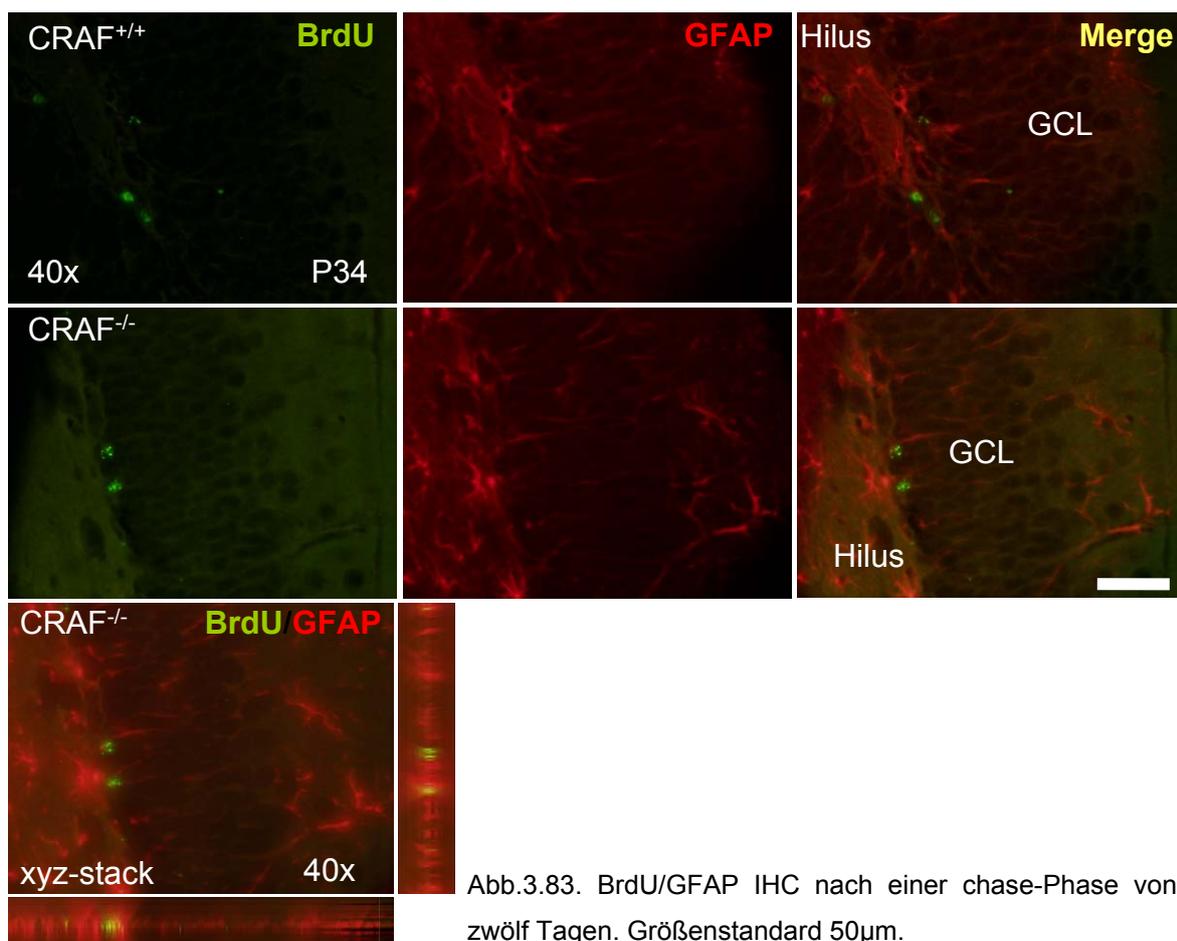


Abb.3.83. BrdU/GFAP IHC nach einer chase-Phase von zwölf Tagen. Größenstandard 50µm.

3.12.2.4. Gegenüberstellung der Zellschicksalsanalysen

Die Gegenüberstellung der BrdU/GFAP IHC Auswertung zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstufen (P10 und P30) und unterschiedlichen Differenzierungszeiträumen (24h und 12 Tage) zeigt eine tendentiell erhöhte Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen bei CRAF-defizienten Tieren im Vergleich zu Kontrollversuchstieren (Tab.3.45./Abb.3.84.).

BrdU/GFAP	P10 24h BrdU chase-Phase	P34 1x BrdU 12d chase-Phase
	% kolokalisierende Zellen	
CRAF ko	29	34
CRAF wt	23	24
S.E.M. ko	3.93	7.5
S.E.M. wt	4.26	5.4
p-value	n.s.	n.s.

Tab.3.45. Datensatz zur Zelldifferenzierungsanalyse nach 24h bzw. zwölf Tagen chase-Phase.

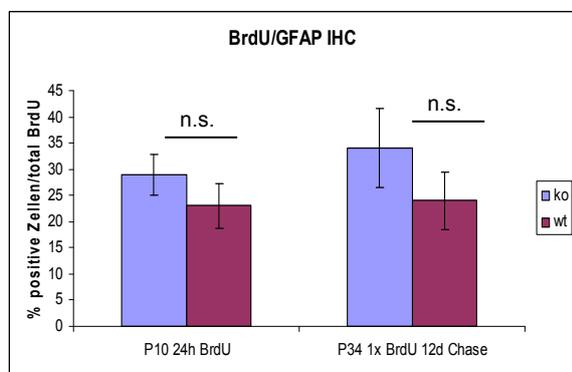


Abb.3.84. BrdU/GFAP Zelldifferenzierungsanalyse bei jungen postnatalen und adulten Tieren.

Nachdem keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl hA zwischen CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren gefunden wurden (Tab.3.45./Abb.3.84.), kann eine neuronale Fehldifferenzierung in Richtung Gliazellen bei CRAF-defizienten Tieren ausgeschlossen werden. Vielmehr wird die anfangs postulierte These verstärkt, dass bei CRAF-defizienten Tieren in der neurogenen Nische des Hippocampus eine vermehrte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen ursächlich zu spezifischen morphologischen Veränderungen im gyrus dentatus beiträgt. Da bei CRAF-defizienten Tieren signifikant mehr BrdU-markierte rA gefunden wurden als hA (Abb.3.81.A), unterstützt die BrdU/GFAP Immunfärbung die Ergebnisse der Proliferationsanalyse.

3.12.3. Zelltodanalyse im DG und Hilus bei jungen adulten Tieren

Im DG von Nagetieren werden jeden Monat 250.000 neue Neurone eingebaut (Seri et al., 2004). Um den Einbau überschüssiger oder fehlerhafter Zellen zu verhindern, werden diese eliminiert. Dieser Eliminierungsschritt kann über unterschiedliche zelluläre Prozesse ablaufen. Autophagy ist dabei der am häufigsten verbreitete Signalweg für den Abbau cytoplasmatischer Bestandteile in eukaryotischen Zellen. Es konnte jedoch keine Autophagy durch die LC3-Immunfärbung im DG und Hilus beobachtet werden (Abb.3.85.).

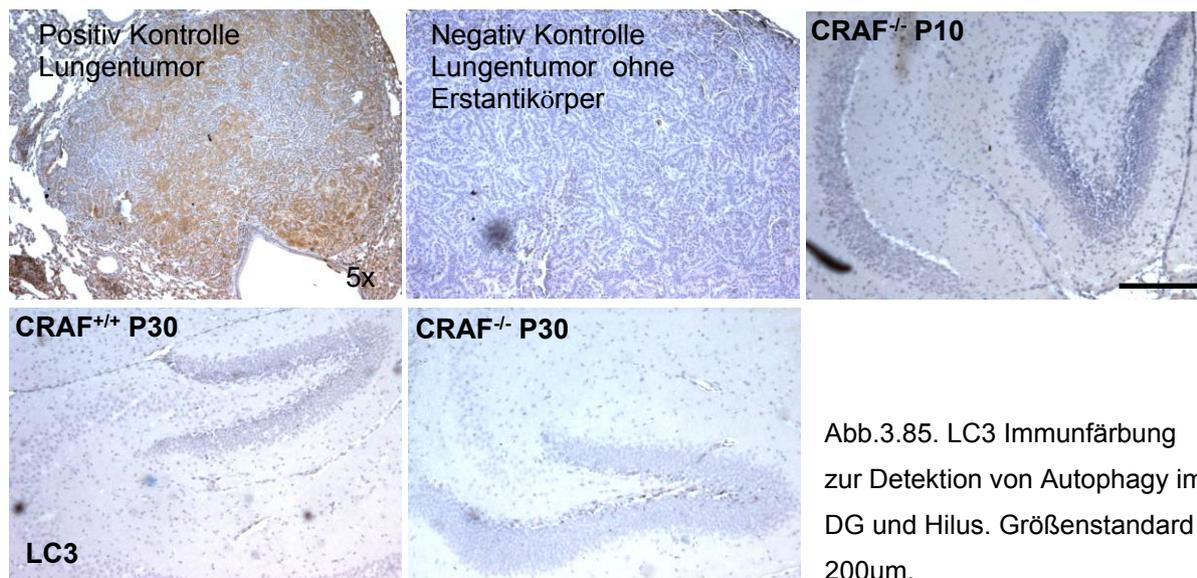


Abb.3.85. LC3 Immunfärbung zur Detektion von Autophagy im DG und Hilus. Größenstandard 200 μ m.

Eine weitere Möglichkeit der Eliminierung überschüssiger bzw. fehlerhafter Zellen ist der programmierte Zelltod oder Apoptose. Apoptose kann über die Aktivierung von Caspasen hervorgerufen werden, es gibt aber auch Caspase unabhängige Signalwege, die zu einem programmierten Zelltod führen.

In dieser Arbeit wurden α -aktivierte Caspase-3 Antikörper als Indikator für den programmierten Zelltod verwendet. Die quantitative Auswertung der aktivierten Caspase-3 Immunfärbung zeigt signifikante Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen im DG (Tab.3.46./Abb.3.86.) und im Hilus zwischen CRAF-defizienten Tieren und Kontrollversuchstieren (Tab.3.46./Abb.3.86./Abb.3.87.).

Caspase-3 IHC, P30	Caspase-3/mm ³	
	DG	Hilus
n=	6	6
CRAF ct	40,25	0
S.E.M.	2.6	0
CRAF ko	102,75	21,66
S.E.M.	10.0	3.0
p-value	0.009	0.023

Tab.3.46. Datensatz zur aktivierten Caspase-3 IHC im DG und Hilus junger adulter Tiere.

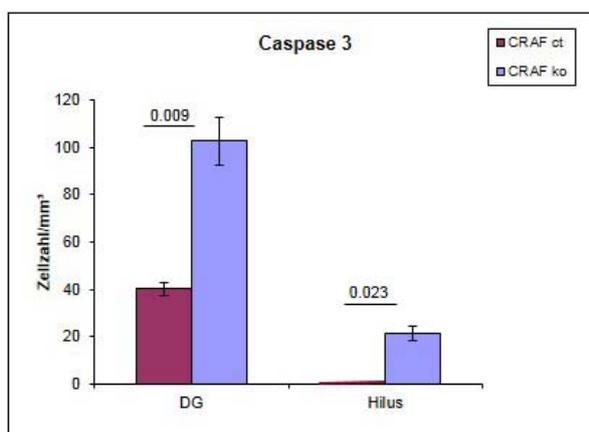


Abb.3.86. Graphische Darstellung der aktivierten Caspase-3 IHC im DG und Hilus junger adulter Tiere (P30).

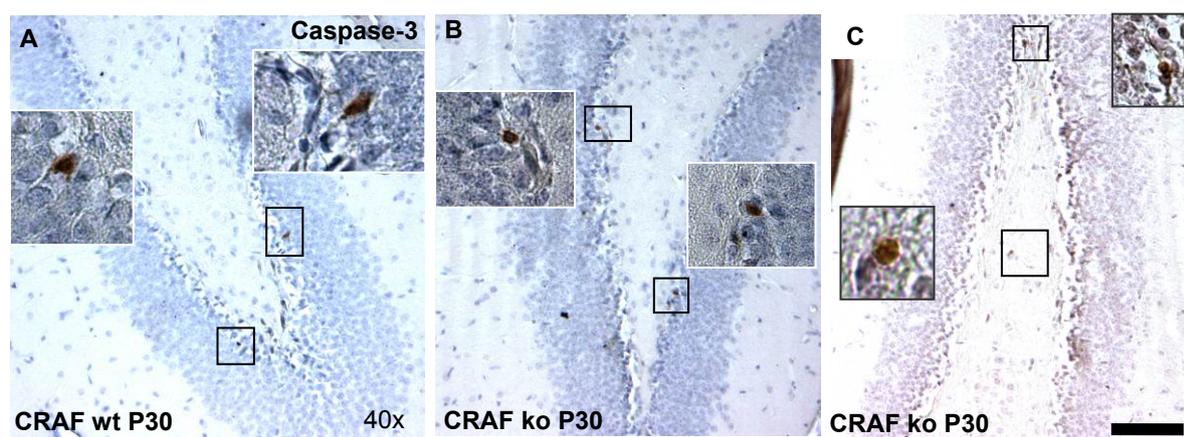


Abb.3.87. Aktivierte Caspase-3 IHC im DG und Hilus junger adulter Tiere. (A) Kontrollversuchstiere haben keine Caspase-3-positiven Zellen im Hilus. (B und C) CRAF-defiziente Tiere zeigen apoptotische Zellen im DG und Hilus. Größenstandard 50µm.

Die quantitative immunhistologische Auswertung der BrdU-Markierung zeigt eine vermehrte Proliferation im DG und Hilus bei postnatalen und jungen adulten CRAF-defizienten Tieren in den unterschiedlichen Differenzierungsanalysen. Stellen wir der Proliferations- und Differenzierungsanalyse nun die Zelltodanalyse durch die aktivierte Caspase-3 Immunfärbung gegenüber, haben junge adulte CRAF-defiziente Tiere im DG und Hilus zusätzlich eine signifikant erhöhte Apoptose (Abb.3.86/Abb.3.87.). Die Caspase-3 IHC Daten zeigen somit den Werdegang nicht differenzierter Zellen im DG und Hippocampus und bestätigen dadurch die bereits in der Literatur beschriebene präventiv apoptotische Wirkung von CRAF (Wang et al., 1996 a, b, 2000, Mikula et al., 2001).

4. Diskussion

Thematischer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Rolle der RAF-Kinase CRAF bei der postnatalen und adulten Neurogenese im Hippocampus. In dieser Studie wurden CRAF-defiziente Mäuse verwendet, die ursprünglich von C. Pritchard in London (CRAF^{ko} engl.) generiert wurden. Diese Tiere besitzen folgende genetische Veränderung: Exon 10 bis Exon 13, die für die Aminosäuren 338 bis 472 kodieren, wurden durch eine Neomycinkassette ersetzt (Hüser et al., 2001), und so eine CRAF-Nullmutation erzeugt. Die Aminosäuren Serin 338 (S338) und Thyrosin 341 (Y341) sind wichtige Bestandteile für die Aktivierung dieser Kinase. Mason et al. (1999) beobachteten Phosphorylierungen an S338 und Y341 bei aktiviertem CRAF, und Dumaz und Marais (2005) bestätigten die benötigte Phosphorylierung der Aminosäure Serin an der Position 338 für die Aktivierung von CRAF. Pritchards homozygote CRAF nullmutante Tiere sind Kinase-inaktiv und können kein funktionales 74kDa CRAF Protein mehr exprimieren (Hüser et al., 2001).

Während alle bisherigen Analysen eine Lethalität der CRAF-defizienten Tiere um den Zeitpunkt der Geburt beschreiben (Hüser et al., 2001, Mikula et al., 2001; Wojnowski et al., 1998) wurde hier durch Einkreuzen in den CD1 Stamm folgendes erzielt: CRAF nullmutante Tiere mit $\geq 75\%$ CD1 Hintergrund können lebend, bis zu einem Alter von ca. fünf Wochen postnatal analysiert werden. Durch unsere jungen adulten CRAF-defizienten Tiere konnte nun auch die Auswirkung der CRAF Nullmutation (Hüser et al., 2001) auf die postnatale Entwicklung analysiert werden. Nicht publizierte Daten aus einer Kollaborationsarbeit mit Prof. K.-P. Lesch, Institut für Psychiatrie der Universität Würzburg zeigen Unterschiede im Angst- und Lernverhalten zwischen adulten CRAF-heterozygoten Tieren und Kontrollversuchstieren. Der Hippocampus ist im Gehirn von Säugetieren die Region, die für das Lernen und die *deklarative Gedächtnisbildung* verantwortlich ist (Kaltschmidt et al., 2006, Jessberger et al., 2009), während automatisierte Handlungsabläufe über das *Verhaltensgedächtnis (prozedurales Gedächtnis)* gespeichert werden, das Hippocampus-unabhängig arbeitet. Bei automatisierten Handlungsabläufen, wie unbewusst ablaufende Bewegungen scheint das Kleinhirn (Cerebellum) eine wichtige Rolle zu spielen (Milner et al., 1998).

Histologische Übersichtsfärbungen von Gehirnpräparaten postnataler und junger adulter CRAF-defizienter Tiere durch H&E und Nissl zeigen keine generellen morphologischen Veränderungen der Hippocampusstruktur. Dafür wurden im *Gyrus dentatus* und Hilus auffällige „Zellkluster“ dunkel gefärbter Zellen gefunden. Durch BrdU-Markierung, eine Methode zur Kennzeichnung proliferierender S-Phasen Zellen, konnte gezeigt werden, dass ab dem postnatalen Entwicklungszeitpunkt P10 CRAF-defiziente Tiere signifikant mehr proliferierende neuronale Vorläuferzellen (NPCs) in der neurogenen Nische des Hippocampus besitzen, als Kontrollversuchstiere. Die terminale Differenzierung der BrdU-

markierten Zellen zu postmitotischen, NeuN-exprimierenden unreifen Körnerzellen im *Gyrus dentatus* ist bei CRAF-defizienten Tieren beeinträchtigt. Normalerweise befinden sich NPCs nach Reorganisation der sekundären Matrix um den postnatalen Entwicklungszeitpunkt P10 in der subgranulären Zone (SGZ) des Hippocampus.

Bei CRAF-defizienten Tieren wurden auch im adulten Entwicklungsstadium signifikant mehr BrdU-markierte NPCs im Hilus der *Gyrus Dentatus* Region detektiert. Zellzyklusanalysen mit unterschiedlichen Phasen-spezifischen Markern (BrdU & Ki67) zeigen bei CRAF-defizienten Tieren einen beschleunigten Eintritt proliferierender NPCs des Hilus in die G0-Phase. Eine Fehldifferenzierung hippocampaler NPCs in Richtung Gliazelle konnte im DG zu unterschiedlichen postnatalen Entwicklungsstufen (P10 & P30) nicht festgestellt werden. Die Fehllokalisierung BrdU-markierter NPCs im Hilus bei jungen adulten CRAF-defizienten Tieren wurde mit einem signifikant erhöhten Zelltod in dieser Zone begleitet. Verhaltensbeobachtungen zeigen eine Beeinträchtigung der Bewegungs-koordination junger adulter CRAF-defizienter Tiere. Weitergehende Untersuchungen konnten morphologische Veränderungen im Kleinhirn von CRAF-defizienten Tieren feststellen, die in Folge der CRAF Mutation als mögliche Ursache für die Verhaltensauffälligkeiten gesehen werden können.

4.1. Phänotypische Analyse CRAF-defizienter Mäuse

Phänotyp-Analyse bei CRAF Mutation aus der Literatur

Hüser et al. (2001) berichten von einer frühen embryonalen Letalität CRAF-defizienter Mäuse in einem gemischten 129Ola/C57Bl6 und 129Ola/MF1 Hintergrund. Im gemischten 129Ola/C57Bl6 Inzuchthintergrund werden abnormale Embryonen bereits zum Zeitpunkt E9.5 detektiert. Dieser Befund konnte im gemischten 129Ola/MF1 Hintergrund ausschließlich bei frühen Rückkreuzungen festgestellt werden. Nach weiteren Rückkreuzungen auf den MF1 Hintergrund werden Lebendgeburten bei CRAF-defizienten Tieren beobachtet. Diese Tiere versterben aber bereits kurz nach der Geburt und zeigen starke Gewichtsverluste, hypozelluläre Lebern und Anämien (Hüser et al., 2001). Im Gegensatz zu CRAF-defizienten Tieren werden heterozygote Tiere nach der erwarteten *Mendelschen Frequenz* geboren. Heterozygote Tiere sind phänotypisch unauffällig und exprimieren 50% weniger CRAF Protein als wildtypische Tiere (Hüser et al., 2001). Hüser's *knock-in* Mutante (RAF-1^{FF/FF}), die einen Aminosäure-Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin an der Position 340/341 (Y340F/Y341F) besitzen, exprimieren das vollständige CRAF Protein, sind fertil und zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten. Unabhängig vom genetischen Hintergrund überleben diese Tiere ein Jahr (Hüser et al., 2001). Im Gegensatz zu CRAF-defizienten Tieren konnte bei Tieren mit dieser Punktmutation eine schwache Kinaseaktivität festgestellt werden.

Auch die geflochtenen CRAF Mäuse (Raf1^{f/-} nesCre⁺) von **Zhong** et al. (2007) sind phänotypisch unauffällig. Kommen Mutationen auf mehreren RAF Genen (z.B. BRAF & CRAF) vor, zeigen sich, je nach Anzahl der deletierten RAF Allele, unterschiedliche

phänotypische Veränderungen. Mutationen auf drei Allelen ($Braf^{fl/+}$ $Raf1^{fl/fl}$ $nesCre^+$ & $Braf^{fl/fl}$ $Raf1^{fl/+}$ $nesCre^+$) führen bei einer homozygoten Deletion von CRAF ($Raf1^{fl/fl}$) zu keinen erkennbaren phänotypischen Veränderungen, während die Deletion von BRAF ($Braf^{fl/fl}$) deutlich kleinere Neugeborene zum Vorschein bringt, die noch vor dem Absetzen versterben (Zhong et al., 2007). Mutationen auf allen vier RAF Allelen ($Braf^{fl/-}$ $Raf1^{fl/-}$ $nesCre^+$) führen zu doppelt-null-Embryonen, die nur bis zum Zeitpunkt E13 lebend detektiert werden können (Zhong et al., 2007).

Bei den hypomorphen CRAF-defizienten Mäusen von **Wojnowski et al.** (1998) betrifft die CRAF Mutation Exon 2. Durch diese Zielgenveränderung hat CRAF seine Haupt-Translationsaktivierungsstelle verloren und CRAF-1^{neo2} Mäuse exprimieren lediglich ein N-terminal verkürztes CRAF Protein mit einer Größe von 62 kDa, bei dem keine Kinase-Aktivität detektiert werden konnte (Wojnowski et al., 1998). Bis zu dem Entwicklungszeitpunkt E10.5 werden homozygote Embryonen in allen getesteten genetischen Hintergründen nach der erwarteten *Mendelschen Frequenz* detektiert. Dabei zeigen sich Wachstumsretardierungen aufgrund eines „Entwicklungsstops“ im C57Bl6 Inzucht-Hintergrund bereits zum Zeitpunkt E10.5, während sie im CD1 Auszucht-Hintergrund (F3-Generation) erst am Tag E12.5 detektiert werden können (Wojnowski et al., 1998). Im CD1 Auszuchtstamm (F3 Generation) werden $\frac{2}{3}$ der CRAF^{neo2/neo2} Mutanten sogar lebend geboren (Wojnowski et al., 1998). Diese Mäuse versterben jedoch bereits kurz nach der Geburt. Hauptverantwortlich für die Letalität CRAF-defizienter Embryonen ist nach Wojnowski et al. (1998) die strukturell veränderte Lunge.

Mikula et al. (2001) sehen als Ursache für die embryonale Letalität ihrer CRAF-defizienten Mäuse eine fetale Leber-Apoptose. Bei diesen CRAF mutanten Tieren resultiert die genomische Zielgenveränderung aus einer *Cre* vermittelten Deletion des *loxP*-flankierten Exon 3 Konstrukts. Im Gegensatz zu den Exon 2 Mutanten von Wojnowski et al. (1998) bewirkt die Exon 3 Deletion von Mikula et al. (2001) einen kompletten Verlust des CRAF Proteins. CRAF-defiziente Tiere werden weder im 129/Sv Inzucht-Hintergrund, noch im 129/C57Bl6 gemischten Hintergrund lebend geboren (Mikula et al., 2001). CRAF-defiziente Föten zeigen ab dem Zeitpunkt E11.5 Wachstumsretardierungen und Entwicklungsverzögerungen und sind stark gewichtsreduziert (Mikula et al., 2001). Auch im gemischten Hintergrund können keine lebenden Mutanten nach dem Zeitpunkt E16.5 detektiert werden (Mikula et al., 2001). TUNEL-Färbungen zeigen auch eine vermehrte Leber-Apoptoserate (Mikula et al., 2001). Die FACS Analyse primärer embryonaler Fibroblasten bestätigt den vermehrten Zelltod der CRAF-defizienten Zellen (Propidiumiodid Färbung) und deutet auf eine erhöhte Todesrate in der G1-Phase des Zellzyklus hin (Mikula et al., 2001). Auch die Zellkulturexperimente mit haematopoetischen Vorläuferzellen aus fetalem Lebergewebe

(E11.5) zeigen einen erhöhten Anteil apoptotischer (AnnexinV-positiver) Zellen bei CRAF-defizienten Kulturen (Mikula et al., 2001).

Gegenüberstellung der bisherigen Ergebnisse aus der Literatur zu unseren Phänotyp-Analysen

Auch bei unseren CRAF-defizienten Tieren werden Unterschiede in der Plazentagröße gefunden, wobei nullmutante Tiere neben ihrer stark reduzierten Körpergröße auch eine deutlich kleinere Plazenta besitzen. Bereits Hüser et al. (2001) und Wojnowski et al. (1998) haben bei CRAF-defizienten Tieren von einer kleineren Plazenta berichtet und zusammen mit Mikula et al. (2001) auch deutlich kleinere homozygot-mutante Tiere detektiert. Weitere phänotypische Auffälligkeiten, wie die blasser wirkende Hautfarbe und nicht fusionierte Augenlider, ermöglichen eine gute Identifizierung CRAF-defizienter Tiere in einem Wurf.

Auch Hüser et al. (2001) und Mikula et al. (2001) haben blässere mutante Tieren gefunden, während Wojnowski et al. (1998) bei neugeborenen (P0) CRAF homozygot Mutanten bereits einen *EOB-Phänotyp* beobachten konnten. Auch bei Hüser et al. (2001) entspricht der Anteil CRAF-defizienter Neugeborener, bis auf wenige Ausnahmen, nicht der erwarteten *Mendelschen Frequenz*, während bei früheren Entwicklungsstufen (E16 und E18) CRAF-defiziente Tiere in der Regel nach *Mendel* detektiert werden konnten. Wojnowski et al. (1998) beobachten CRAF-defiziente Tiere bis zum embryonalen Entwicklungszeitpunkt E10.5 nach der erwarteten *Mendelschen Frequenz*. Neugeborene CRAF-defiziente Tiere wurden auch bei Wojnowski et al. (1998) kannibalisiert aufgefunden. Eine Kannibalisierung der mutanten Tiere aus einem Wurf wird nicht nur bei CRAF-defizienten Mäusen beobachtet, sondern auch von Shimizu et al. (2005) bei Rock-I defizienten neugeborenen Mäusen.

Unsere CRAF-defizienten Tiere, die die kritische Phase um den Zeitpunkt der Geburt überleben, erreichen adulte Entwicklungsstufen bis zum Tag P55. Letalitätsstudien an Embryonen und neugeborenen Tieren zeigen dabei zahlreiche apoptotische Zellen in der Lunge und Leber, wobei der analysierte Zelltod in der Lunge erst um den Zeitpunkt der Geburt dramatisch anzusteigen scheint. Auch Mikula et al. (2001) beschreiben eine frühe fetale Leberapoptose, durch die CRAF-defizienten Tiere den embryonalen Entwicklungszeitpunkt E16.5 auch im gemischten 129/C57Bl6 Hintergrund nicht lebend passieren können. Hüser et al. (2001) und Mikula et al. (2001) berichten von einer hypozellulären mutanten Leber, wobei Hüser et al. (2001) keine vermehrte Leberapoptose in der strukturell veränderten Leber aufzeigen konnte.

Wojnowski et al. (1998) finden strukturelle Veränderungen in der Lunge CRAF-defizienter Embryonen zum Zeitpunkt E19.5. Dabei haben Wojnowskis CRAF-defiziente Embryonen nicht nur eine deutlich kleinere Lunge, die Tiere können trotz normal ausgeführter Atemreflexe ihre Lunge beim Atmen nicht richtig aufblasen. Der Grund hierfür liegt nach Wojnowski et al. (1998) in den unterentwickelten Parenchymzellen der Alveolen. Einen vermehrten Zelltod in der Lunge können Wojnowski et al. (1998) nicht analysieren.

Auch die Analyse EGFR mutanter Mäuse beschreibt bei der Mehrzahl der neugeborenen Tiere unreife Lungen, durch die die Tiere ähnlich der Beobachtung von Wojnowski et al. (1998) starke Respirationsprobleme haben (Miettinen et al., 1995, Sibilias und Wagner et al., 1995). 60% der EGFR mutanten Tiere versterbt bereits während der ersten fünf Lebensstage (Sibilias et al., 1998), während die Analyse unserer CRAF-defizienten Tiere eine Letalität von 72% in einem vergleichbaren Zeitraum ergibt.

Bei der histologischen Analyse der embryonalen Lunge und Leber CRAF-defizienter Tiere können wir keine generellen makroskopischen Unterschiede feststellen. Die Organe unserer CRAF-defizienten Tiere sind vollständig ausgebildet und zeigen keine generellen morphologischen Veränderungen. EGFR mutante Mäuse haben hingegen ähnlich abnormale Veränderungen in der Haut und Lunge, wie sie bereits bei Wojnowski et al. (1998) bei CRAF-defizienten Tieren gefunden wurden (Sibilias und Wagner, 1995, Sibilias et al., 1998, Threadgill et al., 1995). Außerdem können auch bei EGFR mutanten Mäusen Augenlid-Defekte beobachtet werden (Sibilias und Wagner, 1995, Sibilias et al., 1998, Threadgill et al., 1995).

Unsere jungen postnatalen CRAF-defizienten Tiere haben ein sehr dünnes Fell, so dass die hellrosa gefärbte Haut deutlich zu erkennen ist. Auch Wojnowskis CRAF-defiziente Tiere zeigen Hautveränderungen, die auf eine Unterentwicklung der Dermis und Epidermis zurückzuführen sind (Wojnowski et al., 1998). Phänotypische Auffälligkeiten der Haare werden zudem bei TGF α -defizienten Mäusen gefunden. Diese Tiere haben ein wuscheliges Fell und gewellte Barthaare. Vereinzelt können auch bei diesen Tieren Augenlid-Defekte gezeigt werden (Luettke et al., 1993, Mann et al., 1993). Defekte in der Augenlid-Fusion werden auch bei Mäusen berichtet, die eine Mutation im CRAF-Aktivator (Zou et al., 1997) oder in dem zur TGF β -Familie gehörenden Aktivin besitzen (Vassalli et al., 1994). Auch Rock-I und Rock-II mutante Mäuse zeigen dieses phänotypisch auffällige Merkmal (Shimizu et al., 2005, Thumkeo et al., 2005), wobei bei den fünf bis sechs Monate alten homozygot mutanten ROCK-I Mäusen sogar 50% der Tiere Augenprobleme haben (Shimizu et al., 2005). Da der RAS/RAF/MEK/ERK Signalweg durch extrazelluläre Liganden wie den epidermalen Wachstumsfaktor EGF über den EGFR aktiviert wird, kann es zu ähnlichen Phänotypen (unreife Lungen, Augenliddefekte und Hautveränderungen) bei Mäusen mit Mutationen in diesen Genen kommen.

Normalerweise sind die Augenlider bei der Maus zum Zeitpunkt der Geburt geschlossen. Während der Embryonalentwicklung kommt es etwa um den Zeitpunkt E16 zu einer Augenlid-Fusion (Kaufman, 1992), wobei sich die Augenlider dann im Laufe der weiteren postnatalen Entwicklung um den Zeitpunkt P12/P13 wieder zu öffnen beginnen (Findlater et al., 1993, Kaufman, 1992, 2002). Ein bis zwei Tage später sind die Augen dann vollständig geöffnet (Findlater et al., 1993, Kaufman, 1992, 2002). Neben den nicht fusionierten Augenlidern bei CRAF-defizienten Tieren um den Zeitpunkt der Geburt, können

teilweise geschlossene Augenlider auch bei einigen adulten Tieren beobachtet werden. Möglicherweise sind die geschlossenen Augenlider ein Sekundäreffekt des *EOB-Phänotyps* und gehen auf Entzündungen durch Infektionen zurück, die dann zu Vernarbungen führen, die wiederum für die nachträgliche Fusion der Augenlider verantwortlich sind.

Neben dem *EOB-Phänotyp* ist auch die deutlich blassere Hautfarbe ein gutes Unterscheidungsmerkmal neugeborener Nullmutanten zu Wurfgeschwistern. Bei der Maus beginnt die Organentwicklung am zehnten Tag nach der Befruchtung der Eizelle (Wolpert et al., 1999). Die von pluripotenten Stammzellen abstammenden Blutzellen befinden sich anfangs nicht nur im Knochenmark, sondern beim Fötus auch in der Leber (Campbell, 1997). Die blassere Farbe von Leber (Mikula et al., 2001) und Embryo (Hüser et al., 2001, Mikula et al., 2001) könnte daher ihre Ursache in veränderten Stammzellen haben. Möglicherweise werden aber auch weniger rote Blutkörperchen (Erythrozyten) aus den pluripotenten Stammzellen gebildet, da die Anzahl mesenchymaler Stammzellen durch apoptotische Vorgänge reduziert ist. Eine erhöhte Apoptoserate und eine farblos erscheinende Leber wurde bereits durch Mikula et al. (2001) beobachtet.

Der eigentliche Grund für die hohe Letalitätsrate CRAF-defizienter Tiere um den Zeitpunkt der Geburt ist nicht genau bekannt. Durch die Auswertung der aktivierten Caspase-3-Immunfärbung vermuten wir einen Schwellenwert an apoptotischen Zellen, wo es im Falle des Überschreitens zum Absterben des jeweiligen Tieres kommt. Auch bei letalen neugeborenen wildtypischen Versuchstieren werden zahlreiche apoptotische Zellen in der Lunge und Leber gefunden. Dabei haben letale wildtypische Tiere sogar mehr Caspase-3-positive Zellen in ihrer Leber als letale CRAF-defiziente Tiere. Die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen unterscheidet sich stark zwischen lebend und letal detektierten Neugeborenen. Zum Zeitpunkt E16.5 haben CRAF-defiziente Embryonen deutlich weniger apoptotische Zellen in der Lunge und Leber, als zu späteren embryonalen Entwicklungsstufen oder als lebende Tiere um den Zeitpunkt der Geburt. Die meisten apoptotischen Zellen werden in CRAF-defizienten Tieren zum Zeitpunkt E18 detektiert. Alle zum Zeitpunkt E16.5 analysierten CRAF-defizienten Embryonen sind vital, während die Letalitätszunahme um den Zeitpunkt der Geburt mit einem Anstieg an apoptotischen Zellen in der Lunge und Leber zusammen zu hängen scheint. Auch Hüser et al. (2001) und Mikula et al. (2001) beschreiben anämische und entwicklungsverzögerte Embryonen in ihren Studien. Hüser et al. (2001) können im gemischten Inzuchthintergrund zum Zeitpunkt E9.5 vaskuläre Veränderungen im Dottersack und Kopfbereich der CRAF-defizienten Embryonen aufzeigen. Zellproliferations-Analysen durch Ki67-Immunfärbungen ergeben keine signifikante Reduktion an proliferierenden Vorläuferzellen im embryonalen Gehirn, während durch TUNEL-Färbung eine Zunahme an apoptotischen Zellen bei CRAF-defizienten Embryonen gezeigt werden kann (Hüser et al., 2001). Auch im gemischten

Auszuchthintergrund können Hüser et al. (2001) anämische CRAF-defiziente Embryonen beobachten. Vaskuläre Defekte und apoptotische Zellen werden zudem bei Wojnowskis BRAF-defizienten Embryonen gefunden (Wojnowski et al., 1997). Die meisten Embryonen versterben hier bereits im Uterus zwischen dem embryonalen Entwicklungszeitpunkt E10.5 und E12.5 und zeigen dabei starke Entwicklungsverzögerungen und neuronale Defekte. Apoptotische Zellen werden bei Wojnowski et al. (1997) vor allem im Neuralrohr und im mesodermalen Gewebe detektiert. Im Gegensatz zu CRAF-defizienten Embryonen (Wojnowski et al., 1998) zeigen BRAF-defiziente Embryonen einen Anstieg an endothelialen Vorläuferzellen, während differenzierte Endothelzellen vom apoptotischen Zelltod betroffen sind (Wojnowski et al., 1997).

Adulte CRAF-defiziente Tiere

Doch während die meisten bisherigen Studien eine embryonale bzw. sehr frühe postnatale Letalität bei CRAF-defizienten Tieren beschreiben (Hüser et al., 2001, Mikula et al., 2001, Wojnowski et al., 1998, 2000), ist es uns erstmals gelungen, einen kleinen Prozentsatz (<20%) an nullmutanten Tieren bis in die frühe adulte Entwicklungsphase hinein zu analysieren. Unsere postnatalen und jungen adulten CRAF-defizienten Tiere sind deutlich kleiner als die Kontrollversuchstiere und in ihrem Gewicht reduziert. Unter den analysierten adulten CRAF-defizienten Tieren (>P30) sind 66 Männchen und zwölf Weibchen. Adulte CRAF-defiziente Weibchen sind fertil (n=1) und haben ein deutlich höheres Körpergewicht als nullmutante Männchen. Die histologische Analyse der Hoden zeigt normal ausgebildete Spermatiden und Spermien bei einigen CRAF-defizienten Männchen (n=6), während andere nullmutante Männchen in der makroskopischen Analyse keine Hoden haben (n=2), diese lokal verschoben sind (n=1), oder einen Hermaphroditismus (n=1) aufzeigt. Obwohl die Mehrzahl der CRAF-defizienten Männchen morphologisch völlig intakte Fortpflanzungsorgane besitzt können keine positiven Verpaarungsergebnisse mit nullmutanten Männchen verzeichnet werden.

CRAF-defiziente Tiere haben deutlich kleinere Organe als Kontrollversuchstiere. Dabei wird eine Größen- und Gewichtsreduktion am Gehirn, der Lunge, Leber, Niere, Milz und Hoden beobachtet, wobei die größten Unterschiede im Organgewicht bei der Lunge und Leber liegen. Auch Galabova-Kovacs et al. (2008) postnatale **Mox2^{cre/+} BRAF^{ff}** Mäuse haben eine deutlich kleinere Milz als die Kontrollversuchstiere. Bei der histologischen Analyse der Milz unserer CRAF-defizienten Tiere (P30) konnte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Kurt Bommert, Zentrum für innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg, kein morphologischer Unterschied zu den Organen wildtypischer Kontrollversuchstiere festgestellt werden. Auch das Blut von CRAF-defizienten Tieren zeigt keine Unterschiede in der Anzahl CD4-positiver T-Zellen und B-Zellen im Vergleich zu Kontrollversuchstieren auf.

Weitere Parallelen zu anderen Knockout-Studien

Auch bei Pritchards **ARAF**-defizienten Mäusen (Pritchard et al., 1996) werden keine quantitativen Unterschiede bei B-Zellen und T-Zellen im Blut im Vergleich zu Kontrollversuchstieren gefunden. Pritchards Studie ergab letztlich keine genaue Todesursache für ARAF-defiziente Tiere, die im C57Bl/6 Inzuchthintergrund eine maximale Lebenserwartung von 22 Tagen postnatal haben (Pritchard et al., 1996). Phänotypisch auffällig sind ARAF-defiziente Mäuse im C57Bl/6 Inzuchthintergrund durch ihre reduzierte Körpergröße (Pritchard et al., 1996). Nachdem die Mutation auf dem X-chromosomalen ARAF-Gen liegt, sind bei heterozygoten Tieren ausschließlich Männchen von der Nullmutation betroffen. ARAF-defiziente Mäuse zeigen zahlreiche neurologische Veränderungen, die sich in abnormalen Bewegungen, einer veränderten Eigenwahrnehmung des Körpers, Schwierigkeiten beim Einhalten einer aufrechten Körperhaltung, Tremor und einer versteiften Muskulatur äußern (Pritchard et al., 1996). Neben motorischen Defekten werden aber auch intestinale Abnormalitäten bei mutanten Tieren gefunden, die besonders im Dickdarm lokalisiert sind. ARAF-defiziente Mäuse im 129/OLA Auszuchthintergrund haben hingegen keine intestinalen Abnormalitäten oder neurologische Defekte (Pritchard et al., 1996).

Transgene nullmutante **EGFR** Mäuse zeigen nicht nur epiderminologische Veränderungen der Haut, sondern haben auch Respirationsprobleme aufgrund unreifer und strukturell veränderter Lungen (Miettinen et al., 1995, Sibilia und Wagner, 1995, Sibilia et al., 1998, Threadgill et al., 1995). Bei dieser Mutation sind nullmutante Tiere ebenfalls deutlich kleiner als ihre Wurf-Geschwister (Sibilia und Wagner, 1995, Sibilia et al., 1998, Threadgill et al., 1995). Nachdem neugeborene transgene Tiere aufgrund ihrer unreifen Lungen nicht selbständig atmen können (Miettinen et al., 1995, Sibilia und Wagner, 1995), wurde getestet, ob der Lungenphänotyp bei tetraploiden Chimären durch Dexamethasongabe gerettet werden kann. Dieses systemische Kortikosteroid wird auch bei menschlichen Frühchen gegen das Auftreten von BPD (Bronchopulmonale Dysplasie) verwendet. Bei dieser Studie konnte aber kein positiver Effekt durch eine Verlängerung der maximalen Lebenserwartung bei transgenen Tieren erzielt werden (Sibilia et al., 1998).

Der Verlust von **BRAF** in neuronalen Vorläuferzellen führt zum Tod der Mäuse, bevor diese fünf Wochen alt sind (Zhong et al., 2007). Die Tiere sind teilweise hyperaktiv (Zhong et al., 2007) und zeigen Störungen in ihrer Bewegungskoordination (Galabova-Kovacs et al., 2008). Bei Galabova Kovacs et al. (2008) **Mox2^{cre/+}; BRAF^{ff}** Mäusen kann zum Zeitpunkt P18 auch ein Problem bei der Atmung festgestellt werden (http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200709_069/DC1). Auch **BRAF**-defiziente Tiere sind deutlich kleiner als ihre Wurf-Geschwister (Zhong et al., 2007, Galabova-Kovacs et al., 2008).

Nachdem unsere CRAF-defizienten Tiere bis auf wenige Ausnahmen (Tab.2.1.) nicht nach der erwarteten *Mendelschen Frequenz* geboren wurden, vermuten wir eine embryonale Letalität ab dem Zeitpunkt >E16.5 als Ursache für den geringen Anteil CRAF-defizienter Neugeborener. Auch Hüser et al. (2001) und Wojnowski et al. (1998) beobachteten eine sehr hohe Letalitätsrate bei neugeborenen CRAF-defizienten Tieren, wobei bislang in keiner Studie CRAF-defiziente Tiere nach dem Zeitpunkt P1 lebend detektiert werden konnten. Die von Hüser et al. (2001) beschriebene embryonale Letalität aufgrund plazentaler Dysfunktionen wurde auch bei **ROCK-II**^{-/-} Embryonen gefunden (Shimizu et al., 2005). Während Wojnowski et al. (1998) unreife Lungen als Letalitätsursache ihrer CRAF-defizienten Tiere beschreiben, können wir keine morphologischen Veränderungen an den isolierten Lungen unserer CRAF-defizienten Tiere feststellen. Auch Shimizu's et al. (2005) adulte **ROCK-I**^{-/-} transgene Tiere zeigen keine Auffälligkeiten in den Organen, im Blut oder den Geweben, obwohl die meisten Tiere auch hier um den Zeitpunkt der Geburt versterben. Aufgrund der großen Homologien der RAF-Gene wurden auch unsere CRAF-defizienten Tiere auf Organdefekte, wie sie bei Hüser et al. (2001), Wojnowski et al. (1998), Mikula et al. (2001), und Pritchard et al. (1996) gefunden wurden und auf Bewegungsabnormalitäten, wie sie bei Zhong et al. (2007) und Galabova-Kovacs et al. (2008) gezeigt wurden untersucht.

4.2. Phänotypische Analyse SPC CRAF transgener Nullmutanten

Um heraus zu bekommen ob eine Phänotyprettung CRAF-defizienter Tiere über eine Expression von CRAF in der Lunge möglich ist, wurden heterozygote CRAF CD1 Mäuse mit SPC CRAF-transgenen C57Bl6 Mäusen verpaart. Die F2 Generation zeigt SPC⁺ CRAF-transgene Nullmutante, die ausschließlich in ihrer Lunge eine CRAF-Expression haben. Nach der erwarteten *Mendelschen Frequenz* soll $\frac{1}{4}$ der Tiere CRAF-defizient sein und 50% muss den SPC Promotor exprimieren (SPC⁺). Wir konnten 264 Tiere der F2 Generation analysieren. Die Hälfte der Tiere ist SPC⁺, aber nur 2% der genotypisierten Tiere ist CRAF-defizient (n=6). Fünf der CRAF-defizienten transgenen Tiere sind SPC⁺, ein CRAF-defizientes Tier ist SPC⁻. Männliche (n=2) und weibliche (n=3) CRAF-defiziente transgene Tiere sind fertil und haben eine deutlich höhere Lebenserwartung (P164) als CRAF ko CD1 Nullmutante. In beiden Zuchtlinien erreichen weibliche CRAF-defiziente Tiere ein höheres Alter als männliche Nullmutante. Eine wirkliche Phänotyprettung kann bei den CRAF-defizienten SPC⁺ transgenen Tieren nicht beobachtet werden (n=264 Tiere, n=5 CRAF^{-/-} Tiere). Desweiteren zeigt die mikroskopische Analyse der transgenen Lungen Tumore und Metastasen.

4.3. Verhaltensauffälligkeiten bei postnatalen und adulten Nullmutanten

CRAF-defiziente Tiere zeigen einige Verhaltensauffälligkeiten, die auch bei unseren geflochten BRAF-defizienten Tieren beobachtet werden konnten. Setzt man BRAF-defiziente

Mäuse (P21) auf eine dünne Stange, können sich zehn von zwölf analysierten Tieren nicht länger als eine Sekunde auf der Stange halten. Gleichaltrige Kontrollversuchstiere bewegen sich mühelos über eine Minute auf der Stange hin und her. Auch CRAF-defizienten CD1 Tieren gelingt es nicht, sich über mehrere Sekunden auf einer dünnen Stange oder einem vergleichbar schmalen Gegenstand zu halten. Während sich Kontrollversuchstiere mühelos über mehrere Sekunden auf der dünnen Stange hin und her bewegen, stürzten CRAF-defiziente Tiere schon nach wenigen Sekunden ab (n=3). Auch akrobatische Leistungen, wie sie von Kontrollversuchstieren durch das Festhalten mit nur einem Hinterbein oder dem Richtungswechsel auf der Stange durchgeführt werden, sind für CRAF-defiziente Tiere nicht möglich. Sie können ihren Maseschwanz nicht so in die Halte- und Stützmotorik mit einbeziehen, wie Kontrollversuchstiere. Setzt man CRAF-defiziente Mäuse am Käfiggitterrand ab, ist es für sie absolut unmöglich, sich ohne zusätzliche Hilfe der Hinterextremitäten am Gitter hoch zu ziehen. Weitere Tests sollten gezielt die motorischen Fähigkeiten erfassen. Auf dem Laufrad und im Wasserbecken kann jedoch keine motorische Einschränkung festgestellt werden. Koordinationsprobleme ergeben sich erst wieder für CRAF-defiziente Tiere, als sie aus dem Wasserbecken herausklettern wollen und den Beckenrand nur mit den Vorderextremitäten erreichen können.

Um das beeinträchtigte Gleichgewichtsverhalten der CRAF-defizienten Tiere genauer analysieren zu können, wird das Kleinhirn zusammen mit Prof. H. Heinsen, Institut für Pathologie der Universität Würzburg histologisch untersucht. Dabei werden morphologische Auffälligkeiten im *Lobus flocculonodularis* (Lobus L10) und im zentralen Markstrahl bei CRAF-defizienten Tieren beobachtet. Die mikroskopische Auswertung der Nissl-gefärbten Präparate zeigt eine verminderte Anzahl an Afferenzen aus dem Rückenmark in Richtung Kleinhirn. Da dem Kleinhirn wichtige Aufgaben bei der Halte- und Stützmotorik zugeordnet werden, könnten die cytoarchitektonischen Veränderungen eine Ursache für die fehlende Balance und die Koordinationsprobleme darstellen. Zusätzlich werden bei CRAF-defizienten postnatalen Tieren (n=2) Epilepsie-ähnliche Anfälle beobachtet.

Unbewusst ablaufende Bewegungen wie schwimmen oder laufen auf dem Laufrad, sind bei unseren CRAF-defizienten Tieren nicht eingeschränkt. Dafür zeigen sich die Tiere in Bewegungsabläufen stark gehandicapt, die eine gezielte Koordination erfordern (Balancieren, Herausklettern aus dem Wasserbad, Hochziehen am Käfiggitter). Für das Erlernen von motorischen Fertigkeiten, wie beispielsweise Laufen oder Schwimmen, sind das Kleinhirn und die Basalganglien (EPS System, extrapyramidal-motorisches System) für die *prozedurale Gedächtnisbildung* bedeutsam. Nachdem bei unseren CRAF-defizienten Tieren makroskopische Veränderungen im Kleinhirn beobachtet wurden, die hauptsächlich das Vestibulocerebellum (anatomisch *Lobus flocculonodularis* oder L10) betreffen, und L10 mit den Hirnstammzentren des Gleichgewichtsorgans verbunden ist, könnten die

Bewegungsabnormalitäten der CRAF-defizienten Tiere auf fehlerhafte Informationen über die Körperlage zurückgehen, die dann eine Korrektur über die Halte- und Stützmotorik unmöglich machen. In der mikroskopischen Betrachtung ist L10 bei CRAF-defizienten Tieren hypoplastisch und in seiner Form eher plump ausgebildet. Ein *Sulcus* im Bereich L10 fehlt. Der zentrale Markstrahl ist meist nur andeutungsweise vorhanden. Die Gleichgewichts-Koordinationsproblematik der CRAF-defizienten Tiere könnte daher auch durch die morphologischen Veränderungen in L10 hervorgerufen werden, da eingehende Signale über die Körperlage der Tiere hier möglicherweise nicht vollständig verarbeitet werden können. Durch ein fehlerhaftes Signal über die Körperposition ist es den Tieren dann nicht möglich, Ausgleichsbewegungen zur Stabilisierung der Körperlage auszuführen. Veränderungen in der Bewegungskoordination werden auch bei Zhong et al. (2007) in hyperaktiven gewebespezifisch **BRAF**-inaktiven Mäusen gefunden. Pritchards **ARAF**-defiziente P20 Tiere zeigen *Athetosen* (Pritchard et al., 1996), während **TrkC**-defiziente Mäuse, ein „*upstream Target*“ von RAF in der mitogenen Kaskade, Beeinträchtigungen in der Bewegungskoordination haben (Klein et al., 1994). Auch Galabova-Kovacs gewebespezifisch **BRAF**-inaktive Mäuse zeigen Beeinträchtigungen in der Bewegungskoordination, die möglicherweise durch eine Hypomyelinisierung im ZNS hervorgerufen wird (Galabova-Kovacs et al., 2008). Neben einer fehlerhaften Oligodendrocytendifferenzierung *in vitro* kann bei BRAF-defizienten Zellen auch eine verminderte pERK Expression nach PDGF Stimulation beobachtet werden (Galabova-Kovacs et al., 2008). Galabova-Kovacs et al. (2008) entwickeln das Modell der drei möglichen RAF-Komplexe, die bei der Oligodendrozytenreife aktiviert werden können. BRAF ist Hauptaktivator der mitogenen Kaskade dieses Modells (Komplex-I), und so zeigen BRAF-defiziente Zellen auch eine schwächere pERK Expression (Galabova-Kovacs et al., 2008, Zhong et al., 2007). Bei den Komplexen-II und III ist CRAF mit beteiligt. Da Komplex-I ohne Beteiligung von CRAF arbeitet, erklärt dies, warum unsere Analysen kein verändertes pERK-Signal bei CRAF-defizienten Tieren aufzeigt.

4.4. Histologische Analyse der Körnerzellschicht während der postnatalen *gyrus dentatus* Entwicklung

Vereinfacht dargestellt besteht die Morphogenese der Körnerzellschicht während der DG Entwicklung aus zwei Entwicklungsphasen. Die erste Phase läuft bereits pränatal ab und korreliert mit der Bildung der ersten mitotischen Progenitorzellen und postmitotischen unreifen Körnerzellen aus der sekundären Matrix des Neuroepithels. Die Zellen wandern dann während der Embryonalentwicklung in die DG-Anlage ein und siedeln sich hauptsächlich im dorsalen Blatt der entstehenden Körnerzellschicht an (Li und Pleasure, 2004). Die zweite Phase findet erst während der postnatalen Entwicklung statt. Sie beinhaltet die Etablierung einer zweiten neurogenen Nische mitotisch aktiver NPCs, der „tertiären

Matrix“, die innerhalb des DG lokalisiert ist. Aus dieser Schicht werden über 80% der Zellen des DG gebildet. Bis in die adulte Entwicklungsphase hinein kann in dieser neurogenen Nische, die sich in der subgranulären Zone der Körnerzellschicht befindet, die Neubildung von Nervenzellen aufrecht erhalten werden (Altman und Bayer, 1990b, Schlessinger et al., 1975).

Histologische Analysen bei CRAF-defizienten Tieren zeigen keine generellen morphologischen Veränderungen am postnatalen und adulten Hippocampus. Junge postnatalen CRAF-defiziente Tiere (P10) haben keinen signifikanten Unterschied im DG-Volumen im Vergleich zu Kontrollversuchstieren, während junge adulte Nullmutante (P30) ein signifikant kleineres DG-Volumen (~10%) im Vergleich zu wildtypischen Kontrollversuchstieren aufzeigen (Tab.3.19.). Es wurden keine signifikanten Unterschiede im DG-Volumen bei den unterschiedlichen Tierhaltungsbedingungen gefunden (Tab.3.21.). Die genauere Betrachtung des postnatalen Hippocampus zeigt auffällige „Zellkluster“ dunkel gefärbter Zellen in der Nissl Immunfärbung, die besonders im Grenzbereich zwischen Hilus und SGZ lokalisiert sind (Abb.3.42.). „Zellkluster“ werden durch eine Ansammlung vom „mehr als zwei benachbarten Zellen“ definiert (Palmer et al., 2000) und wurden in der Literatur u.a. bereits von Palmer et al. (2000), Seri et al. (2004) und Maekawa et al. (2005) beschrieben.

Immunhistologische Identifizierung der Nissl-Zellkluster

Durch das unterschiedliche „Design“ der BrdU-Markierungsexperimente konnte nicht nur die Identität der Nissl-„Zellkluster“ geklärt werden, sondern zusätzlich auch ein Einblick in die DG-Neurogenese bei postnatalen Mäusen mit einer CRAF-Nullmutation gewonnen werden. CRAF-defiziente Tiere (P10 & P30) haben eine signifikant erhöhte Proliferation (BrdU, Ki67) im DG und Hilus, die weder zu einer vergrößerten Körnerzellschicht, noch zu einer vermehrten neuronalen Differenzierung (NeuN) führt. Zellzyklusanalysen (BrdU & Ki67) zeigen signifikante Unterschiede in der Zellzykluslänge proliferierender NPCs von CRAF-defizienten postnatalen Tieren, während Zellschicksalsanalysen keine Fehldifferenzierung der NPCs in Richtung horizontaler Astrozyten ergeben, aber eine signifikant erhöhte Apoptose im Hilus aufzeigen. Die signifikanten Unterschiede in der Anzahl BrdU-markierter radialer Astrozyten und das signifikant erhöhte Proliferationsverhalten der NPCs lassen uns vermuten, dass die Nissl-„Zellkluster“ der CRAF-defizienten Tiere eher einen NPC-, als einen Apoptose-Status besitzen, da kein vermehrter Zelltod im DG der Nullmutanten beobachtet werden konnte.

Zellzyklusabnormalitäten und Proliferationsveränderungen

Veränderungen in der Zellproliferation werden bei CRAF-defizienten Tieren in der Kurzzeitstudie (24h chase-Phase, P10 & P30), in der Langzeitstudie über einen Differenzierungszeitraum von sechs Tagen und in der multiplen BrdU-Applikationsstudie beobachtet. BrdU-

Langzeitanalysen mit einer chase-Phase von sechs und zwölf Tagen zeigen eine geringere neuronale Differenzierung (NeuN⁺) der BrdU-markierten CRAF-defizienten NPCs, während Zellzyklusanalysen (BrdU & Ki67) einen kürzeren Zellzyklus bei CRAF-defizienten proliferierenden NPCs aufzeigen. Nachdem durch die BrdU-Applikation alle proliferierenden S-Phase Zellen eine permanente Markierung erhalten haben, kann durch die BrdU/Ki67 Immunfärbung nachgewiesen werden, dass CRAF-defiziente NPCs schneller den Zellzyklus durchlaufen und so bereits nach zwei und 24 Stunden chase-Phase signifikant mehr BrdU-markierte CRAF-defiziente NPCs keine Kolo-kalisation mit Ki67 aufweisen, da sich diese Zellfraktion bereits in der G₀-Phase befindet.

Kurzzeit-Experimente zeigen Veränderungen in der postnatalen NPC-Nischenverschiebung

Durch die Reorganisation der *tertiären Matrix* um den postnatalen Entwicklungszeitpunkt P10 sollten proliferierende NPCs aus ihrer ursprünglichen neurogenen Nische, dem Hilus, in die SGZ des DG verschoben sein. Kurzzeit-Analyse (24h chase-Phase) zeigen bei postnatalen CRAF-defizienten Tieren (P10) signifikant mehr proliferierende BrdU-markierte NPCs im DG und Hilus im Vergleich zu Kontrollversuchstieren. Auch bei jungen adulten Nullmutanten (P30) werden signifikant mehr BrdU-markierte NPCs im Hilus detektiert als bei den Kontrolltieren (P30, 24h chase-Phase). Nach der Theorie von Altman und Bayer (1990b) müssten postnatal markierte Zellen vorwiegend in der SGZ des DG, und nicht im Hilus zu finden sein. Da unsere jungen postnatalen Tiere (P10, 24h chase-Phase) die BrdU-Applikation bereits am Tag P9 erhalten haben, könnte die Reorganisation der *tertiären Matrix* bei dieser Versuchstiergruppe noch nicht vollständig abgeschlossen sein. Da aber auch bei unseren jungen adulten Tieren eine vermehrte Proliferation im Hilus beobachtet wurde vermuten wir eine fehlerhafte Nischenverschiebung, durch die proliferierenden NPCs auch zu späteren postnatalen Entwicklungszeitpunkten im Hilus lokalisiert werden können.

Langzeit-Experimente bestätigen die fehlerhafte Reorganisation der tertiären Matrix bei CRAF-defizienten Tieren

Für die fehlerhafte Reorganisation der *tertiären Matrix* unserer CRAF-defizienten Tiere können unterschiedliche Faktoren verantwortlich sein. Auch in der multiplen BrdU-Applikationsstudie, durch die wir die Möglichkeit haben eine insgesamt größere Populationsvielfalt an markierten Zellen zu betrachten (Palmer et al., 2000), deutet die Lokalisierung der BrdU-markierten Zellen auf eine fehlerhafte Umstrukturierung der *sekundären Matrix* hin. Zudem finden wir eine signifikante Zunahme an apoptotischen (aktivierte Caspase-3⁺) Zellen im Hilus der CRAF-defizienten Tiere (P30), die durch eine fehlerhafte Umstrukturierung der adulten neurogenen Nische hervorgerufen werden könnte. Nachdem adulte Tiere normalerweise keine zweite neurogene Zone besitzen, ist die zusätzlich detektierte NPC-Nische im Hilus der CRAF-defizienten Tiere fehllokalisiert. Ein

Eliminierungsprozess über apoptotische Signalwege (aktivierte Caspase-3) wäre eine Möglichkeit dieser Fehllokalisierung entgegen zu wirken.

Bereits Wang et al. (1996a, 1996b und 2000) und Mikula et al. (2001) beschreiben für CRAF eine präventiv apoptotische Wirkung, durch die unsere CRAF-defizienten Tiere einem verstärkten Apoptoseprozess ausgeliefert wären, der sich in unserer Studie besonders bei der Eliminierung der fehlplazierten NPCs zeigen könnte. Da wir keine LC3-positiven Zellen detektieren konnten nehmen wir schlussfolgernd an, dass keine autophagyschen Eliminierungsprozesse bei CRAF-defizienten NPCs vorkommen.

Die neurogene Nische ist eine hochspezialisierte Einheit, die essentiell für das Zellüberleben, die Proliferation und Differenzierung der NPCs ist (Alvarez-Buylla et al., 2004, Lledo et al., 2006, Ming und Song, 2005). Das Verhalten der NPCs im postnatalen DG wird durch eine Vielzahl von Signalmolekülen und Faktoren gesteuert, die zum Teil von den NPCs selber produziert, oder von Nachbarschaftszellen wie Astrozyten, Endothelzellen oder Mikrogliazellen sezerniert werden (z.B. Wachstumsfaktoren wie *VEGF*, *BDNF*, *TGF- β*) (Battista et al., 2006, Jin et al., 2002, Katoh-Semba et al., 2002). Dabei dient das radiale Glia-Fasergerüst nicht nur als Leitstruktur für die Migration und richtige Positionierung der unreifen Neurone im DG, sondern ist auch postnatal, im Zusammenhang mit dem Glycoprotein *Reelin*, das für die Ausbildung des primären radialen Glia-Fasergerüsts des DG benötigt wird, für die korrekte Reorganisation der *tertiären Matrix* in der SGZ verantwortlich. Mäuse, die Mutationen in den Genen der *Reelin*-Signalkaskade haben zeigen falsch-positionierte Körnerzellen im DG (Frotscher et al., 2003, Stanfield et al., 1979, Zhao et al., 2004). Auch *Lef1*, ein Transkriptionsfaktor des canonical/Wnt Signalweges, der pränatal an der Bildung des primären radialen Glia-Fasergerüsts mitbeteiligt ist, spielt bei der Etablierung der neurogenen Zone im Hilus eine wichtige Rolle (Zhou et al., 2004).

Zellschicksalsdeterminierungen bestätigen Proliferationsunterschiede bei CRAF-defizienten Tieren

Auch wenn die Differenzierungsanalyse (BrdU/GFAP) der Kurzzeit-Studie (24h chase-Phase) bei postnatalen CRAF-defizienten Tieren zum Zeitpunkt P10 keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellschicksalsdeterminierung ergibt, bestärkt das Ergebnis ($\Delta 59\%$) den bereits beobachteten signifikant erhöhten NPC-„Pool“ (BrdU⁺) bei jungen postnatalen CRAF-defizienten Tieren. Über die morphologische Orientierung der BrdU-markierten GFAP⁺ Astrozyten kann dabei Auskunft über das NPC (radiale Astrozyten) oder gliale- Zellschicksal (horizontale Astrozyten) gegeben werden. Bereits Seri et al. (2001) zeigen bei adulten Mäusen, dass nach einem Differenzierungszeitraum von zwei Stunden nach BrdU-Applikation über 50% der BrdU-markierten NPCs zu GFAP⁺ *B-Zellen* differenzieren können. Somit kann kein signifikanter Unterschied in der „*B-Zelldifferenzierung*“ (Seri et al., 2001) bei unseren jungen postnatalen CRAF-defizienten Tieren analysiert werden. Bei den adulten CRAF-defizienten Tieren der Langzeit-Studie mit

einer chase-Phase von zwölf Tagen werden signifikant mehr BrdU-markierte Zellen mit einer radialen Zellmorphologie detektiert als BrdU-markierte horizontale Astrozyten. CRAF-defiziente Tiere zeigen in der BrdU/GFAP Immunfärbung nach einer chase-Phase von zwölf Tagen 10% mehr BrdU-markierte NPCs als die Kontrollversuchstiere, während nur sehr geringe Unterschiede ($\Delta 2\%$) in der Gliazelldifferenzierung zwischen den Versuchstieren beobachtet werden können. Eine Fehldifferenzierung der BrdU-markierten NPCs entgegen ihrem neuronalen Schicksal kann demnach ausgeschlossen werden. Weiterhin zeigen CRAF-defiziente BrdU-markierte NPCs keine Migrationsdefekte im DG, die für eine verlangsamte neuronale Differenzierung (NeuN) verantwortlich gemacht werden könnten. Im DG der adulten Tiere kann auch keine vermehrte Apoptose beobachtet werden. Apoptotische Zellkerne haben ein stark kondensiertes Chromatin (*pyknotische Zellen*) (Sibilia et al., 1998) und würden in der Nissl oder H&E Immunfärbung ein ähnliches Merkmal aufweisen, wie die bereits von Palmer et al. (2000) und Seri et al. (2001) beschriebenen proliferierenden NPCs, wobei tote Zellen eine eher runde Morphologie aufweisen (Hu et al., 1997). Auch apoptotische Zellen kommen in Zellverbänden vor, sie werden jedoch nicht über den Proliferationsmarker BrdU markiert (Sibilia et al., 1998).

Zellschicksalsanalysen zeigen eine verlangsamte neuronale Reifung

Nachdem bei CRAF-defizienten Tieren in der Kurzzeit-Analyse eine signifikant erhöhte Anzahl mitotisch-aktiver NPCs im DG und Hilus beobachtet wird, Langzeit-Analysen aber eine signifikant geringere neuronale Differenzierung und Reifung aufzeigen, kann CRAF sowohl an der Bildung der adulten neurogenen Nische, als auch an der Kontrolle der postnatalen Körnerzelldifferenzierung mit beteiligt sein. Durch die Aufrechterhaltung der Proliferation der NPCs werden in der SGZ des adulten DG täglich mehrere tausend neuronale Vorläuferzellen gebildet (Bayer et al., 1982a,b, Cameron et al., 2001, Kaplan et al., 1985, Lledo et al., 2006), wobei nur wenige dieser Zellen schließlich zu reifen und funktionellen Neuronen differenzieren (Biebl et al., 2000). Der Prozess der postnatalen Neurogenese erfordert eine genau determinierte und fein abgestimmte Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der NPCs auf der einen Seite und der Eliminierung überzähliger oder fehlerhafter Nervenzellen über apoptotische Eliminationsprozesse auf der anderen Seite (Kaplan et al., 1985). Dies ist essentiell für die Aufrechterhaltung einer korrekten Größe des Gehirns und um die strukturelle und funktionelle Integrität der Gehirnstrukturen gewährleisten zu können.

Quantitative Analysen der Immunfärbungen zeigen eine signifikant erhöhte Proliferation der NPCs bei CRAF Nullmutation, die nicht zu einer vergrößerten Körnerzellschicht (NeuN) führt. Nach Cheneva et al. (2005), Kempermann et al. (2004) und Ming und Song (2005) sollte eine terminale Differenzierung BrdU-markierter Zellen bereits nach einem Differenzierungszeitraum von sechs Tagen erfolgt sein. BrdU-markierte NPCs unserer CRAF-defizienten

adulten Tiere zeigen eine signifikant geringere und verlangsamte neuronale Differenzierung (NeuN⁺) im Vergleich zu Kontrollversuchstieren. Während 36% der BrdU-markierten NPCs bei Kontrollversuchstieren nach einer chase-Phase von sechs Tagen neuronale Differenzierungsmerkmale (NeuN) aufweisen, zeigen bei CRAF-defizienten NPCs und doppelt so langem Differenzierungszeitraum (12 Tage chase-Phase) nur 27% der Zellen eine neuronale Differenzierung (NeuN). Durch die CRAF-Nullmutation könnte ein differenzierungsstörender Einfluss auf die proliferierenden NPCs im Bezug auf die Neusynthese von Nervenzellen im DG hervorgerufen werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Biebel et al. (2000) bei *Bcl11b*-mutanten Mäusen gemacht. Adulte *Bcl11b*-Mutante (P30) haben signifikant weniger reife Körnerzellen ($\Delta > 30\%$) in einem deutlich verkleinerten DG im Vergleich zu Kontrollversuchstieren (Biebel et al., 2000). NeuroD mutante Mäuse zeigen eine Differenzierungsblockade der pränatal gebildeten unreifen Nervenzellen nachdem diese in den DG eingewandert sind (Miyata et al., 1999, Liu et al., 2000). Da auch Liu et al. (2000) ein epileptisches Verhalten beobachten können, ist es möglich, dass ein Zusammenhang zwischen der veränderten neuronalen Differenzierung der BrdU-markierten NPCs und dem Epilepsie-ähnlichen Verhalten unserer CRAF Nullmutanten besteht.

Beeinflusst CRAF den Zellzyklus und damit das Schicksal der proliferierenden NPCs?

Unterschiede in der Zellzykluslänge und der Anzahl proliferierender NPCs wurden bereits zu unterschiedlichen Analysenzeitpunkten festgestellt. Durch eine Zellzyklusveränderung könnten die proliferierenden NPCs in ihrer weiteren Entwicklung gehemmt und dadurch in ihrer neuronale Differenzierung gehindert werden. Die BrdU-Markierung mit einer chase-Phase von zwei Stunden sollt nach Palmer et al. (2000) ausschließlich S-Phase-Zellen oder sehr frühe G2-M-Phase-Zellen des Zellzyklus anfärben. Die quantitative Analyse unserer CRAF-defizienten Tiere zeigt signifikant mehr BrdU-markierte Zellen im DG und Hilus im Vergleich zu Kontrollversuchstieren, die nach einer chase-Phase von zwei Stunden keine Kolokalisation mit dem Zellzyklusmarker Ki67 aufzeigen. Diese BrdU-markierten NPCs müssen demnach bereits in der G0-Phase sein. Die Kurzzeit-Analyse mit einer chase-Phase von 24 Stunden bestätigt die beobachteten Zellzyklusunterschiede der 2h BrdU chase-Phase Analyse. Die signifikant erhöhte Anzahl BrdU-markierter Ki67-negativer G0-Phase Zellen kann zum einen durch einen Zellzyklus-Abbruch kommen, oder aber durch einen verkürzten Zellzyklus hervorgerufen werden, durch den eine weitere Differenzierung möglicherweise fehlerhaften NPCs verhindert werden würde. Dafür sprechen würden der nicht signifikante Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen im DG zwischen adulten Nullmutanten und Kontrollversuchstieren. CRAF-defiziente NPCs könnten nach ihrem schnelleren Zellzyklus-durchlauf auch in einer Art „D-Zellstadium“ steckenbleiben, das Seri et al. (2001) für undifferenzierte Zellen beschreibt. Diese Zellschicksals-Theorie würde auch durch die

auffälligen „Zellcluster“ dunkel gefärbter Nissl-Zellen im DG von CRAF-defizienten Tieren bestärkt werden. Die Zellen müssten sich dann in einem neuronal-determinierten Zwischenstadium zu reifen Körnerzellen befinden und würden somit den Differenzierungskriterien nach Seri et al. (2001) von „D-Zellen“ entsprechen.

Im Hilus der CRAF-defizienten Tiere wird die signifikant erhöhte Anzahl BrdU-markierter G0-Phase Zellen der zwei Stunden BrdU chase-Phasen Analyse wahrscheinlich dem quantitativ ermittelten signifikant erhöhten apoptotischen Zelltod zugrunde liegen.

Parallelen zu anderen Knockoutstudien bzgl. der histologischen Befunde

Die quantitative histologische Analyse der BrdU-markierten proliferierenden NPCs zeigt bei unseren CRAF-defizienten Tieren Zellzyklusabnormalitäten und Proliferationsveränderungen, die zu einer verlangsamten neuronalen Differenzierung und Reifung der Körnerzellen im postnatalen DG führen. Zusätzlich werden bei unseren jungen adulten CRAF-defizienten Tieren zahlreiche proliferierende NPCs im DG und Hilus gefunden, während Wojnowski et al. (1998) eine verminderte Proliferationsaktivität bei CRAF-defizienten Mäusen aufzeigt. Es werden keine Veränderungen bei der Signaltransduktion in der mitogenen Kaskade beobachtet, obwohl pERK als Hauptmediator der transkriptionellen Antwort von Raf-1 gilt (Schulze et al., 2004). Auch Ehrenreiter et al. (2005) und Mikula et al. (2001) können keine Unterschiede im pERK-Signal bei CRAF-defizienten Fibroblasten analysieren. Neben den Veränderungen im Hippocampus werden auch Verhaltensauffälligkeiten in der Bewegungskoordination bei CRAF-defizienten Tieren beobachtet, die möglicherweise mit den morphologischen Veränderungen im Kleinhirn zusammenhängen. Einige CRAF-defiziente Tiere (n=2) zeigen ein Epilepsie-ähnliches Verhalten. Epileptisches Verhalten kann auch Nateri et al. (2007) bei caMEK1^{ΔN}-transgenen Tieren beobachten. Bei diesen Mäusen wird zudem eine erhöhte GFAP-Expression gefunden (Heinemann et al., 1999). Eine vermehrte GFAP-Expression kann auch bei unseren CRAF-defizienten Tieren in der BrdU-Langzeitstudie gezeigt werden. Die Morphologie der BrdU-markierten Astrozyten deutet nach den Kriterien von Seri et al. (2004) auf einen größeren Pool an radialen Gliazellen hin, die nach Maekawa et al. (2005) einen Teil der „transient amplifizierenden Zellen“ ausmachen. Im proliferationsreduzierten Kortex von **EGFR**-Mutanten werden weniger GFAP⁺ Astrozyten gefunden (Sibilia et al., 1998).

Die tägliche Überproduktion fehllokalisierter NPCs im Hilus unserer CRAF-defizienten Tiere wird über apoptotische Eliminierungsprozesse (Caspase-3) reduziert und so ein übermäßiges Wachsen des Gehirns verhindert. Eine apoptotische Eliminierung „fehlerhafter“ Nervenzellen wird auch bei **EGFR**-transgenen Tieren mit fortschreitender Neurodegeneration im Kortex, Bulbus olfactorius und Thalamus beobachtet (Sibilia et al., 1998).

In der Literatur werden „enriched environment“ (ERV) Studien vielfach als Neurogenesefördernd (Kempermann et al., 1997, 1998, Nilsson et al., 1999, van Praag et al., 1999, Bruel-

Jungermann et al., 2005, Kronenberg et al., 2005) und Proliferations- (van Praag et al., 1999, Ra et al., 2002, Kronenberg et al., 2003, 2005, Wu et al., 2008) und Zellüberlebens-steigernd (Nilsson et al., 1999, Wu et al., 2008) beschrieben. Unsere ERV-Studien zeigen nur einen Neurogenese-fördernden Effekt bei postnatalen Kontrollversuchstieren, während bei CRAF-defizienten Tiere eine signifikante Abnahme der neuronalen Differenzierung im Vergleich zu Nullmutanten beobachtet wurde, die unter Standardlabortierhaltungsbedingungen gehalten wurden.

4.5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei CRAF-defizienten Tieren nicht nur die Anzahl proliferierender NPCs erhöht ist, sondern womöglich aufgrund einer fehlerhaften Reifung des DG, die Bildung einer neuen neurogenen Nische, der sogenannten *tertiären Matrix*, nicht richtig erfolgen kann. Auch bei jungen adulten CRAF-defizienten Tieren werden deshalb mehr proliferierende NPCs im Hilus gefunden. Die terminale Differenzierung in Richtung Körnerzellen erfolgt bei CRAF-defizienten Tieren nur vermindert, eine vermehrte apoptotische Zelleliminierung über aktivierte Caspase-3 Signalwege kann im DG nicht beobachtet werden. Zellzyklusanalysen zeigen nicht nur eine vermehrte Proliferation, sondern auch ein schnelleres Durchlaufen des Zellzyklus im DG CRAF-defizienter Tiere, so dass sich nach einer chase-Phase von zwei Stunden nach BrdU-Applikation signifikant mehr markierte Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus befinden. Eine Fehldifferenzierung der proliferierenden NPCs in Richtung Astrozyten anstelle einer neuronalen Differenzierung kann nicht festgestellt werden. Durch das Erscheinen der auffälliger „Zellkluster“ dunkel gefärbter Zellen in der Nissl und H&E Immunfärbung vermuten wir ein Steckenbleiben der NPCs in einem frühen „*D-Zellstadium*“. Für die Differenzierungsstörung in Richtung Körnerzelle könnte der veränderte Zellzyklus verantwortlich sein. Ein fehlreguliertes *Notch*-Signal könnte beispielsweise dazu führen, dass das Effektorgen *Hes1* dauerhaft hochreguliert wird und deshalb proliferationsfördernd auf die NPCs wirkt. Hierdurch könnte eine verkürzte G1-Phase (Shimojo et al., 2008) resultieren, durch die BrdU-markierte NPCs von CRAF-defizienten Tieren bereits nach einer chase-Phase von zwei Stunden keine Kolo-kalisation mit Ki67 aufweisen. Ein erhöhtes *Hes1*-Signal könnte zudem Auslöser für die Differenzierungsstörung in Richtung Körnerzellen darstellen. *Hes1* wird auch von aktiv proliferierenden Zellen exprimiert und kolokalisiert deshalb mit dem Mitosemarker Ki67. Da bei CRAF-defizienten Tieren auch mehr aktiv-proliferierende NPCs detektiert werden konnten, wäre die Analyse eines veränderten *Notch-Hes*-Signals ein weiterer wichtiger experimenteller Ansatz, um die Differenzierungsdefekte der NPCs und deren Ursache genauer zu charakterisieren. Auch ein verändertes *p27*-Signal könnte der Grund für die erhöhte Proliferationsrate und den schnelleren Eintritt der proliferierenden NPCs in die G0-Phase des Zellzyklus sein. Es bleibt letztlich zu klären, über welche molekularen und

zellulären Mechanismen CRAF die Proliferation und Differenzierung der proliferierenden NPCs beeinflusst. Durch den Einsatz der *Microarray* Technologie wäre es möglich, spezifische Expressionsanalysen zur Identifizierung differentiell exprimierender Gene in den BrdU-markierten Zellen durchzuführen. Hierzu müssten die BrdU-markierten Zellen aus dem Gehirngewebe isoliert und fraktioniert werden. Eine weitere Möglichkeit bietet die *FACS*-Analyse. Auch hier könnten proliferierende NPCs sortiert und anschließend genauer betrachtet werden. Über eine *retrovirale* Markierung könnten proliferierende NPCs nicht nur bei ihrer Differenzierung und Reifung beobachtet, sondern auch funktional mittels „*patch-clamp*“ Verfahren an Hirnschnittkulturen überprüft werden. Durch die Ursachenforschung der Differenzierungsstörung könnten Parallelen zu neurodegenerativen Erkrankungen gezogen werden, durch die die Entstehung und die Folgen mechanistisch aufgeschlossen und eventuell medikamentös eingedämmt werden könnten. Auch der Auslöser für das partial aufgetretene Epilepsie-ähnliche Erscheinungsbild bei CRAF Nullmutanten könnte besser verstanden werden.

Literaturverzeichnis:*Journale*

- Ahn, S., Joyner, A. L., In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to sonic hedgehog. *Nature*. 437: 894-897. 2005.
- Alcantara, S., Ruiz, M., D'Arcangelo, G., Ezan, F., de Lecea, L., Curran, T., Sotelo, C., Soriano, E. Regional and cellular patterns of reelin mRNA expression in the forebrain of the developing and adult mouse. *J. Neurosci*. 18, 7779-99. 1998.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Marti, E., Visa, J., Guimera, J., Oset, M., Gonzalez, J. R., Florez, J., Fillat, C., Estivill, X. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet*. 10, 1915-1923. 2001.
- Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol*. 137, 433-457. 1969.
- Altman, J. Bayer, S. A. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J. Comp. Neurol*. 301, 325-342. 1990a.
- Altman, J. Bayer, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J. Comp. Neurol*. 301, 365-381. 1990b.
- Altman, J., Das, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol*. 124, 319-335. 1965.
- Altman, J., Das, G. D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*. 207, 953-956. 1965.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M., Mateo, A. S., Merchant-Larios, H. Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J. Neurosci*. 18, 1020-1037. 1998.
- Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A., For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 41, 683-686. 2004.
- Alvarez-Buylla, A., Seri, B., Doetsch, F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res. Bull*. 57, 751-758. 2002.
- Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J. M., Tramontin, A. D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci*. 2, 287-293. 2001.
- Amaral, D. G., Witter, M. P. The tree-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neurosci*. 31, 571-591. 1989.
- Anagnostaras, S. A., Gale, G. D., Fanselow, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*. 1, 8-17. 2001.
- Andersen, T., Bliss, T. V. P., Skrede, K. K. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp. Brain Res*. 13, 208-21. 1971.
- Anthony, T. E., Mason, H. A., Gridley, T. Fishell, G., Heintz, N. Brain lipid-binding protein is a direct target of notch signalling in radial glial cells. *Genes & Dev*. 19, 1028-1033. 2005.
- Artigiani, B., Lindemann, D., Calegari, F. Overexpression of cdk4 and cyclinD1 triggers greater expansion of neural stem cells in the adult mouse brain. *J. Exp. Med*. 9, 937-948. 2011.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. Neuronal replacement from endogenous

- precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 8, 963-970. 2002.
- Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trazaskos, J. M., Sweatt, J. D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat. Neurosci.* 1, 602-609. 1998.
- Aubert, I., Poirier, J., Gauthier, S. Quirion, R. Multiple cholinergic markers are unexpectedly not altered in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesions. *J. Neurosci.* 14, 2476-2484. 1994.
- Baccarini, M. Second nature: biological functions of the Raf-1 'kinase'. *FEBS Letters.* 579, 3271-3277. 2005.
- Bagri, A., Gurney, T., He, X., Zou, Y. R., Littman, D. R., Tessier-Lavigne, M., Pleasure, S. J. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development.* 129, 4249-4260. 2002.
- Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. Neuropilins as Semaphorin receptors: in vivo functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 13-31. 2002.
- Baldwin, P., Laskey, R., Coleman, N. Translational approaches to improving cervical screening. *Nature Reviews Cancer* 3, 217-226. 2003.
- Bannermann, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, S. B., Deacon, R. M., Yee, B. K., Bast, T., Thang, W. N., Pothuisen, H. H., Feldon, J. Regional dissociation within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273-283. 2004.
- Barnea, A., Nottebohm, F. Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91, 11217-21. 1994.
- Barnier, J.V., Papin, C., Eychène, A., Lecoq, O., Calothy, G. The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 270, 23381-23389. 1995.
- Battista, D., Ferrari, C. C., Gage, F. H., Pitossi, F. J. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 23, 83-93. 2006.
- Bayer, S. A. Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 190, 87-114. 1980a
- Bayer, S. A. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J. Comp. Neurol.* 190, 115-134. 1980b.
- Bayer, S.A. Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp. Brain Res.* 46, 315-323. 1982a.
- Bayer, S.A., Yackel, J. W., Puri, P. S. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science.* 216, 890-892. 1982b.
- Berezovska, O., McLean, P., Knowles, R., Frosh, M., Lu, F. M., Lux, S. E., Hyman, B. T. Notch 1 inhibits neurite outgrowth in postmitotic primary neurons. *Neuroscience.* 93, 433-439. 1999.
- Biebl, M., Cooper, C. M., Winkler, J., Kuhn, G. H. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult brain. *Neurosci. Lett.* 291, 17-20. 2000.
- Bischofberger, J. Young and excitable: new neurons in memory networks. *Nature.* 10, 273-275. 2007.
- Blackstad T. W. Commissural connections of the hippocampal region of the rat, with special reference to their mode of termination. *J. Comp. Neurol.* 105, 417-537. 1956.
- Blackstad T. W. On the termination of some afferents to the hippocampus and fascia dentata: an experimental study in the rat. *Acta Anat. (Basel)* 35, 202-214. 1958.

- Blackstad, T. W., Brink, K., Hem, J., June, B. Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat. An experimental study with silver impregnation methods. *J. Comp. Neurol.* 138, 433-49. 1970.
- Blaschke, A. J., Staley, K., Chun, J. Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development.* 122, 1165-1174. 1996.
- Bliss, T. V., Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232, 331-56. 1973.
- Blum, S., Moore, A. N., Adams, F., Dash, P. K. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J. Neurosci.* 19, 3535-3544. 1999.
- Bolteus, A. J., Bordey, A. GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.*, 24, 7623-7631. 2004.
- Brand, A. H., Perrimon, N. Raf acts downstream of the EGF receptor to determine dorsoventral polarity during *Drosophila* oogenesis. *Genes. Dev.* 8, 629-639. 1994.
- Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., von der Behrens, W., Kempermann, G. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell. Neurosci.* 24, 603-613. 2003.
- Breunig, J. J., Arellano, J. I., Macklis, J. D., Rakic, P. Everything that glitters isn't gold: a critical review of postnatal neural precursor analyses. *Cell Stem Cell.* 1, 612-627. 2007.
- Brockes, J. P., Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science.* 276, 81-87. 1997.
- Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H. G. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467, 1-10. 2003.
- Bruder, J. T., Heidecker, G., Rapp, U. R. Serum-, TPA-, and Ras-induced expression from Ap-1/Ets-driven promoters requires Raf-1 kinase. *Genes. Dev.* 6, 545-556. 1992.
- Bruel-Jungermann, E., Laroche, S., Rampon, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 513-521. 2005.
- Bukholm, I. K., Nesland, J. M. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch.* 436, 224-228. 2000.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science.* 282, 1497-1501. 1998.
- Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., Prochiantz, A. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development.* 131, 2173-2181. 2004.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W. B. Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25, 6533-6538. 2005.
- Calegari, F., Huttner, W. B. An inhibition of cyclin-dependent kinase that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell Sci.* 116, 4947-4955. 2003.
- Camarero, G., Tyrsin, O. Y., Xiang, C., Pfeiffer, V., Pleiser, S., Wiese, S., Götz, R., Rapp, U. R. Cortical

- migration defects in mice expressing A-RAF from the B-RAF locus. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7103-7115. 2006.
- Cameron, H. A., McEwen, B. S., Gould, E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 15, 4687-4692. 1995.
- Cameron, H. A., McKay, R. D. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2, 894-7. 1999.
- Cameron, H. A., McKay, R. D. G. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 435, 406-417. 2001.
- Cameron, H. A., Wooley, C. S., McEwen, B. S., Gould, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience.* 56, 337-344. 1993.
- Cande, C., Ceconi, F., Dessen, P., Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J. Cell. Sci.* 115, 4727-4734. 2002.
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D. S., Liu, Y., Fong, D. M., Young, D., During, M. J., VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat. Genet.* 36, 827-835. 2004.
- Carleton, A., Petreanu, L. T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A., Lledo, P. M. Becoming a new neuron in the olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 6, 507-518. 2003.
- Catapano, L. A., Magavi, S. S., Macklis, J. D. Neuroanatomical tracing of neuronal projections with Fluoro-Gold. *Meth. Mo. Biol.* 198, 299-304. 2002.
- Caviness, V. S. Jr. Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.* 151, 113-120. 1973.
- Ceranik, K., Zhao, S., Frotscher, M. Development of the entorhino-hippocampal projection: guidance by Cajal-Retzius cell axons. *New York Acad. Sci.* 911, 43-54. 2000.
- Chechneva, O., Dinkel, K., Schrader, D., Reymann, K. G. Identification and characterisation of two neurogenic zones in interface organotypic hippocampal slice cultures. *Neurosci.* 136, 343-355. 2005.
- Chen, A., Ohno, M., Giese, K. P., Kühn, R., Chen, R. L., Silva, A. J. Forebrain-specific knockout of B-raf kinase leads to deficits in hippocampal long-term potentiation, learning, and memory. *J. Neurosci. Res.* 83, 28-38. 2006.
- Chen, J., Magavi, S. S., Macklis, J. D. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extend spinal projections in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 16357-16362. 2004.
- Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M. H. MAP kinases. *Chem. Rev.* 101, 1449-2476. 2001.
- Chicurel, M. E., Harris, K. M. Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 325, 169-82. 1992.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., Kintner, C. Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature.* 375, 761-766. 1995.
- Chojnacki, A., Shimazaki, T., Gregg, C., Weinmaster, G., Weiss, S. Glycoprotein 130 signalling regulates Notch1 expression and activation in the self-renewal of mammalian forebrain neural stem cells. *J. Neurosci.* 23, 1730-1741. 2003.

- Chong, H., Vikis, H. G., Guan, K.-L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cellular Signalling*. 15, 463-469. 2003.
- Christie, B. R., Cameron, H. A. Neurogenesis in the adult hippocampus. *HIPPOCAMPUS*. 16, 199-207. 2006.
- Claiborne, B. J., Amaral, D. G., Cowan, W. M. A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246, 435-458. 1986.
- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., Laemmli, U. K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252, 1102-1106. 1977.
- Cohen, D., Segal, M., Reiner, O. Doublecortin supports the development of dendritic arbors in primary hippocampal neurons. *Dev. Neurosci.* 30, 187-199. 2006.
- Coller, H. A. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat. Rev. MCB.* 8, 667-670. 2007.
- Cooper-Kuhn, C. M., Kuhn, H. G. Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 134, 13-21. 2002.
- Craig, C. G., Tropepe, V., Morshead, C. M., Reynolds, B. A., Weiss, S., van der Kooy, D. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J. Neurosci.* 16, 2649-2658. 1996.
- Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Ceconi, F., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G., Slack, R. S. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell. Biol.* 158, 507-517. 2002.
- Dajee, M., Tarutani, M., Deng, H., Cai, T., Khavari, P. A. Epidermal Ras blockade demonstrates spatially localized Ras promotion of proliferation and inhibition of differentiation. *Oncogene.* 21, 1527-1538. 2002.
- D'Amico, L. A., Boujard, D., Coumilleau, P.
- D'Amour, K. A., Gage, F. h. Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11866-11872. 2003.
- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H. W., Troppmair, J., Rapp, U. R., The ins and outs of Raf kinases. *Trends. Biochem. Sci.* 19, 474-480. 1994.
- Davis, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 417, 949-954. 2002.
- Deisseroth, K., Sinla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T. D., Malenka, R. C. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron.* 42, 535-552. 2004.
- Del Rio, J. A., Heimrich, B., Borrell, V., Forster, E., Drakew, A., Alcantara, S., Nakajima, K., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., Derer, P., Frotscher, M., Soriano, E. A role for Cajal-Retzius cells and reelin in the development of hippocampal connections. *Nature*, 385, 70-74. 1997.
- des Portes, V., Pinard, J. M., Billuart, P., Vinet, M. C., Koulakoff, A., Carrie, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y., Catala, M., Kahn, A., Beldjord, C., Chelly, J. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell.* 92, 51-61. 1998.

- Dhillon, A. S., Pollock, C., Steen, H., Shaw, P. E., Mischak, H., Kolch, W. Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3237-3246. 2002b.
- Dibb, N. J., Dilworth, S. M., Mol, C. D. Switching on kinase: oncogenic activation of BRAF and the PDGFR family. *Nature.* 4, 718-727. 2004.
- Doetsch, F., Alvarez-Buylla, A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 14895-14900. 1996.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 97, 703-716. 1999.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and threedimensional organisation of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17, 5046-5061. 1997.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. EGF converts transient-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron.* 36, 1021-1034. 2002.
- Dorsky, R. I., Chang, W. S., Rapaport, D. H., Harris, W. A. Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling. *Nature.* 385, 67-70. 1997.
- Duan, X., Chang, J. H., Ge, S., Faulkner, R. L., Kim, J. Y., Kitabatake, Y., Liu, X. B., Yang, C. H., Jordan, J. D., Ma, D. K., Liu, C. Y., Ganesan, S., Cheng, H.-J., Ming, G.-L., Lu, B., Song, H. Disrupted-in-schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell.* 130, 1146-1158. 2007.
- Duan, X., Kang, E., Liu, C. Y., Ming, G.-L., Song, H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Current Option Neurobiol.* 18, 108-115. 2008.
- Dumaz, N., Marais, R. Raf phosphorylation: one step forward and two steps back. *Mol. Cell.* 17, 164-166. 2005.
- Earshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 383-424. 1999.
- Ehninger, D., Kempermann, G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 331, 243-250. 2008.
- Ehrenreiter, K., Piazzolla, D., Velamoor, V., Sobczak, I., Small, J. V., Takeda, J., Leung, T., Baccarini, M. Raf-1 regulates Rho signalling and cell migration. *JCB.* 168, 955-964. 2005.
- Emsley, J. G., Mitchell, B. D., Kempermann, G., Macklis J. D. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Progress in Neurobiology.* 75, 321-341. 2005.
- Enswere, E., Shingo, T., Gregg, C., Fujikawa, H., Ohta, S., Weiss, S. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signalling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J. Neurosci.* 24, 8354-8365. 2004.
- Erhardt, P., Troppmair, J., Rapp, U. R., Cooper, G. M. Differential regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5524-5530. 1995.
- Estivill-Torres, G., Pearson, H., van Heyningen, V., Price, D. J., Rashbass, P. Pax6 is required to

- regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development*. 129, 455-466. 2002.
- Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A. L. M., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., Lancini, C., Tosetti, V., Ottolenghi, S., Taylor, V., Nicoli, S. K. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nature Neurosci.* 12, 1248-1256. 2009.
- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braida, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., DeBiasi, S., Nicolis, S. K. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*. 131, 3805–381. 2004.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. Subpopulations of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Neurosci.* 23, 373-382. 2003.
- Findlater, G. S., McDougall, R. D., Kaufman, M. H. Eyelid development, fusion and subsequent reopening in the mouse. *J. Anat.* 183, 121-129. 1993.
- Frankland, P. W., Miller, F. D. Regenerating your senses: multiple roles for neurogenesis in the adult brain. *Nat. Neurosci.* 11, 1124-1126. 2008.
- Franklin, J. L., Berechid, B. E., Cutting, F. B., Presente, A., Chambers, C. B., Foltz, D. R., Ferreira, A., Nye, J. S. Autonomous and non-autonomous regulation of mammalian neurite development by Notch 1 and Delta 1. *Curr. Biol.* 9, 1448-1457. 1999.
- Frotscher M. Neuronal elements in the hippocampus and their synaptic connections. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 111, 2-9. 1988.
- Frotscher, M., Haas, C. A., Förster, E. Reelin controls granule cell migration in the dentate gyrus by acting on the radial glial scaffold. *Cereb. Cortex.* 13, 634-640. 2003.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci.* 23, 9357-9366. 2003.
- Furukawa, T., Mukherjee, S., Bao, Z. Z., Morrow, E. M., Cepko, C. L. rax, Hes 1 and notch 1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron.* 26, 383-394. 2000.
- Gage, F. H., Kempermann, G., Palmer, T. D., Peterson, D. A., Ray, J. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J. Neurobiol.* 36, 249-266. 1998.
- Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science.* 287, 1433-1438. 2000.
- Gage, F. H., Ray, J., Fisher, L. J. Isolation, characterisation, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 159-192. 1995b.
- Gaiano, N., Nye, J. S., Fishell, G. Radial glial identity is promoted by Notch 1 signalling in the murine forebrain. *Neuron.* 26, 395-404. 2000.
- Galabova-Kovacs, G., Catalanotti, F., Matzen, D., Reyes, G. X., Zezula, J., Herbst, R., Silva, A., Walter, I., Baccarini, M. Essential role of B-Raf in oligodendrocyte maturation and myelination during postnatal central nervous system development. *J.C.B.* 180, 947-955. 2008.
- Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G. Sofroniew, M. V. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7,

- 1233-1241. 2004.
- Garnett, M. J., Marais, R. Guilty as charged: B-Raf is a human oncogene. *Cancer Cell*. 6, 313–319. 2006.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 119, 493-501. 1992.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., and Song, H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–593. 2006.
- Ge, S., Pradhan, D. A., Ming, G., Song, H. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends in Neurosci.* 30, 1-8. 2007.
- Ge, S., Yang, C. H., Hsu, K. S., Ming, G.-L., Song, H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*. 54, 559-566. 2007.
- Geddes, J. W., Chang-Chui, H., Cooper, S. M., Lott, I. T., Cotman, C. W. Density and distribution of NMDA receptors in the human hippocampus in Alzheimers's. *Brain Res.* 399, 156-161. 1986.
- Geddes, J. W., Monaghan, D. T., Cotman, C. W., Lott, I. T., Kim, R. C., Chui, H. C. Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science*. 230, 1179-1181, 1985.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cadrin-Girard, J.-F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., Charron, J. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr. Biol.* 9, 369-372. 1999.
- Gleeson, J. G., Allen, K. M., Fox, J. W., Lamperti, E. D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E. C., Dobyns, W. B., Minnerath, S. R., Ross, M. E., Walsh, C. A. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signalling protein. *Cell*. 92, 63-72. 1998.
- Goldman, S. A., Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J. Neurobiol.* 36, 267-286. 1998.
- Goldman, S. A., Nottebohm, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2390-2394. 1983.
- Götz, M., Hartfuss, E., Malatesta, P. Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res. Bull.* 57, 777-788. 2002.
- Götz, M., Stoykova, A., Gruss, P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron*. 21, 1031-1044. 1998.
- Gould, E., Beylin, A. V., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T. J. Learning enhances adult neurogenesis in the adult hippocampal formation. *Nature Neuroscience* 2, 260-265. 1999a.
- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., McEwen, B. S. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* 12, 3642-3650. 1992.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., Fuchs, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17, 2492-2498. 1997.
- Gould, E., Tanapat, P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 46, 1472-1479. 1999.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., Fuchs, E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,

- 3168-3171. 1998.
- Guillemont, F. Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development*. 134, 3771-3780. 2007.
- Hagemann, C., Rapp, U. R. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell. Res.* 253, 34-46. 1999.
- Hagg, T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *TRENDS in Neurosci.* 28, 589-595. 2005.
- Hastings, N. B., Gould, E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J. Comp. Neurol.* 413, 146-154. 1999.
- Heidecker, G., Huleihel, M., Cleveland, J. L., Kolch, W., Beck, T. W., Lloyd, P., Pawson, T., Rapp, U. R. Mutational activation of c-raf-1 and definition of the minimal transforming sequence. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2503-2512. 1990.
- Heinemann, U., Gabriel, S., Schuchmann, S., Eder, C. Contribution of astrocytes to seizure activity. *Adv. Neurol.* 79, 583-590. 1999.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407, 770-776. 2000.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D., Lewis, J. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr. Biol.* 7, 661-670. 1997.
- Hindley, A., Kolch, W. Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases. *J. Cell Sci.* 115, 1575-1581. 2002.
- His, W. Die Entwicklung des menschlichen Gehirns. *Hirzel*, Leipzig. 1904.
- Hitchcock, P. F., Lindsey Myhr, K. J., Easter, S. S., Mangione-Smith, R., Jones, D. D. Local regeneration in the retina of the goldfish. *J. Neurobiol.* 23, 187-203. 1992.
- Hitoshi, S., Seaberg, R. M., Kosciak, C., Alexson, T., Kisunoki, S., Kanazawa, I., van der Kooy, S. and D. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signalling. *Genes Dev.* 18, 1806-1811. 2004.
- Höglinger, G. U., Breunig, J. J., Depboylu, C., Rouaux, C., Michel, P. P., Alvarez-Fischer, D., Boutillier, A.-L., DeGregori, J., Oertel, W. H., Rakic, P., Hirsch, E. C., Hunot, S. The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3585-3590. 2007.
- Höglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckarrts, C., Oertel, W. H., Caille, I., Hirsch, E. C. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* 7, 726-735. 2004.
- Hong, S. E., Shugart, Y. Y., Huang, D. T., Shahwan, S. A., Grant, P. E., Hourihane, J. O., Martin, N. D., Walsh, C. A. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat. Genet.* 26, 93-96. 2000.
- Houser, C. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 535, 195-204. 1990.
- Howe, L. R., Leever, S. J., Goméz, N., Nakielny, S., Cohen, P., Marshall, C. J., Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase Raf. *Cell.* 71, 335-342. 1992.
- Hu, Z., Yuri, K., Ozawa, H., Lu, H., Kawata, M. The in vivo time course for elimination of adrenalectomy-induced apoptotic profiles from the granule cell layer of the rat hippocampus. *J.*

- Neurosci.* 17, 3981-3989. 1997.
- Hüser, M., Luckett, J., Chiloeches, A., Mercer, K., Iwobi, M., Giblett, S., Sun, X.-M., Brown, J., Marais, R., Pritchard, C. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *The EMBO Journal*. 20, 1940-1951. 2001.
- Huleihel, M., Goldsborough, M., Cleveland, J., Gunnel, M., Bonner, T., Rapp, U. R. Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2655-2662. 1986.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Kageyama, R. Continuous neurogenesis in the adult brain. *Develp. Growth Differ.* 51, 379-386. 2009.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., Kageyama, R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* 11, 1153-1161. 2008.
- Ishikawa, F., Sakai, R., Ochiai, M., Takaku, F., Sugimura, T., Nagao, M. Identification of a transforming activity suppressing sequence in the c-raf oncogene. *Oncogene.* 3, 653-658. 1988.
- Jackson, E. L., Garcia-Verdugo, J. M., Gil-Perotin, S., Roy, M., Quinones-Hinojosa, A., VandenBerg, S., Alvarez-Buylla, A. PDGFR α -positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signalling. *Neuron.* 51, 187-199. 2006.
- Jang, M.-H., Song, H., Ming, G.-L. Regulation of adult neurogenesis by neurotransmitters. In *Adult Neurogenesis from Gage, F. H., Kempermann, G., Song, H., eds. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 397-423. 2007.*
- Jansen, H. W., Ruckert, B., Lurz, R., Bister, K. Two unrelated cell-derived sequences in the genome of avian leukemia and carcinoma inducing retrovirus MH2. *EMBO J.* 2, 1969-1975. 1983.
- Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson, G. D. Jr., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R., Gage, F. H. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn. Mem.* 16, 147-154. 2009.
- Jessberger, S., Gage, F. H. Fate plasticity of adult progenitors: biological relevance and therapeutic use. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 61-65. 2009.
- Jessberger, S., Parent, J. M. Epilepsy and adult neurogenesis. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 535-547. 2007.*
- Jessberger, S., Toni, N., Clemenson Jr., G. D., Ray, J., Gage, F. H. Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat. Neurosci.* 11, 888-893. 2008.
- Jessberger, S., Zhao, C., Toni, N., Clemenson, G. D., Jr., Li, Y., Gage, F. H. Seizure-associated, aberrant neurogenesis in adult rats characterized with retrovirus-mediated cell labeling. *J. Neurosci.* 27, 9400-9407. 2007.
- Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Bateur, S., Simon, R. P., Greenberg, D. A. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4710-4715. 2001.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Xie, L., Bateur, S., Mao, X. O. Smelick, C., Logvinova, A., Greenberg, A., Greenberg, D. A. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell.* 2, 175-183. 2003.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., Greenberg, D. A. Vascular endothelial growth factor

- (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 11946-11950. 2002.
- Johns, P. R., Easter, S. S. Growth of the adult goldfish eye. II. Increase in the retinal cell number. *J. Comp. Neurol.* 176, 331-341. 1977.
- Johns, P. R., Easter, S. S. Jr. Growth of the goldfish eye. III Source of the new retinal cells. *J. Comp. Neurol.* 176, 343-358. 1977.
- Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prüllage, M., Pfeiffer, J., Lindecke, A., Staiger, V., Israël, A., Kaltschmidt, C., Mémet, S. NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signalling. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2936-2946. 2006.
- Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J. Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J. L. R., Sawamoto, K. New Neurons Clear the Path of Astrocytic Processes for Their Rapid Migration in the Adult Brain. *Neuron*, 67, 213-223. 2010.
- Kaplan, M. S., Bell, D. H. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J. Neurosci.* 4, 1429-1441. 1984.
- Kaplan, M. S., Hinds, J. W. Neurogenesis in the adult rat: Electron-microscopic analysis of light radioautographics. *Science.* 197, 1092-1094. 1977.
- Kaplan, M. S., McNelly, N. A., Hinds, J. W. Population dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 239, 117-125. 1985.
- Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I., Inaguma, Y., Kato, K. Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J.* 16, 1328-1330. 2002.
- Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H., Frankland, P. W. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 10, 355-362. 2007.
- Kemperman, G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci.* 31, 163-169. 2008.
- Kempermann, G., Brandon, E. P., Gage, F.H. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr. Biol.* 8, 939-942. 1998a.
- Kempermann, G., Chesler, E. J., Lu, L., Williams, R. W., Gage, F. H. Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 780-785. 2006.
- Kempermann, G, Gage, F. H. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus.* 9, 321-332. 1999.
- Kempermann, G, Gage, F. H. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur. J. Neurosci.* 16, 129-136. 2002.
- Kempermann, G., Gast, D., Gage, F. H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann. Neurol.* 52, 135-143.

- 2002.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F. H. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 130, 391-399. 2003.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. Milestones of the neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*. 27, 447-452. 2004
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 186, 493-495. 1997.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci*. 18, 2106-3212. 1998b.
- Kerkhoff, E., Fedorov, L. M., Siefken, R., Walter, A. O., Papadopoulos, T., Rapp, U. R. Lung-targeted expression of the c-Raf-1 kinase in transgenic mice exposes a novel oncogenic character of the wild-type protein. *Cell Growth & Differentiation*. 11, 185-190. 2000.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 26, 239-257. 1972.
- Kirn, J. R., Alvarez-Buylla, A., Nottebohm, F. Production and survival of projection neurons in a forebrain vocal center of adult male canaries. *J. Neurosci*. 11, 1756-1762. 1991.
- Kesari, S., Stiles, C. D. The bad seed: PDGF receptors link adult neural progenitors to glioma stem cells. *Neuron*. 51, 151-153. 2006.
- Kitabatake, Y., Sailor, K. A., Ming, G., Song, H. S. Adult neurogenesis and hippocampal memory function: new cells, more plasticity, new memories? *Neurosurg. Clin. N. Am.* 18, 105-113. 2007.
- Kitamura, K., Yanazawa, M., Sugiyama, N., Miura, H., Iizuka-Kogo, A., Kusaka, M., Omichi, K., Suzuki, R., Kato-Fukui, Y., Kamiirisa, K., Matsuo, M., Kamijo, S., Kasahara, M., Yoshioka, H., Ogata, T., Fukuda, T., Kondo, I., Kato, M., Dobyns, W. B., Yokoyama, M., Morohashi, K. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat. Genet*. 32, 359-369. 2002.
- Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R. J., Lira, S. A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W. D., Barbacid, M. Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene trkC eliminates Ia muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature*. 368, 249-251. 1994.
- Klempin, F., Kempermann, G. Adult hippocampal neurogenesis and aging. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci*. 257, 271-280. 2007.
- Kolch, W., Heidecker, G., Ll oyd, P., Rapp, U. R. Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*. 349, 426-428. 1991.
- Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Bunk, E., Wolf, C., Ehninger, D., Kempermann, G. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol. Aging*. 27, 1505-1513. 2005.
- Kronenberg, G., Lippoldt, A., Kempermann, G., Two genetic rat models of arterial hypertension show different mechanisms by which adult hippocampal neurogenesis is increased. *Dev. Neurosci*. 29, 124-133. 2007
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., Kempermann, G. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to

- physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.* 467, 455-463. 2003.
- Kuan, C. Y., Schloemer, A. J., Lu, A., Burns, K. A., Weng, W. L., Williams, M. T., Strauss, K. I., Vorhees, C. V., Flavell, R. A., Davis, R. J., Sharp, F. R., Rakic, P. Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J. Neurosci.* 24, 10763- 10772. 2004.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., Gage, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033. 1996.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J., Gage, F. H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.* 17, 5820-5829. 1997.
- Kumamoto, N., Gu, Y., Wang, J., Janoschka, S., Takemaru, K.-I., Levine, J., Ge, S. A role for primary cilia glutamergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nature Neurosci.* 15, 399-405. 2012.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685. 1970.
- Lagace, D., C., Whitman, M. C., Noonan, M. A., Ables, J. L., DeCarolis, N. A., Arguello, A. A., Donovan, M. H., Fischer, S. J., Farnbauch, L. A., Beech, R. D., DiLeone, R. J., Greer, C. A., Mandyam, C. D., Eisch, A. J. Dynamic contribution of Nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J. Neurosci.* 27, 12623-12629. 2007.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H., Schaffer, D. V. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* 6, 21-27. 2003.
- Lanford, P. J., Lan, Y., Jing, R., Lindsell, C., Weinmaster, G., Gridley, T., Kelley, M. W. Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat. Genet.* 21, 289-292. 1999.
- Lange, C., Huttner, W. B., Calegari, F. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell.* 5, 320-331. 2009.
- Laplagne, D. A., Espósito, M. S., Piatti, V. C., Morgenstern, N. A., Zhao, C., van Praag, H., Gage, F. H., Schinder, A. F. Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol.* 4, 2349-2360. 2006.
- Laplagne, D. A., Kamienkowski JE, Espósito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2973-2981. 2007.

- Larsell, O. The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J. Comp Neurol.* 97, 281-356. 1952.
- Lein, E.S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature.* 445, 168-176. 2007.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., McKay, R. D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 60, 585-595. 1990.
- Leuner, B., Gould, E., Shors, T. J. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus.* 16, 216-224. 2006.
- Li, G., Pleasure, S. J. Morphogenesis of the dentate gyrus: What we are learning from mouse mutants: *Dev: Neurosci.* 27, 93-99. 2004.
- Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Desire, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R., Gage, F. H. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature.* 437, 1370-1375. 2005.
- Lie, D. C., Dziejczapolski, G., Willhoite, A. R., Kaspar, B. K., Shults, C. W., Gage, F. H. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J. Neurosci.* 22, 6639-6649. 2002.
- Lie, D. C., Song, H., Colamarino, S. A., Ming, G.-L., Gage, F. H. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 399-421. 2004.
- Lim, D. A., Alvarez-Buylla, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7526-7531. 1999.
- Liu, M., Pleasure, S. J., Collins, A. E., Noebels, J. L., Naya, F. J., Tsai, M.-J., Lowenstein, D. H. Loss of BETA2/NeuroD leads to malformation of the dentate gyrus and epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 865-870. 2000.
- Lledo, P.-M., Alonso, M., Grubb, M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature.* 7, 179-193. 2006.
- Lledo, P.-M., Saghatelian, A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci.* 28, 248-254. 2005.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 2074-2077. 1993.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* 264, 1145-1148. 1994.
- Lois, C., García-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. Chain migration of neuronal precursors. *Science.* 271, 978-981. 1996.
- Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Martinez-Guijarro, F. J., Blasco-Ibanez, J. M., Luis de la Iglesia, J. A., Bernbeu, A., Garcia-Verdugo, J. M. Lesion and regeneration in the medial cerebral cortex of lizards. *Histol. Histopathol.* 7, 725-746. 1992.
- Lockett, J.C., Hüser, M.B., Giagtzoglou, N., Brown, J.E., Pritchard, C.A.. Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ* 11,163–171. 2000.

- Lütolf, S., Radtke, F., Aquet, M., Suter, U., Taylor, V. Notch 1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development*. 129, 373-385. 2002.
- Luettker, N. C., Qui, T. H., Peiffer, R. L., Oliver, P., Smithies, O., Lee, D. C. TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell*. 73, 263-278. 1993.
- Luo, Z., Diaz, B., Marshall, M. S., Avruch, J. An intact zinc finger is required for optimal binding to processed Ras and for ras-dependent Raf activation in situ. *Mol. Cell. Biol.* 17, 46-53. 1997.
- Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritti-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L., Dudek, H., McMahon, A. P., Fishell, G. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron*. 39, 937-950. 2003.
- Madsen, T. M., Kristjansen, P. E., Bolwig, T. G., Wortwein, G. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience*. 119, 635-642. 2003.
- Maekawa, M., Takashima, N., Arai, Y., Nomura, T., Inokuchi, K., Yuasa, S., Osumi, N. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes Cells*. 10, 1001-1014. 2005.
- Magavi, S. S., Leavitt, B. R., Macklis, J. D. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*. 405, 951-955. 2000.
- Magavi, S. S., Macklis, J. D. Identification of newborn cells by BrdU labelling and immunocytochemistry in vivo. *Meth. Mol. Biol.* 198, 283-290. 2002a.
- Magavi, S. S., Macklis, J. D. Immunocytochemical analysis of neuronal differentiation. *Meth. Mol. Biol.* 198, 291-297. 2002b.
- Magavi, S. S., Mitchell, B. D., Szentirmai, O., Carter, B. S., Macklis, J. D. Adult-born and preexisting olfactory granule neurons undergo distinct experience-dependent modifications of their olfactory response in vivo. *J. Neurosci.* 16, 10729-10739. 2005.
- Mann, G. B., Fowler, K. J., Gabriel, A., Nice, E. C., Williams, R. L., Dunn, A. R. Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell*. 73, 249-261. 1993.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., Marshall, C. J. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 4378-4383. 1997.
- Mark, G. E., Rapp, U. R. Primary structure of v-raf: relatedness to the src family of oncogenes. *Science*. 224, 285-289. 1984.
- Markakis, E. A., Gage, F. H. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to fields CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J. Comp. Neurol.* 406, 449-460. 1999
- Mason, C. S., Springer, C. J., Cooper, R. G., Superti-Furga, G., Marshall, C. J., Marais, R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *The EMBO J.* 18, 2137-2148. 1999.
- McEwen, B. S. Stress and hippocampal plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 105-122. 1999.
- McKay, R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 276, 66-71. 1997.
- Mercer, K., Chiloehes, A., Hüser, M., Kiernan, M., Marais, R., Pritchard, C. ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene*. 21, 247-355.

- 2002.
- Mercer, K. E., Pritchard, C. A., Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *B.B.A.* 1653, 25-40. 2003
- Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H., Hen, R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioural effects of environmental enrichment. *Nat. Neurosci.* 9, 729-731. 2006.
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., Derynck, R. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature.* 376, 337- 341. 1995.
- Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E. F., Baccharini, M. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf gene. *EMBO J.* 20, 1952-1962. 2001.
- Miller, F. D., Gauthier, A. S. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron.* 54, 357-369. 2007.
- Milner, B., Squire, L. R., Kandel, E. R. Cognitive Neuroscience and the study of memory. *Neuron.* 20, 445-468. 1998.
- Mineur, Y. S., Belzung, C., Crusio, W. E. Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience.* 150, 251-259. 2007.
- Ming, G., Song, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 223-250. 2005.
- Mirescu, C., Gould, E. Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus.* 16, 233-238. 2006.
- Miyata, T., Maeda, T., Lee, J. E. NeuroD is required for differentiation of granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev.* 13, 1647-1652. 1999.
- Molofsky A. V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I. K., Clarke, M. F., Morrison, S. J. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature.* 425, 962–967. 2003.
- Molofsky, A. V., Slutsky, S. G., Joseph, N. M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N. E., Morrison, S. J. Increasing p16^{INK4a} expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature.* 443, 448-452. 2006.
- Moodie, S. A., Paris, M. J., Wolfman, A. Association of MEK1 with p21ras. GMPPNP is dependent on B-RAF. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7153-7162. 1994.
- Moodie, S. A., Wolfman, A. The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet.* 10, 44-48. 1994.
- Morice, C., Nothias, F., König, S., Vernier, P., Baccharini, M., Vincent, J.-D., Barnier, J. V. Raf-1 and B-Raf proteins have similar regional distributions but different subcellular localizations in adult rat brain. *Europ. J. Neurosci.* 11, 1995-2006. 1999.
- Morozov, A., Muzzio, I. A., Bourtchouladze, R., Van-Strien, N., Lapidus, K., Yin, D., Winder, D. G., Adams, J. P., Sweatt, J. D., Kandel, E. R. Rap1 couples cAMP signalling to a distinct pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning and memory. *Neuron.* 39, 309-325. 2003.
- Morrison, D. K., Heidecker, G., Rapp, U. R., Copeland, T. D. Identification of the major phosphorylation

- sites of the Raf-1 kinase. *J. Biol. Chem.* 268, 17309-17316. 1993.
- Morrison, S. J., Perez, S. E., Qiao, Z., Verdi, J. M., Hicks, C., Weinmaster, G., Anderson, D. J. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell.* 101, 499-510. 2000.
- Muskavitch, M. A. Delta-notch signalling and Drosophila cell fate choice. *Dev. Biol.* 166, 415-430. 1994.
- Nacher, J., McEven, B. S. The role of N-methyl-D-aspartate receptor in neurogenesis. *Hippocampus.* 16, 267-270. 2006.
- Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., Nakafuku, M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell.* 110, 429-441. 2002.
- Namba, T., Mochizuki, H., Onodera, M., Mizuno, Y., Namiki, H., Seki, T. The fate of neural progenitor cells expressing astrocytic and radial glial markers in the postnatal rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1928-1941. 2005.
- Nateri, A. S., Raivich, G., Gebhardt, C., Da Costa, C., Naumann, H., Vreugdenhil, M., Makwana, M., Brandner, S., Adams, R. H., Jefferys, J. G. R., Kann, O., Behrens, A. ERK activation causes epilepsy by stimulation NMDA receptor activity. *The EMBO Journal.* 26, 4891-4901. 2007.
- Nekhoroshkova, E., Albert, S., Becker, M., Rapp, U. R. A-RAF kinase functions in ARF6 regulated endocytic membrane traffic. *PloS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0004647. Epub 2009 Feb 27. 2009.
- Nguyen, A., Burack, W. R., Stock, J. L., Kortum, R., Chaika, O. V., Afkarian, M., Muller, W. J., Murphy, K. M., Morrison, D. K., Lewis, R. E., McNeish, J., Shaw, A. S. Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3035-3045. 2002.
- Nicoll, R. A., Schmitz, D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nature Rev. Neurosci.* 6, 863-876. 2005.
- Nieto, M., Schuurmans, C., Britz, O., Guillemont, F. Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron.* 29, 401-413. 2001.
- Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O., Eriksson, P. S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* 39, 569-578. 1999.
- Nottebohm, F. Neuronal replacement in adulthood. *Ann. N Y Acad. Sci.* 4, 143-161. 1985.
- Nottebohm, F. From bird song to neurogenesis. *Sci. Am.* 260, 74-79. 1989.
- Nottebohm, F. Neuronal replacement in adult brain. *Brain Res. Bull.* 57, 737-749. 2002a.
- Nottebohm, F. Why are some neurons replaced in adult brain? *J. Neurosci.* 22, 624-628. 2002b.
- Nottebohm, F., Alvarez-Buylla, A., Cynx, J., Kirn, J., Ling, C. Y., Nottebohm, M., Suter, R., Tolles, A., Williams, H. Song learning in birds: the relation between perception and production. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 329, 115-124. 1990.
- Nottebohm, F., Arnold, A. P. Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science.* 194, 211-213. 1976.
- Ohl, F., Fuchs, E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain. Res. Cogn. Brain. Res.* 7, 379-387. 1999.

- Ohnuma, S.-i., Harris, W. A. Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron*. 40, 199-208. 2003.
- Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C. E., Harris, W. A. p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in *Xenopus* retina. *Cell*. 24, 499-510. 1999.
- Oliver, T. G., Wechsler-Reya, R. J. Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron*. 42, 885-888. 2004.
- Olson, A. K., Eadie, B. D., Ernst, C., Christie, B. R. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. *Hippocampus*. 16, 250-260. 2006.
- Oppenheim, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 453-501. 1991.
- Oppenheim, R. W., Flavell, R. A., Vinsant, S., Prevette, D., Kuan, C. Y., Rakic, P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J. Neurosci.* 21, 4752-4760. 2001.
- Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sánchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Álvarez-Buylla, A., Altaba, A. R. Sonic hedgehog controls stem cell behaviour in the postnatal and adult brain. *Development*. 132, 335-344. 2005.
- Palmer, T. D., Markakis, E. A., Willhoite, A. R., Safar, F., Gage, F. H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* 19, 8487-8497. 1999.
- Palmer, T. D., Ray, J., Gage, F. H. FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol. Cell Neurosci.* 6, 474-486. 1995.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R., Gage, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 425, 479-494. 2000.
- Papin, C., Denouel, A., Calothy, G., Eychene, A. Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene*. 12, 2213-2221. 1996.
- Parent, J. M. The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair. *Epilepsy Res.* 50, 179-189. 2002b.
- Parent, J. M., Lowenstein, D. H. Seizure-induced neurogenesis: Are more new neurons good for an adult brain? *Prog. Brain Res.* 135, 121-131. 2002a.
- Parent, J. M., Valentin, V. V., Lowenstein, D. H. Prolonged seizures increase proliferating neuroblasts in the adult rat subventricular zone–olfactory bulb pathway. *J. Neurosci.* 15, 3174-3188. 2002c.
- Parent, J. M., Vexler, Z. S., Gong, C., Derugin, N., Ferriero, D. M. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann. Neurol.* 52, 802-813. 2002d.
- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., Lowenstein, D. H. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganizations in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 3727-3739. 1997.
- Piatti, V. C., Espósito, M. S., Schinder, A. F. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. *The Neuroscientist*. 12, 463-468. 2006.
- Pleasure, S. J., Collins, A. E., Lowenstein, D. H. Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development. *J. Neurosci.* 20, 6095-6105. 2000.
- Plümpe, T., Ehninger, D., Steiner, B., Klempin, F., Jessberger, S., Brandt, M., Römer, B., Rodriguez,

- G. R., Kronenberg, G., Kempermann, G. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC Neurosci.* 7:77. 2006.
- Pritchard, C. A., Bolin, L., Slattery, R., Murray, R., McMahon, M. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase. *Curr. Biol.* 6, 614-617. 1996.
- Pritchard, C.A., Hayes, L., Wojnowski, L., Zimmer, A., Marais, R.M., Norman, J.C. B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5937–5952. 2004.
- Prichard, C. A., Samuels, M. L., Bosch, E., McMahon, M. Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6430-6442, 1995.
- Ra, S.-M., Kim, H., Jang, M.-H., Shin, M.-C., Lee, T.-H., Lim, B.-V., Kim, C.-J., Kim, E.-H., Kim, K.-M., Kim, S.-S. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Neurosci. Letters.* 333, 123-126. 2002.
- Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., Van-denBerg, S. R., Fike, J. R. Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat. Res.* 162, 39-47. 2004.
- Rajnicek, A. M., Britland, S., McCaig, C. D. Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimension, neuronal age and cell type. *JCS.* 110, 2905-2913. 1997.
- Rakic, P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 65-71. 2002.
- Rakic, P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.* 145, 61-83. 1972.
- Ramon y Cajal, S. Degeneration and regeneration of the nervous system. *Trans. Day. R. M.* (aus dem 1913 spanischen edm. Oxford Univ. Press, London 1928). 1913.
- Rapp, U. R., Goldsborough, M. D., Mark, G. E., Bonner, T. I., Groffen, J., Reynolds, F. H. Jr., Stephenson, J. R. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80, 4218-22. 1983a.
- Rapp, U. R., Reynolds, F. H. Jr., Stephenson, J. R. New mammalian retrovirus: demonstration of a polyprotein gene product. *J. Virol.* 45, 914-924. 1983b.
- Ravagnan, L., Roumier, T., Kroemer, G. Mitochondria, the killer organells and their weapons. *J. Cell. Phys.* 192, 131-137. 2002.
- Redmond, L., Oh, S. R., Hicks, C., Weinmaster, G., Ghosh, A. Nuclear Notch 1 signalling and the regulation of dendritic development. *Nat. Neurosci.* 3, 30-40. 2000.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustiniella, F., Dobyns, W. B., Caskey, C. T., Ledbetter, D. H. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature.* 364, 717-721. 1993.
- Represa, A., Duyckaerts, C., Tremblay, E., Hauw, J. J., Ben-Ari, Y. Is senile Alzheimer type associated with hippocampal plasticity? *Brain Res.* 457, 355-359. 1988.
- Reynolds, B. A., Rietze, R. L. Neural stem cells and neurospheres- re-evaluating the relationship. *Nat.*

- Methods*. 2, 333-336. 2005.
- Reynolds, B. A., Tetzlaff, W., Weiss, S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12, 4565-4574. 1992.
- Reynolds, B. A., Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255, 1707-1710. 1992.
- Reznikov, K. Hippocampal formation in the mouse and rat – structural and organization and development: a review. In *Cell Proliferation and Cytogenesis in the Mouse Hippocampus* (ed. F. Beck, W. Hild, W. Kriz, J. E. Pauly, Y. Sano, T. H. Schiebler). 1-81. Springer-Verlag. 1991.
- Rich, T., Allen, R. L., Wyllie, A. H. Defying death after DNA damage. *Nature*. 407, 777-783. 2000.
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J., Bartlett, P. F. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8591-8595. 1992.
- Rickmann, M., Amaral, D. G., Cowan, W. M. Organization of radial glial cells during the development of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 264, 449-479. 1987.
- Rola, R., Raber, J., Rizk, A., Otsuka, S., VandenBerg, S. R., Morhardt, D. R., Fike, J. R. Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Exp. Neurol.* 188, 316-330. 2004.
- Ross, M. E., Walsh, C. A. Human brain malformation and their lessons for neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1041-1070. 2001.
- Roth-Alpermann, C., Morris, R. G., Korte, M. Bonhoeffer, T. Homeostatic shutdown of long-term potentiation in the adult hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 11039-11044. 2006.
- Rousselot, P., Heintz, N., Nottebohm, F. Expression of brain lipid binding protein in the brain of the adult canary and its implications for adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 385, 415-426. 1997.
- Rousselot, P., Lois, C., Alvarez-Buylla, A. Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J. Comp. Neurol.* 351, 51-61. 1995.
- Sadgrove, M. P., Laskowski, A., Gray, W. P. Examination of granule layer cell count, cell density, and single-pulse BrdU incorporation in rat organotypic hippocampal slice cultures with respect to culture medium, septotemporal position, and time in vitro. *J. Comp. Neurol.* 497, 397-415. 2006.
- Salomoni, P., Calegari, F. Cell cycle control of mammalian neural stem cells: putting a speed limit on G1. *Trends Cell. Biol.* 5, 332-342. 2010.
- Savaskan, N. E., Alvarez-Bolado, G., Glumm, R., Nitsch, R., Skutella, T., Heimrich, B. Impaired postnatal development of hippocampal neurons and axon projections in the *Emx2*^{-/-} Mutants. *J. Neurochem.* 83, 1196-1207. 2002.
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J. W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V. Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R., Drew, M. R. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 17501-17506. 2006.
- Saxe, M. D., Malleret, G., Vronskaya, S., Mendez, I., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Hen, R. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc. Acad. Sci. USA.* 104, 4642-4646. 2007.

- Schaap, D., van der Wal, J., Howe, L. R., Marshall, C. J., van Blitterswijk, W. J. A dominant-negative mutant of raf blocks mitogen-activated protein kinase activation by growth factors and oncogenic p21ras. *J. Biol. Chem.* 268, 20232-20236. 1993.
- Scharff, C., Kirn, J. R., Grossman, M., Macklis, J. D., Nottebohm, F. Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds. *Neuron.* 25, 481-492. 2000.
- Scheer, N., Groth, A., Hans, S., Campos-Ortega, J. A. An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development.* 128, 1099-1107. 2001.
- Schlessinger, A. R., Cowan, W. M., Gottlieb, D. I. An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 159, 149-175. 1975.
- Schmid, R. S., Yokota, Y., Anton, E. S. Generation and characterisation of brain lipid-binding protein promoter-based transgenic mouse models for study of radial glia. *Glia.* 53, 345-351. 2006.
- Schrama, D., Keller, G., Houben, R., Ziegler, C. G., Vetter-Kauczok, C. S., Ugurel, S., Becker, J. C. BRAF^{V600E} mutations in malignant melanoma are associated with increased expressions of BAALC. *J. Carcinog.* 7,1. 2008.
- Schrenk-Siemens, K., Perez-Alcala, S., Richter, J., Lacroix, E., Rahuel, J., Korte, M., Müller, U., Barde, YA., Bibel, M. Embryonic stem cell-derived neurons as a cellular system to study gene function: lack of amyloid precursor proteins APP and APLP2 leads to defective synaptic transmission. *Stem Cells.* 26, 2153-2163. 2008.
- Schubert, S., Shannon, K., Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature.* 7, 295-308. 2007.
- Schulze, A., Nicke, B., Warne, P. H., Tomlinson, S., Downward, J. The transcriptional response to raf activation is almost completely dependent on mitogen-activated protein kinase activity and shows a major autocrine component. *Mol. Biol. Cell.* 15, 3450-3463. 2004.
- Scoville, W. B., Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurochem.* 20, 11-21. 1957.
- Seki, T. Hippocampal adult neurogenesis occurs in a microenvironment provided by PSA-NCAM-expressing immature neurons. *J. Neurosci. Res.* 69, 772-783. 2002.
- Seki, T., Arai, Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the DG of the adult rat. *J. Neurosci.* 13, 2351-2358. 1993.
- Selcher, J. C., Atkins, C. M., Trzaskos, J. M., Paylor, R., Sweatt, J. D. A Necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn. Mem.* 6, 478-490. 1999.
- Selcher, J. C., Nekrasova, T., Paylor, R., Landreth, G. E., Sweatt, J. D. Mice lacking the ERK isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn. Mem.* 8, 11-19. 2001.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 478, 359-378. 2004.
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7153-7160. 2001.
- Seroogy, K. B., Seress, L., Ribak, C. E. Ultrastructure of commissural neurons of the hilar region in the hippocampal dentate gyrus. *Exp. Neurol.* 82, 594-608. 1983

- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., Rakic, P. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signalling. *Science*. 286, 741-746. 1999.
- Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A. C., Land, H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5588-5597. 1997.
- Shalin, S. C., Hernandez, C. M., Dougherty, M. K., Morrison, D. K., Sweatt, J. D. Kinase suppressor of Ras1 compartmentalizes hippocampal signal transduction and subserves synaptic plasticity and memory formation. *Neuron*. 50, 765-779. 2006.
- Shapiro, L. A., Korn, M. J., Shan, Z., Ribak, C. E. GFAP-expressing radial glia-like cell bodies are involved in a one-to-one relationship with doublecortin-immunolabeled newborn neurons in the adult dentate gyrus. *Brain Res.* 1040, 81-91. 2005.
- Shapiro, L. A., Marks, A., Whitaker-Azmitia, P. M. Increased clusterin expression in old but not young adult S100B transgenic mice: evidence of neuropathological aging in a model of Down Syndrome. *Brain Res.* 1010, 17-21. 2004.
- Shi, Y., Chichung Lie, D., Taupin, P., Nakashima, K., Ray, J., Yu, R. T., Gage, F. H., Evans, R. M. Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*. 427, 78-83. 2004.
- Shihabuddin, L.S., Ray, J., Gage, F. H. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp. Neurol.* 148, 577-586. 1997.
- Shimizu, Y., Thumkeo, D., Keel, J., Ishizaki, T., Oshima, H., Oshima, M., Noda, Y., Matsumura, F., Taketo, M. M., Narumiya, S. ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J.C.B.* 168, 941-953. 2005.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., Kageyama, R. Oscillations in Notch signalling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron*. 58, 52-64. 2008.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 410, 372-376. 2001.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., Gould, E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*. 12, 578-584. 2002.
- Sibilia, M., Steinbach, J. P., Stingl, L., Aguzzi, A., Wagner, E. F. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *The EMBO Journal*. 17, 719-731. 1998.
- Sibilia, M., Wagner, E. F. Strain-dependent defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*. 269, 234-238. 1995.
- Sievers, J., Hartmann, D., Pehlemann, F. W., Berry, M. Development of astroglial cells in the proliferative matrices, the granule cell layer, and the hippocampal fissure of the hamster dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 320, 1-32. 1992.
- Simpson, D. L., Morrison, R., de Vellis, J., n, H. R. Epidermal growth factor binding and mitogenic activity on purified populations of cells from the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 8, 453-462. 1982.
- Simpson, H. B., Vicario, D. S. Brain pathways for learned and unlearned vocalizations differ in zebra finches. *J. Neurosci.* 10, 1541-1556. 1990.
- Smith, D. R., Gallagher, M., Stanton, M. E. Genetic background differences and nonassociative effects in mouse trace fear conditioning. *Learn. Mem.* 14, 597-605. 2007.

- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., Wojtowicz, J. M. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*. 130, 843-852. 2005.
- Song, H. J., Stevens, C. F., Gage, F. H. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 417, 39-44. 2002.
- Song, H. J., Stevens, C. F., Gage, F. H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 438-445. 2002b.
- Stanfield, B. B., Caviness, V. S. Jr., Cowan, W. M. The organization of certain afferents to the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.* 185, 461-483. 1979.
- Stanfield, B. B., Cowan, W. M. The development of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.* 184, 423-459. 1979.
- Stanfield, B. B., Cowan, W. M. The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J. Comp. Neurol.* 185, 393-422. 1979.
- Stanfield, B. B., Cowan, W. M. The development of the hippocampal region. In A. Peters und E.G. Jones (Eds.). *Cerebral Cortex*. Vol 7. Development and maturation of the cerebral cortex. *Plenum Press*, New York-London. 91-131. 1988.
- Stanfield, B. B., Trice, J. E., Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp. Brain. Res.* 72, 399- 406. 1988.
- Stanton, V. P., Jr., Cooper, G. M. Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1171-1179. 1987.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*. 54, 805-814. 2006.
- Storm, S. M., Cleveland, J. L., Rapp, U. R. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene*. 5, 345-351. 1990.
- Stromme, P., Mangelsdorf, M. E., Shaw, M. A., Lower, K. M., Lewis, S. M., Bruyere, H., Lutcherath, V., Gedeon, A. K., Wallace, R. H., Scheffer, I. E., Turner, G., Partington, M., Frints, S. G., Fryns, J. P., Sutherland, G. R., Mulley, J. C., Gecz, J. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat. Genet.* 30, 441-445. 2002.
- Stoykova, A., Götz, M., Gruss, P., Price, J. Pax6-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development*. 124, 3765-3777. 1997.
- Stump, G., Durrer, A., Klein, A.-L., Lütolf, S., Suter, U., Taylor, V. Notch 1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mechanisms of Development*. 114, 153-159. 2002.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A., Gage, F. H. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. 1, 515-525. 2007.
- Sutrave, P., Bonner, T. I., Rapp, U. R., Jansen, H. W., Patschinsky, T., Bister, K. Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil : homologue of murine retroviral oncogene v-raf. *Nature*. 309, 85-88. 1984.

- Swanson L. W., Sawchenko P. E., Cowan W. M. Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. *J. Neurosci.* 1, 548-559. 1981.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., Caviness Jr., V. S. Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci.* 13, 820-833. 1993.
- Tanapat, P., Galea, L. A., Gould, E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 235-239. 1998.
- Tanigaki, K., Nogaki, F., Takahashi, J., Tashiro, K., Kurooka, H., Honjo, T. Notch1 and Notch 3 instructively restrict bFGF responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron.* 29, 45-55. 2001.
- Tashiro, A., Makino, H., Gage, F. H. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J. Neurosci.* 27, 3252-3259. 2007.
- Tashiro, A., Sandler, V. M., Toni, N., Zhao, C., Gage, F. H. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature.* 442, 929-933. 2006.
- Tauck, D. L., Nadler, J. V. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J. Neurosci. U.S.A.* 84, 4767-4771. 1985.
- Teng, Y. N., Tsai, W. H., Wu, C. J., Lin, S. J., Chen, Y. J., Kuo, P. L. Referral diagnosis of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome based on methylation-specific polymerase chain reaction. *J. Formos. Med. Assoc.* 101, 488-494. 2002.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 282, 1145-1147. 1998.
- Threadgill, D. W., Dlugosz, A. A., Hansen, L. A., Tennenbaum, T., Lichti, U., Yee, D., LaMantia, C., Mourton, T., Herrup, K., Harris, R. C., Barnard, J. A., Yuspa, S. H., Coffey, R. J., Magnuson, T. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science.* 269, 230-234. 1995.
- Thumkeo, D., Shimizu, Y., Sakamoto, S., Yamada, S., Narumiya, S. ROCK-I and ROCK-II cooperatively regulate closure of eyelid and ventral body wall in mouse embryo. *Genes to Cells.* 10, 825-834. 2005.
- Tidyman, W. E., Rauen, K. A. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Genet. Dev.* 19, 230-236. 2009.
- Toni, N., Teng, E. M., Bushong, E. A., Aimone, J. B., Zhao, C., Consiglio, A., van Praag, H., Martone, M. E., Ellisman, M. H., Gage, F. H. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat. Neurosci.* 10, 727-734. 2007.
- Tozuka, Y., Fukada, S., Namba, T., Seki, T., Hisatsune, T. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* 47, 803-815. 2005.
- Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., Horsford, D. J., Elia, A. J., McInnes, R. R., van der Kooy, D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 287, 2032-2036. 2000.
- Troppmair, J., Bruder, J. T., Munoz, H., Lloyd, P. A., Kyriakis, J., Banerjee, P., Avruch, J., Rapp, U. R.

- Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. *J. Biol. Chem.* 169, 7030-7035. 1994.
- Trump, B. F., Goldblatt, P. J., Stowell, R. E. Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural and cytochemical alterations of cytosomes, cytosomes, multivesicular bodies, and microbodies and their relation to the lysosome concept. *Lab. Invest.* 14, 1946-1968. 1965.
- Tucker, M. S., Khan, I., Fuchs Young, R., Price, S., Steininger, T. L., Greene, G. Wainer, B. H., Rosner, M. R. Localization of immunoreactive epidermal growth factor receptor in neonatal and adult rat hippocampus. *Brain Res.* 631, 65-71. 1993.
- Ueki, T., Tanaka, M., Yamashita, K., Mikawa, S., Qui, Z., Maragakis, N. J., Hevner, R. F., Miura, N., Sugimura, H., Sato, K. A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* 23, 11732-11740. 2003.
- van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., Gage, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Acad. Sci. USA.* 96, 13427-13431. 1999.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci.* 2, 266-270. 1999.
- van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. G. Gage, F. H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature.* 415, 1030-1034. 2002.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F. H. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J. Neurosci.* 25, 8680-8685. 2005.
- von Bohlen und Halbach, O. Immunohistological markers for staining neurogenesis in adult hippocampus. *Cell. Tissue Res.* 329, 409-420. 2007.
- Vassalli, A., Matzuk, M. M., Gardner, H. A., Lee, K. F., Jaeniscg, R. Activin/inhibin beta subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes. Dev.* 8, 414-427. 1994.
- Viallard, J. F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J. L., Reiffers, J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implication for oncology. *Cancer Radiother.* 5, 109-129. 2001.
- Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., Cooper, J. A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell.* 74, 205-214. 1993.
- von Bohlen und Halbach, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329, 409-420. 2007.
- Wakamatsu, Y., Maynard, T.M., Weston, J.A. Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development.* 127, 2811-2821. 2000.
- Wan, P. T., Garnett, M. J., Roe, S. M., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V. M., Jones, C. M., Marshall, C. J., Springer, C. J., Barford, D., Marais, R. Mechanism of activation of the RAF-ERK signalling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 116, 855-867.2004.
- Wang, J., Lenardo, M. J. Roles of caspases in apoptosis, development and cytokine maturation

- revealed by homozygous gene deficiencies. *J. Cell. Sci.* 113, 753-757. 2000.
- Wang, H.G., Rapp, U.R., Reed, J.C. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell.* 87, 629-638. 1996a.
- Wang, H.G., Takayama, S., Rapp, U.R., Reed, J.C. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 7063-7068. 1996b.
- Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A. C. Reynolds, B. A. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 16, 7599-7609. 1996a.
- Weiss, S., Reynolds, B. A., Vescovi, A. L., Morshead, C., Craig, C. G., van der Kooy, D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci.* 19, 387-393. 1996b.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R. The Raf proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 875-885. 2004.
- Weston, C. R., Wong, A., Hall, J. P., Goad, M. E., Flavell, R. A., Davis, R. J. The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 14114-14119. 2004.
- Wichterle, H., García-Verdugo, J. M., Alvarez-Buylla, A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron.* 18, 779-791. 1997.
- Wiese, S., Pei, G., Karch, C., Troppmair, J., Holtmann, B., Rapp, U. R., Sendtner, M. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 137-142. 2001.
- Wilsch-Bräuninger, M., Huttner, W. B. Neurale Stamm- und Vorläuferzellen. *BIOspektrum.* 13, 369-372. 2007.
- Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Sekeres, M., Snyder, J. S., Wang, S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampal-dependent memory function. *Hippocampus.* 16, 296-304. 2006.
- Wojnowski, L., Stancato, L. A., Larner, A. C., Rapp, U. R., Zimmer, A. Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 91, 97-104. 2000.
- Wojnowski, L., Stancato, L. F., Zimmer, A. M., Hahn, H., Beck, T. W., Larner, A. C., Rapp, U. R., Zimmer, A. Craf-1 protein kinase is essential for mouse development. *Mech. Dev.* 76, 141-149. 1998.
- Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Beck, T. W., Hahn, H., Bernal, R., Rapp, U. R., Zimmer, A. Endothelial apoptosis in B-RAF deficient mice. *Nature Genet.* 16, 293-297. 1997.
- Wu, C.-W., Chang, Y.-T., Yu, L., Chen, H., Jen, C. J., Wu, S.-Y., Lo, C.-P., Kuo, Y.-M. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J. Appl. Physiol.* 105, 1585-1594. 2008.
- Wu, X., Noh, S. J., Zhou, G., Dixon, J. E., Guan, K. L. Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells. *J. Biol. Chem.* 271, 3265-3271. 1996.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306. 1980.
- Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M., Mori, K. Visualisation of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport.* 11, 1991-1996. 2000.
- Yang, Y., Mufson, E. J., Herrup, K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of

- Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 23, 2557-2563. 2003.
- Yuasa, S., Nakajima, M., Aizawa, H., Sahara, N., Koizumi, K., Sakai, T., Usami, M., Kobayashi, S., Kuroyanagi, H., Mori, H., Koseki, H., Shirasawa, T. Impaired cell cycle control of neuronal precursor cells in the neocortical primordium of presenilin-1-deficient mice. *J. Neurosci. Res.* 70, 501-513. 2002.
- Zebisch, A., Staber, P.B., Delavar, A., Bodner, C., Hiden, K., Fischereeder, K., Janakiraman, M., Linkesch, W., Auner, H.W., Emberger, W., et al. Two transforming C-RAF germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 66, 3401-3408. 2006.
- Zenz, R., Scheuch, P., Martin, P., Frank, C., Eferl, R., Kenner, L., Sibilina, M., Wagner, E. F. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signalling. *Dev. Cell.* 4, 879-889. 2003.
- Zhang, C.-L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., Evans, R. M. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature.* 451, 1004- 1009. 2008.
- Zhang, L., Wang, W., Hayashi, Y., Jester, J. V., Birk, D. E., Gao, M., Liu, C. Y., Kao, W. W., Karin, M., Xia, Y. A role for MEK kinase 1 in TGF-beta/activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure. *EMBO J.* 22, 4443-4454. 2003.
- Zhang, R. L., Zhang, Z. G., Lu, M., Wang, Y., Yang, J. J., Chopp, M. Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke. *JCBFM.* 26, 857-863. 2006.
- Zhang, R., L. Zhang, Zhang, Z., Wang, Y., Lu, M., LaPointe, M., Chopp, M.,. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann. Neurol.* 50, 602-611. 2001.
- Zhang, X., Jin, G., Tian, M., Qin, J., Huang, Z. The denervated hippocampus provides proper microenvironment for the survival and differentiation of neural progenitors. *Neurosci. Letters.* 414, 115-120. 2007
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers Jr. R. G., Ming, G., Gage, F. H. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci.* 26, 3-11. 2006.
- Zhao, C; Deng, W., Gage, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 132, 645-660. 2008.
- Zhao, M., Li, D., Shimazu, K., Zhou, Y. X., Lu, B., Deng, C. X. Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol. Psychiatry.* 62, 381-390. 2007.
- Zhao, S., Chai, X., Förster, E., Frotscher, M. Reelin is a positional signal for the lamination of dentate granule cells. *Development.* 131, 5117-5125. 2004.
- Zhao, S., Frotscher, M. Go or stop? Divergent roles of reelin in radial neuronal migration. *Neuroscientist.* 16, 421-434. 2010.
- Zheng, W., Nowakowski, R. S., Vaccarino, F. M. Fibroblast growth factor 2 is required for maintenance the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev. Neurosci.* 26, 181-196. 2004.

- Zhong, J., Li, X., McNamee, C., Chen, A. P., Baccarini, M., Snider, W. D., Raf kinase signalling functions in sensory neuron differentiation and axon growth in vivo. *Nat. Neurosci.* 10, 598-607. 2007.
- Zhou, C. J., Zhao, C., Pleasure, S. J. Wnt signalling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J. Neurosci.* 24, 121-126. 2004.
- Zou, X., Rudchenko, S., Wong, K., Calame, K. Induction of c-myc transcription by the v-Abl tyrosine kinase requires Ras, Raf1, and cyclin-dependent kinases. *Genes. Dev.* 11, 654-662. 1997.

Bücher

- Amaral, D.G., Witter, M.P. Hippocampal formation. In: Paxinos, G. (Ed.), The rat nervous system, 2nd edition. *Academic Press, San Diego.* 443-493. 1995.
- Campbell, N. A. Biologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. 1997.
- Franklin K. B. J., Paxinos, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Acad. Press.* 1997.
- Gage, F. H., Kempermann, G., Song, H. Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Verlag N.Y.* 2008
- Gilbert, F. S. Developmental Biology. 6th Edition. *Sinauer Associates Incorporated.* 1997.
- Heinecke, H. Angewandte Versuchstierkunde. *Gustav Fischer Verlag.* 1989.
- Hogan, B., Constantini, F., Lacy, E. Manipulating the mouse embryo. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor N.Y.* 1986.
- Kaufman, M. H. The atlas of mouse development. *Acad. Press.* 1992.
- Kaufman, M. H. The atlas of mouse development. *Acad. Press.* London. 2002.
- Leonhardt, H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, N. Y.,* 8. Auflage, 1990.
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N. Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects. 4th ed. Philadelphia: Saunders. 1993.
- Price, D. J., Willshaw, D. J. Mechanism of cortical development. *Oxford University Press. N. Y.* 2000.
- Rauber und Kopsch. Anatomie des Menschen, Band III. Hrsg. Leonhardt, H., Töndury, G., Zilles, K. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart.* 1987.
- Swanson, L. W. The hippocampus and concept of the limbic system. In "Neurobiology of the Hippocampus" (W. Seifert, ed.), pp. 3–19. *Academic Press.* London. 1983.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. Entwicklungsbiologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.* 1999.

Danksagung

Herrn Prof. Ulf Rüdiger Rapp danke ich zuerst einmal für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der über das Graduiertenkolleg 1048 finanziert wurde. Weiterhin gilt mein Dank seiner ideenreichen und wissenschaftlich hochmotivierten Betreuung, die für das Gelingen dieser Arbeit sehr entscheidend war.

Herrn PD Dr. Rudolf Götz möchte ich vor allem für seine überdurchschnittlich engagierte wissenschaftliche Betreuung danken, die selbst zu später Stunde auf Seminartagungen jederzeit zur Verfügung stand. Seine Arbeitsmotivation konnte nur anstecken und seine Hilfsbereitschaft in der Durchführung von Verhaltenstudien, Videodokumentationen und vielem mehr, ließen jede spontan durchgeführte Beobachtung festhalten.

Prof. Thomas Brand und Prof. Christoph Winkler möchte ich vor allem für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1048 bedanken, sowie für ihre Bereitstellung als Zweitgutachter neben Prof. Rapp/Dr. Götz diese Arbeit mit zu betreuen.

Dr. Guadalupe Camarero danke ich für die sehr gute Einführung in die Histologie, Mikroskopie und Zellkultur von embryonalen Nervenzellen. Ohne sie wäre der Neueinstieg in dieses Thema wohl kaum so reibungslos verlaufen.

Bei Prof. Helmut Heinsen möchte ich mich für die pathologische Unterstützung in dieser Arbeit, den Ratschläge zur Gewebepräparation, den tollen makroskopischen Aufnahmen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

PD Dr. Robert Blum danke ich für die gute Unterstützung bei den *in vitro* Experimenten. Durch seine Mithilfe und durch die gute Zusammenarbeit mit Herrn Prof. M. Sendtner konnte das BRaf Manuskript zeitnah fertiggestellt werden.

Eva Broschke war eine sehr geduldige Lehrmeisterin für die Histologie der Gehirnpräparate.

Dr. Angelika Schmitt hat mich bei der Gewebepreparation zur Proteinisolation sehr gut technisch unterstützt.

Hildegard Troll danke ich besonders für ihr typographisches Engagement und ihre gute Hilfsbereitschaft.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich natürlich auch für die tolle Unterstützung danken:

Dr. Simone Heimpel danke ich für die Einführung in die In Situ Hybridisieretechnik und die nette Aufnahme in meine neue Arbeitsgruppe. Für die technischen Ratschläge möchte ich mich vor allem bei Dr. Christiaan Karremann, Dr. Matthias Becker, Dr. Fatih Ceteci, Emmanuele Zanuccov und Tamara Potapenko bedanken. Bei Agnes Stefanska gilt mein

Dank der Einführung in das Cryotom, Doris Heim möchte ich für die Einführung in das Mikrotom, das Erlernen von Gewebeeinbettung, Histologie und Gewebepräparation danken. Dr. Christian Korn, meinem Laborplatznachbarn danke ich für viele Protokollbesprechungen bei Problemen mit immunhistologischen Färbungen. Maureen Menning danke ich für die gute und geordnete Übergabe der Tierhaltung, Semra Ceteci und Inès Castro und Katharina Lütgenhaus für die ihre Hilfsbereitschaft. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt natürlich auch Monika Wagenbrenner und Sylvia Pränger.

Meinem kleinen Bruder Daniel Pfeiffer danke ich vor allem dafür, dass er auch an unüblichen Tagen wie zwischen den Weihnachtsfeiertagen und an Neujahr dazu bereit war, mich protokollarisch bei zahlreichen Mausektionen zu begleiten. Durch deine Computerkenntnisse könntest du so manches hier retten und meine Bilder sehr gut modifizieren. Du warst der beste Hiwi, den man sich nur wünschen kann.

Meinen Eltern, die mich immer dazu angewiesen haben, diese Arbeit nun doch einmal fertig zu stellen und die mir die Möglichkeit gaben, mein Hobby auch in dieser Zeit weiter zu pflegen.

Bei meinem Lebenspartner Fred Menig möchte ich mich zuerst einmal für sein Gesamtinteresse an meiner Arbeit bedanken, doch auch seine technische Unterstützung als Nichtwissenschaftler am Wochenende und zwischen Weihnachten und Neujahr bei der Protokollierung und Präparationsdurchführung war durch seine immense Geduld immer eine große Hilfe.

Abkürzungsverzeichnis

á	zu
α	„anti“
AB	„ <i>antibody</i> “, Antikörper
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
amy	Amygdala
APS	Ammoniumperoxydisulfat, Ammoniumpersulfat
autoklaviert	Sterilisation durch Erhitzen bei 121°C
av	„ <i>average</i> “, Mittelwert
B	BrdU
BDNF	„ <i>brain derived neurotrophic factor</i> “
beta-III-Tubulin	TUJ-1, β3 ist ein Neuronen spezifisches Zytosketettprotein
biot.	Biotech
biotin.	biotinyliert
BLBP	„ <i>Brain Lipid-Binding Protein</i> “
Bmi-1	„ <i>polycomb ring finger oncogene</i> “
bp	Basenpaar
BrdU	„5- B romo-2`- D eoxyuridin“ S-Phasenmarker des Zellzyklus proliferierender Zellen
Brn-2	POU Domänen-Transkriptionsfaktor
BSA	„ <i>Bovine Serum Albumin</i> “, fetales Kälberserum
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Calbindin	Calcium bindendes Protein. Expression in migrierenden und differenzierenden Neuronen
Calretinin	Vitamin D-abhängiges Kalzium-bindendes Protein
CB	„Cerebellum“
Cerebellum	Kleinhirn
CNTF	„ <i>ciliary neurotrophic factor</i> “
CRMP4	„ <i>Collapsin response mediator protein 4/TUC4</i> “
d	dorsal
Da	Dalton
DAB	3,3`- D iaminobenzidin
DAPI	4`,6- D iamidino-2-phenylindole dihydrochlorid

DCX	Doublecortin; X-chromosomal kodiertes Protein, dass während der Embryonalentwicklung des ZNS und während der adulten Neurogenese in Säugetieren in den neuronalen Vorläuferzellen und jungen Neuronen exprimiert wird
ddH ₂ O	doppelt entsalztes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	dentate gyrus , Gyrus dentatus
dH ₂ O	deionisiertes/ entsalztes Wasser
DISC1	„ Disrupted-in-schizophrenia “
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DS	„ Donkey Serum “, Esel Serum
DTE	1,4- Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E	„ embryonic day “, embryonale Entwicklungsstufe
EC	Entorischer Cortex
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure (acetic acid)
EGF	„ Epidermal growth factor “
ERK	Extrazellulär signal regulierte Kinase
ERV	„ Enriched Environment “, angereicherte Umgebung
	Erlebnisstall
et al.	und andere
Ethanol absolut	Alkohol 100%
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure . Wird aus Glutaminsäure gebildet und ist wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter im ZNS
GCL	„ Granular Cell Layer “, Körnerzellschicht
GE	GE Healthcare
GFAP	„ glial fibrillary acidic protein “. Protein, das als Intermediär-filament im Zytoplasma von Gliazellen im ZNS vorkommt. Ein Marker für reife Astrocyten
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gh	GFAP-positive horizontale Astrozyte
Gr	GFAP-positive radiale Astrozyte
GS	„ Goat Serum “, Ziegen Serum
GTP	Guanin-Tri-Phosphat

GVOs	g entechnisch v eränderte O rganismen
h	„ <i>hour</i> “, Stunde
hA	h orizontale A strozyte
HCl	Salzsäure
H&E	H ämatoxylin, E osin
HP	H ippocampus
ht	heterozygot
ICC	I mmun c ytochemie
IG	Industrie Gesellschaft
IHC	I mmun h istochemie
incl.	Inklusiv
Ind.	Industries
ip	<i>intra peritoneal</i> , in den Bauchraum injiziert
ISH	I n S itu H ybridisierung
Isopropanol	2-Propanol
KCl	K alium c hlorid
kDa	K ilo D alton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat (M=136,09g/mol)
Ki67	Proliferationsmarker
ko	K nock o ut
Kortex	präfrontaler Kortex, Großhirn
L	L iter
L.C.	„ <i>Long Chase</i> “, Langzeitversuch
L.P.	„ <i>Long Pulse</i> “, mehrfach BrdU Applikation
M	M olar
mA	M iliampere
MAM	m ethylazoxymethanol Azetat, antimitotisches Pharmakon
MAPK	M itogen aktivierte P rotein K inase
MEK	M APK/ E RK aktivierende K inase
min	M inute
mM	M illimolar
MM	M aus M onoklonal
M&M	M aterial und M ethoden
ML	„ <i>Molecular Layer</i> “, Molekularschicht
musashi	RNA-bindendes Protein, spezifisch für Astrocyten

MW	„ Molecular Weight “, Molekulargewicht
MZ	mittlere Zone
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₄ P ₂ O ₇	Natriumpyrophosphat (tetra-Natriumdiphosphat Decahydrat)
NC	„ Normal Cage “, Standardtierhaltungsbedingungen
NDS	„ Normal Donkey Serum “, Esel Serum
Nestin	Intermediärfilament Protein, neuroepithelialer Stammzellmarker
NeuN	„ neuronal nuclei “, Marker postmitotischer Neurone
NGF	„ nerve growth factor “
NGS	„ Normal Goat Serum “, Ziegen Serum
NP40	Nonidet 40
NPC	„ neuronal precursor cells “, neuronale Vorläuferzellen
NSC	Neuronale Stammzellen
NT-3	neurotrophin-3
Nullmutant	CRAF Knockout
OB	Bulbus Olfactorius
Olig2	„ Oligodendrocyte Transcriptionfactor 2 “
o/N	„ over Night “, über Nacht
OZ	„ outer zone “, äußere Zone
PAGE	Polyacrylamid-Gel Elektrophorese
Pax6	„ Paired Box Protein “
PBS	phosphatgepufferte Natriumchloridlösung
PC	präfrontaler Kortex
PCR	„ Polymerase Chain Reaction “, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pmolar	mol/μl
Prox1	„ prospero related homeobox gene “; postmitotisch undifferenzierte Neurone
PSA-NCAM	„ Poly-Sialated Neural Cell Adhesion Molecule. NCAM “, neurales Zelladhäsionsmolekül, das adhäsive Wechselwirkungen zwischen

	den Zellen vermittelt. In seiner einzigartigen posttranslationalen Modifikation mit Polysialinsäure (PSA) wird die adhäsive Eigenschaft umgekehrt, so dass der Abstand zwischen den Zellen vergrößert wird. Die Nervenzellen verlieren also an Zusammenhalt.
PVP-40	P olyvinylpyrrolidon
rA	radiale A strozyte
Rb	„ R abbit“, Kaninchen Serum
RBD	„ R as b inding d omain“, Ras Bindedomäne
Rev.	„ R eview“
Reverse Primer	3'-5'- Negativstrangsynthese
RG	R adiale G liazelle
RMS	„ R ostral m igratory s tream“
rpm	„ r otations p er m inute“, Umdrehungen pro Minute
RT	R aumtemperatur
S100β	S100 Calcium bindendes Protein
Sci.	„ S cientific“
sec.	Sekunde
Semi Dry	Halbtrocken
SGZ	S ubgranuläre Z one
Sodium	Natrium
SOX2	Sry- verwandter HMG-Box Transkriptionsfaktor, determiniert undifferenziertes Zellschicksal
Stock	Ausgangskonzentration
Str.Alexa	S trepavidin A lexa
Sucrose	D(+) S accharose
SVZ	S ubventrikuläre Z one
syn	S ynonym
Tab.	T abelle
Taq	BioTherm™ Taq DNA Polymerase
Tec.	T echnologies
TEMED	N,N,N,N,- T etramethylendiamin
Tex.Red.Str	T exas R ed S trepavidin
TGF	„ T ransforming g rowth f actor“
TGFα	„ T ransforming g rowth f actor- α “

TLX	humanes Homolog zu <i>Drosophila tailless</i>
Trit.	Triton X-100
TUJ-1	β -III-Tubulin
TUNEL	“ <i>DeadEndTM Fluorometric TUNEL System</i> ”, spezifische Detektion und Quantifizierung apoptotischer Zellpopulationen
u.a.	unter anderem
v	ventral
v	Volumen
V	Volt
v.a.	vor allem
Vimentin	ein Marker unreifer Astrocyten
Vorwärts Primer	5`-3` Positivstrangsynthese
VZ	Ventrikuläre Zone
w	„ <i>weight</i> “, Gewicht
WB	Western Blot
wt	„ <i>Wild Typ</i> “, wildtypisch
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
ZNS	Zentralnervensystem

Eigene erworbene Qualifikationen

Seminare und Workshops

- Blockseminar über „neuere Methoden der Zellanalytik“ bei Prof. Dr. M. Kubbies
- „*Dynamic Microscopy Course*“ bei Prof. Dr. D.S. Harms
- Gentechnikfortbildungsveranstaltung zum Erwerb des Sachkundenachweises für Projektleiter und Beauftragte für Biologische Sicherheit bei Prof. Dr. Susanne Modrow am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg 2010
- Grundkurs Tierschutz und Versuchstierkunde bei Dr. Wolfgang Geise vom 28.07-01.08.2008 in Würzburg
- GSLs Workshop „Forschendes Lernen“ bei Dr. Wolfgang Lenhard
- GSLs Workshop „*Presentation Technique*“ bei Andrea Roos
- GSLs Workshop „Projektmanagement“ in the *Life Sciences* bei Dr. Detlef Bittner
- GSLs Workshop „Von der Idee zum Geschäftsplan“
- GSLs Workshop „Wissensmanagement und Entwicklungsdokumentation“ bei Dr. Detlef Bittner
- Statistikurs bei Prof. Dr. Annette Kopp-Schneider
- SFB 581 Workshop on „*Molecular mechanisms of axonal transport in health and disease*“. 26-27. January, 2007
- Statistikurs „*Applied Statistics for Life Sciences*“ Statistical Software Statistica
- Workshop „Organotypische Hirnschnittkulturen: Eine Plattformtechnologie für die experimentelle Hirnforschung“ bei Prof. Dr. Igmarm Blümke in Erlangen

Poster

- 4th International Symposium „*Revolution Research*“ Life and Science: *a journey through time*.
Titel: *Impairment of postnatal neuronal differentiation in mice lacking RAF-kinases*.
- GSLs Poster presentation. Titel: *Phenotypical analysis of mice lacking RAF-kinases: Role of B- and C-RAF in postnatal hippocampal neurogenesis*.
- GRK 1048 Begutachtung 2007: Postertitel: *Role of the kinase C-RAF in postnatal hippocampal neurogenesis*.
- DFG Begutachtung des SFB 581 Molekulare Erkrankungen des Nervensystems. Postertitel:
Molekulare Mechanismen des Zellüberlebens, der Migration und der Axon-regeneration von Nervenzellen bei Mausmutanten mit Fehlsteuerung der RAF-Wirkung.

-International Symposium of the SFB 581, Würzburg, April 19-21, 2012. *Molecular models for diseases of the nervous system*. Titel: *BRAF is an important mediator for neuronal differentiation and maturation*.

Publikationen

2006 Camarero, G., Tyrsin, O. Y., Xiang, C., **Pfeiffer, V.**, Pleiser, S., Wiese, S., Götz, R., Rapp, U. R. Cortical migration defects in mice expressing A-RAF from the B-RAF locus. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7103-7115.

2013 **Pfeiffer, V.**, Götz, R., Xiang, C., Camarero, G., Braun, A., Zhang, Y., Blum, R., Heinsen, H., Nieswandt, B., Rapp, U.R. Ablation of BRaf impairs neuronal differentiation in the postnatal hippocampus and cerebellum. doi:10.1371/journal.pone.0058259.

Retreat

11-12. September 2006: Joint Retreat GK 639/GK 1048 Tumorinstability/Organogenesis auf Burg Rothenfels. Titel des Vortrags: *Role of C-Raf in adult hippocampal neurogenesis*.

14-17. Dezember 2008: Winterretreat des GRK 1048 in Hirschegg/Kleinwalsertal. Titel des Vortrags: *The role of RAF kinases in hippocampal neurogenesis*.

Symposien

-Hottest Life Science in Town, June 14th 2007 organized by GSLS in Würzburg.

-2nd International Symposium „From Bench to Bedside“ molecular approaches for novel therapies. Organized by the international Graduate School in Würzburg.

-4th International Symposium „Revolution Research“ Life and Science: a journey through time. Organized by GSLS in Würzburg.

-2nd Symposium of the Research Training Group 1048 “Molecular Basis of Organ Development in Vertebrates” October 5th, 2009 in Würzburg.

-International Symposium SFB 581 „Molecular models for diseases of the nervous system“, April 21, 2012 in Würzburg.

Curriculum Vitae

Name: Marion Verena Pfeiffer
Geburtstag: 02.07.1978
Geburtsort: Ingolstadt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung:

1985- 1987 Grundschule Hannover
1987- 1989 Grundschule Schweinfurt
1989- 1998 Olympia-Morata Gymnasium Schweinfurt
1998 Abitur

Studium:

1998- 2005 Studium der Biologie an der Julius–Maximilians Universität Würzburg
2004- 2005 Diplomarbeit an der Bayr. Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau mit dem
Thema: „Untersuchung zum Auftreten und zur molekularbiologischen
Identifizierung von *Esca* in *Vitis vinifera* sp.
2005 Diplom in Biologie

Promotion:

2006- 2012 Dissertation am Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der
Julius-Maximilians Universität Würzburg
2009- 2012 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Würzburg
SFB 581: Molekulare Modelle für Erkrankungen des Nervensystems
AG Rapp

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in irgendeiner anderen Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Außer den urkundlich vorgelegten anerkannten Graden habe ich zuvor keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Verena Pfeiffer