



# **Expressionsanalyse des murinen $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins und funktionelle Charakterisierung der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
des Departments Biologie der Fakultät für  
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Kerstin Kuchenbecker**

aus Celle

Hamburg 2006

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. A. GAL  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. A. RODEWALD  
Tag der Disputation: 06. Oktober 2006

Hamburg, den 28. September 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

**gewidmet allen Mäusen dieser und jener Welt**

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1. Das Nervensystem.....	3
1.1 Gliazellen und Neuronen des Gehirns .....	3
1.2 Der Hippocampus .....	5
1.2.1 Struktureller Aufbau des Hippocampus.....	5
1.2.2 Die Langzeit-Potenzierung im Hippocampus – zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis.....	7
1.3 Dendritische Dornen sind besondere morphologische Spezialisierungen von Neuronen .....	7
2. Rho GTPasen .....	9
2.1 Rho GTPasen sind an der Differenzierung von Neuronen und deren Zellfortsätzen beteiligt.....	10
2.2 Die Regulation von Rho GTPasen und ihre Wirkungsweise.....	10
3. $\alpha$ PIX/ARHGEF6: ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für die Rho GTPasen Cdc42 und Rac1 .....	12
3.1 Domänenstruktur von $\alpha$ PIX/ARHGEF6.....	12
3.2 $\alpha$ PIX/ARHGEF6-abhängige Signalwege .....	13
3.3 Expression von $\alpha$ PIX/ARHGEF6 .....	15
4. X-chromosomal vererbte, unspezifische mentale Retardierung (NS-XLMR).....	15
5. Ziel der Arbeit .....	19
<b>III. Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
1. Material .....	20
1.1 Material für molekularbiologische Methoden .....	20
1.2 Materialien für proteinbiochemische Arbeitstechniken.....	20
1.3 Materialien für zellbiologische Methoden.....	21
1.4 Materialien für histochemische Arbeiten .....	22
1.5 Sonstige Chemikalien .....	22
1.6 Bakterienstämme und Zelllinien.....	23
1.7 Plasmide .....	23
1.7.1 Ausgangsvektoren für Klonierungen .....	23
1.7.2 Hergestellte Konstrukte.....	23

1.8	Oligonukleotide .....	24
1.9	Antikörper.....	26
2.	Molekularbiologische Methoden mit DNA.....	27
2.1	Anzucht und Lagerung von E.coli .....	27
2.2	Herstellung kompetenter E.coli-Zellen für die chemische Transformation.....	27
2.3	Transformation kompetenter E.coli-Zellen mit Plasmid-DNA.....	28
2.4	Isolierung von Plasmid-DNA .....	28
2.5	Isolierung von genomischer DNA .....	29
2.6	Restriktion von DNA.....	30
2.7	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	30
2.8	Ligation von DNA.....	30
2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.9.1	Genotypisierungs-PCR .....	31
2.10	Agarosegelelektrophorese .....	32
2.11	Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsprodukten .....	32
2.12	DNA-Sequenzierung .....	32
2.13	Klonierung mittels TOPO™ -Technologie .....	33
2.14	Klonierung mittels Gateway™ -Technologie .....	33
2.15	Southern-Blot-Analyse .....	33
3.	Molekularbiologische Methoden mit RNA.....	35
3.1	Allgemeine Bedingungen für das Arbeiten mit RNA .....	35
3.2	Isolierung und Reinigung totaler RNA.....	35
3.3	Konzentrationsbestimmung von RNA .....	36
3.4	Auftrennung von RNA.....	36
3.5	Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	36
3.6	Real-Time-PCR.....	36
3.7	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung an embryonalen hippocampalen Neuronen der Maus ...	38
3.7.1	Herstellung der RNA-Sonden.....	38
3.7.2	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	39
4.	Proteinbiochemische Methoden.....	41
4.1	Isolierung von Proteinen aus verschiedenen Geweben der Maus.....	41
4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	42
4.4	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western Blot).....	43
4.5	Immunologische Detektion auf PVDF-Membranen immobilisierter Proteine .....	43
4.6	Aufreinigung der synaptosomalen Fraktion und der postsynaptischen Dichte (PSD) .....	44
4.7	Herstellung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren .....	45

4.7.1	Expression und Aufreinigung des GST-CH-L-Fusionsproteins.....	45
4.7.2	Herstellung des polyklonalen anti- $\alpha$ Pix/Arhgef6-Antiserums .....	46
4.7.3	Biochemische Affinitätsaufreinigung des polyklonalen anti-CH-L-Antiserums..	46
4.8	Cdc42/Rac1-Pull-Down-Experimente .....	47
5.	Histologische Methoden.....	48
5.1	Perfusionsfixierung von Mäusen.....	48
5.2	Anfertigung von Gewebeschnitten .....	49
5.2.1	Paraffinschnitte .....	49
5.2.2	Gefrierschnitte.....	49
5.3	Histologische Färbungen .....	49
5.3.1	Hämatoxilin-Eosin-(HE)-Färbung.....	49
5.3.2	Histochemische Färbungen mit Diaminobenzidin .....	49
6.	Zellbiologische Methoden .....	50
6.1	Zellkultur .....	50
6.1.1	Allgemeine Inkubationsbedingungen .....	50
6.1.2	Kultivierung verschiedener Zelllinien.....	50
6.1.3	Passagieren von Zellen.....	51
6.1.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	51
6.1.5	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofectamin <sup>TM</sup> -2000-Reagenz.....	51
6.1.6	Kultivierung embryonaler primärer Hippocampus-Neurone der Maus und Herstellung eines neuronalen Proteinlysates.....	52
6.1.7	Kultivierung primärer Astrozyten postnataler Mäuse und Herstellung eines Astrozyten-angereicherten Proteinlysates .....	53
6.2	Isolierung hippocampaler Zellen der adulten Maus, Anreicherung verschiedener Zellpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation und Herstellung eines Proteinlysates .....	54
6.3	Immunfluoreszenz-Analysen.....	55
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
1.	Analyse der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus auf genomischer DNA-Ebene .....	57
1.1	Vorbemerkungen .....	57
1.2	Genotypisierung der Mäuse mittels Multiplex-PCR-Reaktion und Southern-Blot-Analyse .....	60
2.	Morphologische Analyse des Gehirns der Wildtyp- und der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mittels histologischer Hämatoxilin-Eosin-Färbungen .....	63
3.	Vergleich des Genexpressionsprofils im Hippocampus der Wildtyp- und der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus .....	65
3.1	Genexpressionsanalyse im Hippocampus der Wildtyp- und der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mit Hilfe der Mikroarray-Technologie .....	65

3.2	Untersuchung der Expression des <i>Cd99l2</i> -Gens in der Wildtyp- bzw. $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Knockout-Maus mittels Real-Time-PCR und RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	66
4.	Analyse der $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Proteinexpression in verschiedenen Geweben der Wildtyp- und $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Knockout-Maus.....	70
4.1	Untersuchungen zur Expression des $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Proteins mit Hilfe des anti-SH3-Antikörpers.....	70
4.1.1	Immuncytochemische Analysen zur subzellulären Lokalisation von ektopisch exprimiertem $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> in CHO-K1-Zellen.....	70
4.1.2	Western-Blot-Analysen zum Nachweis der $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Defizienz in der $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Knockout-Maus.....	72
4.2	Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> (anti-CH-L).....	73
4.3	Analyse der gewebsspezifischen Expression von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> mit Hilfe des anti-CH-L-Antikörpers.....	75
4.3.1	Untersuchung der $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Expression in verschiedenen Gewebelysaten der adulten sowie der embryonalen Wildtyp- und $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Knockout-Maus mittels Western-Blot.....	76
4.3.2	Affinitätsaufreinigung des Antikörperserums und Analyse des aufgereinigten anti-CH-L-Antikörpers.....	77
4.3.3	Untersuchung der Expression von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> in verschiedenen Hirnregionen.....	79
4.3.4	Histochemische Analysen zum Nachweis der zellulären Lokalisation von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> in verschiedenen Geweben.....	80
4.3.5	Charakterisierung des gegen $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> gerichteten anti-CH-L-Antikörpers mittels Immunfluoreszenz-Analysen.....	83
5.	Identifizierung von neuen $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Spleißvarianten mittels RT-PCR und Sequenzierung von EST-Klonen.....	85
5.1	RT-PCR-Analysen an Gesamt-RNA aus dem Hirn der Maus und Sequenzanalyse von murinen EST-Klonen zur Identifizierung von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Spleißvarianten.....	85
5.2	Nachweis der putativen 83 kDa $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Isoform mittels Western-Blot.....	87
6.	Analyse der zelltypspezifischen Lokalisation des $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Proteins im Gehirn ....	89
6.1	Untersuchung der Expression von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> in verschiedenen hirnspezifischen Zellpopulationen.....	89
6.1.1	Anreicherung adulter hippocampaler Neuronen der Maus mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	89
6.1.2	Anreicherung embryonaler primärer hippocampaler Neuronen der Maus durch zelltypspezifische Kultivierung und Analyse der zellulären Lokalisation von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> .....	92
6.1.3	Kultivierung von Astrozyten zur Analyse der zellulären Lokalisation von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> .....	94
6.2	Analyse der Verteilung von $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> in synaptischen Membranfraktionen des Gehirns der Wildtyp- und $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -Knockout-Maus.....	96
7.	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung zur Bestimmung der subzellulären Verteilung der $\alpha$ <i>Pix/Arhgef6</i> -mRNA in embryonalen hippocampalen Neuronen.....	98

7.1	Herstellung einer $\alpha Pix/Arhgef6$ -spezifischen Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde .	98
7.2	RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierung an hippocampalen Neuronen von Wildtyp-Embryonen	100
8.	Analyse der Aktivität von Rac1 und Cdc42 in der Wildtyp- und der $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout Maus mittels Rac/Cdc42-Pull-Down-Experimenten .....	103
<b>V.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>108</b>
1.	Die $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus zeigt keinen offensichtlich auffälligen Phänotyp..	108
2.	Die mit Hilfe der Mikroarray-Technik identifizierte differentielle Expression des <i>Cd99l2</i> -Gens konnte durch unabhängige Methoden nicht bestätigt werden .....	108
3.	$\alpha Pix/Arhgef6$ ist in verschiedenen Geweben der Maus nachweisbar.....	111
3.1	$\alpha Pix/Arhgef6$ ist in T- und B-Lymphozyten nachweisbar .....	112
3.2	Von $\alpha Pix/Arhgef6$ existieren verschiedene gewebespezifische Isoformen.....	115
4.	$\alpha Pix/Arhgef6$ wird in verschiedenen Zelltypen des Gehirns exprimiert.....	116
4.2	Das $\alpha Pix/Arhgef6$ -Protein ist auch in nicht-neuronalen Zellen des Gehirns, den Astrozyten, nachweisbar.....	119
4.3	$\alpha Pix/Arhgef6$ ist wahrscheinlich ein Protein der postsynaptischen Dichte.....	121
5.	Im Hippocampus der $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus wurde eine verminderte Menge an aktivem Rac1 und Cdc42 nachgewiesen.....	126
6.	Die $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus zeigt eine verminderte LTP sowie spezifische Verhaltensauffälligkeiten und dient somit als Modell für eine Form der XLMR.....	130
<b>VI.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>135</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
αPIX	“αPAK interacting exchange factor “
βPIX	“βPAK interacting exchange factor “
A	Absorption
A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AraC	Cytosine-β-D-Arabinofuranoside
ARHGEF6	“alpha rho guanine nucleotide exchange factor 6”
BAA	Bisacrylamid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	“bovine serum albumine” (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CA1-3	Regionen des Ammonshorn (Cornu ammonis) im Hippocampus
Cbl	Bindungspartner von ARHGEF6/αPIX, “Casitas B-lymphoma”
CC	„coiled coil“ (Proteindomäne)
cDNA	„copy“-Desoxyribonukleinsäure“ (komplementäre DNA)
Cdc42	Zellteilungszyklus-(„cell division cycle“) Protein 42
CH	„calponin homology“ (Proteindomäne)
CHO	Adhärente Fibroblasten aus dem Ovarium des Chinesischen Hamsters
CNPase	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
COS-7	Fibroblasten-ähnliche Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze
Cool-2	„cloned out of library-2“ (anderer Name für ARHGEF6)
Cpm	counts per minute
cRNA	„copy“-Ribonukleinsäure (komplementäre RNA)
CT-Wert	threshold cycle
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
Cy3	Cyanin3
DAB	Diaminobenzidin
Dbl	„diffus B-cell lymphoma“ (Onkogener Säuger-GEF)
dATP	desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	desoxy-Cytosin-Triphosphat
dGTP	desoxy-Guanosin-Triphosphat
DH	„Dbl homology“ (Proteindomäne)
DIG	Digoxygenin
DMEM	“Dulbecco´s Modified Eagle Medium” (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dUTP	desoxy-Uracil-Triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ES	embryonale Stammzellen
EST	expressed sequence tag
et al.	und Andere (et altera)
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBS	„fetal bovine serum“ (fötales Rinderserum)
FC	„fold change“
FGD1	„faciogenital dysplasia“ (GEF für Cdc42)
FMR-Protein	fragile X mental retardation protein
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Guanin
GAP	„GTPase activating protein“ (GTPase aktivierendes Protein)
Gapdh	„Glycerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase“ (Haushaltsgen)
GBD	„Git1-binding domain“ (Proteindomäne)
GDI	„guanine nucleotide dissociation inhibitor“ GTPase bindendes Protein
GDP	Guanosin-5´-diphosphat
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“ (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor)
GFAP	Anti-Glial-Fibrillary Acidic Protein
GIT1	„G protein coupled receptor-kinase interactor1“ mit ARHGEF6 interagierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
H	Stunde („hour“)
HBSS	„Hank´s Balanced Salt Solution“ (gepufferte Salzlösung)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	„high pressure liquid chromatography“ (Chromatographieverfahren)
HRP	„horseradish peroxidase“ (Meerrettich-Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
ILK	„integrin-linked kinase“ (Integrin bindende Kinase)
IPTG	Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid
IQ	Intelligenzquotient
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
Kb	Kilobase
kDa	kilodalton
Km	Kanamycin
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria-Broth-Medium
L-LTP	späte Phase der Langzeitpotenzierung
LTP	Langzeitpotenzierung
m, cm, mm, µm, nm	Meter, Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mA	Milliamper
M	Mol
MAP2	„Microtubuli associated protein 2“
MEM	„Minimum Essential Medium“ (Zellkulturmedium)
MHC	„major histocompatibility complex“
Min	Minute
mol, mmol, µmol, pmol	Mol, Millimol, Mikromol, Pikomol
NP40	nichtionisches Detergenz P40
mRNA	„messenger-RNA“ (Boten-Ribonukleinsäure)
MR	mentale Retardierung
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
neo	Gen für Neomycinresistenz

NS-XLMR	nicht-syndromale XLMR
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
OPHN1	„Oligophrenin 1“ (Rho-GAP Protein)
p21	GTPase-Protein mit ca. 21 kDa Molekulargewicht
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK	„p21 activated kinase“ p21 aktivierte Kinase
PC12-Zellen	Ratten-Phäochromcytom-Zellen
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PFA	Paraformaldehyd
PH	„pleckstrin homology“ (Proteindomäne)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease-Inhibitor)
PSD	postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rac	Protein mit GTPase-Aktivität („similar to ras-related C3 botulinum toxin substrate 1“)
Ras	GTPase, die in Ratten Tumore vom Sarcom-Typ induziert („rat sarcoma“)
Rho	Protein mit GTPase-Aktivität („Ras homology“)
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
RNAse	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“)
Sek.	Sekunden
SOS	“son of sevenless“ (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor)
Std.	Stunden
SH3	„Src homology“ (Proteindomäne)
S-XLMR	syndromale XLMR
T	Thymin
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung („Tris-buffered saline“)
TBST	TBS + Tween 20
T <sub>c</sub>	cytotoxische T-Zellen oder CD8-Zellen
TCR	T-cell receptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen oder CD4-Zellen
Trio	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor („triple functional domain“)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monomolaurat
U	Enzymeinheiten, „Units“ enzymatische Aktivität
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
WB	Westernblot
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
WT	Wildtyp
XLMR	X-chromosomal vererbte mentale Retardierung („X-linked mental retardation“)
+Y	Wildtypmaus
-Y	αPix/Arhgef6-Knockout-Maus
ZNS	zentrales Nervensystem

## I. Zusammenfassung

Die X-chromosomal vererbte, unspezifische geistige Behinderung (XLMR) ist eine sehr heterogene Erkrankung, für die bis heute 26 Gene identifiziert wurden. Bemerkenswerterweise gehören hierzu fünf Gene (*PAK3*, *OPHN1*, *ARHGEF9*, *FGD1* und  $\alpha$ *PIX/ARHGEF6*), deren Genprodukte an unterschiedlichen Stellen in den Rho GTPase Zyklus eingreifen. Rho GTPasen sind kleine molekulare Schalter in der Zelle und kommen in einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vor. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), zu denen auch  $\alpha$ *PIX/ARHGEF6* gehört, beschleunigen den Austausch von GDP nach GTP und vermitteln somit die Aktivierung der GTPasen. Im Gegensatz dazu stimulieren GTPase aktivierende Proteine (GAPs) die GTP-Hydrolyse und überführen GTPasen auf diese Weise in den inaktiven Zustand. Seit einigen Jahren ist bereits bekannt, dass die Aktivität von Rho GTPasen, insbesondere von RhoA, Rac1 und Cdc42, für eine normale neuronale Entwicklung entscheidend ist. So beeinflusst der Aktivitätszustand der Rho GTPasen das Wachstum und die Wegfindung von Axonen, die Entstehung von Synapsen sowie die Ausbildung dendritischer Dornen.

Tiermodelle, insbesondere Knockout-Mäuse, können maßgeblich dazu beitragen, die Pathomechanismen menschlicher Erbkrankheiten im Detail aufzuklären. Für den menschlichen Phänotyp der unspezifischen XLMR existieren bis heute nur wenige Mausmodelle. Aus diesem Grund wurde in Vorbereitung für diese Arbeit eine  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Knockout-Maus hergestellt, die im Rahmen dieser Arbeit und in wissenschaftlichen Zusammenarbeiten mit internationalen Arbeitsgruppen näher charakterisiert werden sollte.

Zunächst wurde ein geeigneter Antikörper gegen  $\alpha$ *Pix/Arhgef6* hergestellt, mit dem der Nachweis einer starken Expression des „full length“  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Proteins in Milz und Thymus adulter und embryonaler Wildtyp-Mäuse gelang. Im Gegensatz dazu war das  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Protein in Leber, Niere, Muskel und Herz der ausgewachsenen Wildtyp-Maus vergleichsweise schwach detektierbar. Durch die Abwesenheit des  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Proteins in den entsprechenden Proteinlysaten der  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Knockout-Maus konnte die erfolgreiche Generierung dieses Tiermodells nicht nur auf DNA- sondern auch auf Proteinebene bestätigt werden. Darüber hinaus wurden erstmals sechs unterschiedlich große  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Isoformen in verschiedenen Geweben adulter und embryonaler Wildtyp-Mäuse nachgewiesen, und es gelang auch die Charakterisierung einer Spleißvariante. Nach erfolgreicher biochemischer Aufreinigung des  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-spezifischen Antikörpers konnte das „full length“

$\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein sowohl im Gesamthirn als auch im Hippocampus und Cortex adulter Wildtyp-Mäuse nachgewiesen werden. Mit Hilfe spezieller Kultivierungsmethoden wurden verschiedene murine Zelltypen des Hippocampus *in-vitro* angereichert, wodurch schließlich der Nachweis der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im hippocampalen Neuronenlysat und im Astrozyten-spezifischen Proteinlysat gelang.

Unabhängig davon wurde die neuronale Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 mit Hilfe der nichtradioaktiven RNA-*in-situ*-Hybridisierung bestätigt. Mit der Identifizierung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der postsynaptischen Dichte dendritischer Dornen und der synaptosomalen Fraktion kann eine Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 bei der neuronalen Morphogenese, unter anderem von dendritischen Dornen, vermutet werden.

Mit Hilfe der Mikroarray-Analyse sollte nach differentiell exprimierten Genen in der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus im Vergleich zum Wildtyp-Tier gesucht werden. Es konnte ein unterschiedlich exprimiertes Gen, *Cd99l2*, identifiziert werden, das im Hippocampus der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizienten Maus nur halb so stark exprimiert war wie im normalen Tier. Mit Hilfe von Real-Time-PCR und RNA-*in-situ*-Hybridisierung konnte allerdings die differentielle Genaktivität von *Cd99l2* nicht bestätigt werden, und es wird vermutet, dass die im Mikroarray-Experiment erhaltenen Daten in diesem Fall zu einem falsch positiven Ergebnis geführt haben.

Die bisher gezeigte *in-vitro* Aktivität von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 als GEF für die beiden GTPasen Rac1 und Cdc42 ließ einen verminderten Aktivitätszustand von Rac1 und Cdc42 in  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen vermuten. Durch Pull-Down-Experimente konnte in der Tat gezeigt werden, dass sowohl in Gesamthirn- als auch Hippocampuslysaten von  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen die Menge an aktivem, GTP-gebundenem Rac1 bzw. Cdc42 um jeweils etwa 20% geringer war als die in Wildtyp-Mäusen. Hiermit gelang erstmals der *in-vivo* Nachweis der GEF-Aktivität des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins.

Im Rahmen von wissenschaftlichen Zusammenarbeiten wurde darüber hinaus bei der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus eine veränderte Morphologie der pyramidalen hippocampalen Dendriten, eine erhöhte Dichte an reifen dendritischen Dornen, eine verminderte LTP (*long term potentiation*)-Induktion sowie eine beeinträchtigte Verarbeitung räumlicher Informationen und ein gestörtes emotionales Verhalten festgestellt. Zusammen mit den aus dieser Arbeit erzielten Daten können hieraus wichtige Erkenntnisse für die pathomechanistischen Grundlagen einer Form der X-chromosomal vererbten, mentalen Retardierung gewonnen werden, die wesentlich zum besseren Verständnis dieses Erkrankungsbildes beim Menschen beitragen.

## II. Einleitung

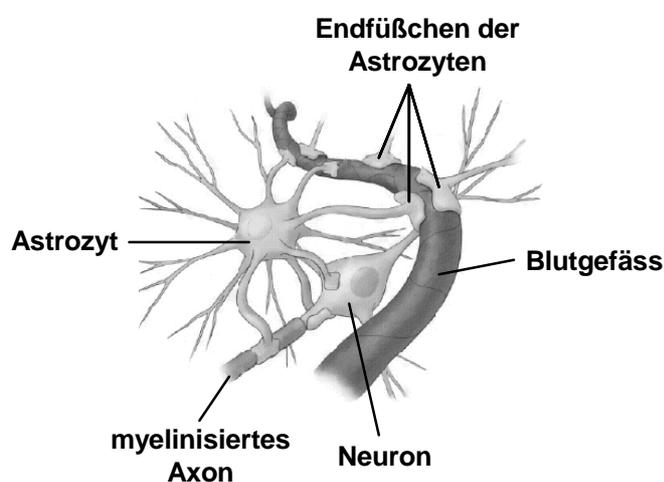
### 1. Das Nervensystem

Die beiden am häufigsten im Gehirn vorkommenden Zelltypen sind Gliazellen und Neuronen. Die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Zelltypen spielen eine bedeutende Rolle für die Regulation der Entwicklung und der Plastizität des Zentralnervensystems (ZNS).

#### 1.1 Gliazellen und Neuronen des Gehirns

Die beiden am häufigsten im Gehirn vorkommenden Zelltypen sind **Gliazellen** und **Neuronen**. Als Glia werden alle nicht-neuronalen Zellen des Nervensystems bezeichnet, welche in Makro- und Mikroglia unterteilt werden. Die Makroglia umfassen Astrozyten und Oligodendrozyten, während als Mikroglia die Gehirnmakrophagen bezeichnet werden.

Die **Astrozyten** bilden die Mehrheit der Gliazellen im zentralen Nervensystem von Säugetieren und werden deshalb auch Astroglia genannt. Mit ihren zahlreichen sternförmig abgehenden Fortsätzen durchsetzen sie das gesamte zentralnervöse Gewebe und nehmen dabei eine wichtige Stützfunktion wahr. Astrozyten sind polare Zellen; ihre Fortsätze nehmen einerseits Beziehung zu den Neuronen auf, andererseits umhüllen sie die Kapillargefäße. Somit bilden sie ein wichtiges strukturelles Element der Blut-Hirnschranke (Abbott et al. 2006). Sie versorgen Neuronen so mit Nährstoffen aus den Kapillaren und transportieren neuronale Abfallstoffe zu den Kapillaren zurück (Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines Astrozyten, eines Neurons und einer Blutkapillare im Gehirn**

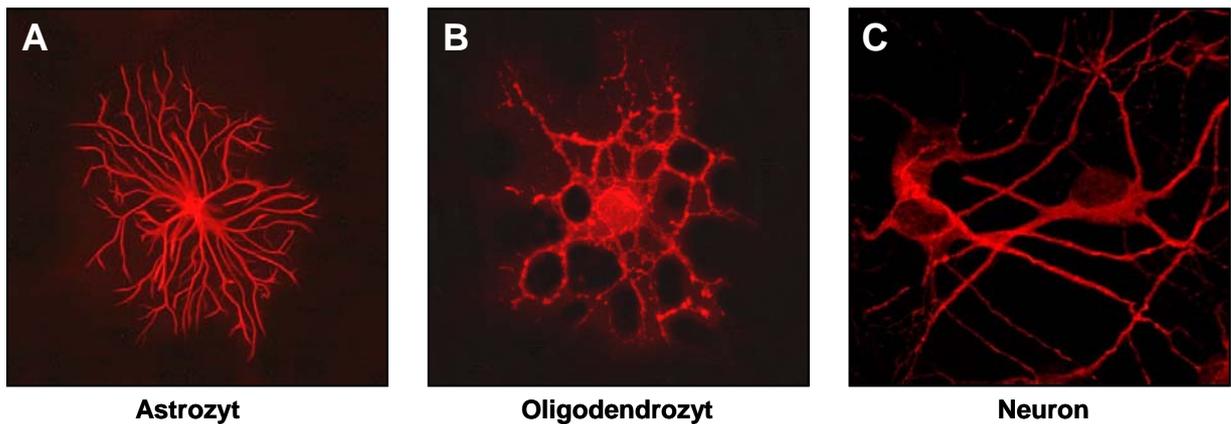
Die Versorgung der Neuronen mit Nährstoffen und die Entsorgung von Abfallprodukten sind essentiell für die neuronale Aktivität im Gehirn. Dazu bedeckt der Astrozyt die Blutkapillare vollständig mit seinen Endfüßen und steht auf der anderen Seite mit einem Neuron in Kontakt. Die Versorgung der Neuronen erfolgt von den Kapillaren über die Astrozyten. Angefallene Abfallstoffe werden von den Neuronen über die Astrozyten zurück zu den Kapillaren geführt.

Durch die Beeinflussung von Transportvorgängen erhalten Astrozyten die Homöostase des extrazellulären Milieus aufrecht (Barres et al. 1989; Chesler und Kraig, 1987). Zudem nehmen sie überschüssige Neurotransmitter auf und haben so eine wichtige Funktion in der Signalvermittlung zwischen Neuronen (Murphy und Pearce 1987; Deschepper 1998). Die Astrozytenfortsätze können durch ihre mechanische Plastizität die Größe der Synapsenoberfläche vergrößern oder verkleinern und dadurch den selektiven Transfer von Neurotransmittern von einem Neuron zum anderen beeinflussen. Durch diesen Einfluss auf die Übertragungsstärke von Synapsen könnten die Astrozyten maßgeblich an der Entstehung synaptischer Plastizität und somit an Lernprozessen beteiligt sein (Ullian et al. 2004).

Im Vergleich zu den Astrozyten sind **Oligodendrozyten** graziler und bilden weniger Fortsätze aus (Abb. 2A und B). Ihre Fortsätze bilden Markscheiden aus Myelin, welche die Axone umhüllen und so elektrisch isolieren. Somit stellen Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem das Äquivalent zu den Schwann'schen Zellen der peripheren Nerven dar. Weiterhin kommt ihnen eine Funktion bei der Ernährung und der mechanischen Stabilisierung der Neuronen zu.

Die dritte Gliazellart sind die **Mikrogliazellen**, die in verhältnismäßig geringer Anzahl vorkommen und die größten Formvariationen aller Zellen aufweisen. Mit ihrer Makrophagen-ähnlichen Funktion sind sie zur Phagozytose von zerstörtem Gewebe befähigt und stellen somit das eigentliche zelluläre Abwehrsystem des ZNS dar.

Die **Neuronen** bilden die grundlegende Einheit des gesamten Nervensystems (Abb. 2C). Das Gehirn enthält viele Milliarden Neuronen, die durchschnittlich mit je  $10^4$  bis  $10^5$  anderen Neuronen Kontakte ausbilden. Sie liegen in der grauen Substanz des zentralen Nervensystems und sind entweder diffus verteilt oder zu mehr oder weniger scharf begrenzten Gruppen zusammengefasst. Die grundlegende Funktion von Neuronen liegt in der Weiterleitung, Speicherung und Verarbeitung von Informationen, die sie als elektrische oder chemische Signale erhalten. Für die Bewältigung solcher Aufgaben sind die Neuronen anatomisch hochspezialisiert. Die Dendriten bilden zusammen mit dem Axon die Fortsätze des Neurons. Dendriten sind stark verzweigte, cytoplasmatische Zellausläufer, welche Signale erhalten und weiterverarbeiten. Als das Axon wird ein langer, faserartiger Fortsatz des Neurons bezeichnet, der die eingehenden Signale als Aktionspotentiale in Richtung seines mitunter baumartig verzweigten Endes weiterleitet und auf andere Zellen überträgt.



**Abb. 2: Darstellung verschiedener Zelltypen aus dem Hippocampus der Maus mittels Immunfluoreszenz**

Kultivierte hippocampale Zellen einer 3 Tage alten Wildtyp-Maus wurden 8 Tage nach der Präparation mit entsprechenden zelltypspezifischen primären Antikörpern und einem Cy3-konjugiertem sekundären anti-Maus-Antikörper sichtbar gemacht. Dargestellt ist ein Astrozyt (**A**, anti-GFAP-Antikörper) und ein Oligodendrozyt (**B**, anti-CNPase-Antikörper). In (**C**) sind zwei sich kreuzende Neuronen gezeigt (anti-Neuromodulin-Antikörper).

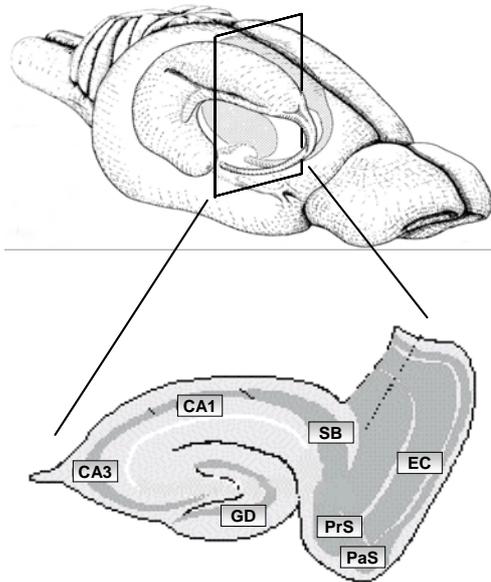
Die Signalweitergabe von einer Zelle zur nächsten geschieht an morphologisch speziell ausgebildeten Kontaktstellen, den Synapsen. Innerhalb der Nervenzellen wird Information durch Aktionspotentiale fortgeleitet. Den Synapsen kommt für die Übermittlung von Informationen eine besondere Bedeutung zu. Die präsynaptischen Axonendigungen (*Boutons*) enthalten mit Transmittern gefüllte Vesikel, welche bei Eintreffen eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Durch die Bindung an Rezeptoren der postsynaptischen Membran wird eine Impulsübertragung auf nachgeschaltete Zellen ausgelöst. Im Laufe der Entwicklung werden neuronale Verschaltungen im Gehirn organisiert, die zur Ausformung synaptischer Schaltkreise führen und eine entscheidende Rolle für die Erhaltung wichtiger Funktionen des Nervensystems spielen.

## 1.2 Der Hippocampus

### 1.2.1 Struktureller Aufbau des Hippocampus

Der Hippocampus ist der auf der Medialseite des Temporallappens paarig angelegte Teil des Telencephalons (Großhirn) (Abb. 3). Topographisch und funktionell gehört der Hippocampus zum limbischen System, dessen Funktion in der Übermittlung von Emotionen und in der Gedächtnisbildung liegt. Darüber hinaus kommt dem Hippocampus eine besondere Rolle bei der Verarbeitung räumlicher Informationen zu. Versuche mit Nagetieren ergaben, dass eine Läsion des Hippocampus zu ver-

schlechtertem Lernverhalten bei Labyrinthversuchen führt (Morris et al. 1982; Morris et al. 1990).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Hippocampus der Maus**

Schematisch dargestellt ist die dreidimensionale Lage des Hippocampus im Gehirn der Maus (oben) und die Hippocampus-Formation als zweidimensionaler Querschnitt (unten). Der Hippocampus ist eine korticale Struktur, der bei Nagetieren beide Hemisphären von rostral nach kaudal entlang einer C-förmig gekrümmten Achse durchzieht und einen großen Teil des Cortex einnimmt. Die hippocampale Formation setzt sich zusammen aus dem Ammonshorn (*Cornu ammonis*, bestehend aus den Regionen CA1-3), *Gyrus dentatus* (GD), *Subiculum* (SB), *Präsubiculum* (PrS), *Parasubiculum* (PaS) und entorhinalem Cortex (EC). (modifiziert nach Amaral 1995 und Witter et al. 2000).

Die hippocampale Formation umfasst sechs verschiedene Regionen: den *Gyrus dentatus*, das *Subiculum*, *Präsubiculum* und *Parasubiculum*, den entorhinalen Cortex sowie das Ammonshorn (*Cornu ammonis*), das nochmals in die Regionen CA1 bis CA3 unterteilt wird (Abb. 3 und 4). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden nur der *Gyrus dentatus* und das Ammonshorn als Hippocampus bezeichnet. Dieser besteht aus jeweils einer Schicht Prinzipalneuronen, die wiederum in die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* und die Pyramidenzellen des Ammonshorns unterteilt werden. In diesen Zellschichten sind die Zellkörper der Neuronen zusammengefasst. Dadurch wird ihnen eine scharf begrenzbare Struktur von zwei ineinander verschränkten U-förmigen Neuronenstreifen verliehen, die an die Form eines Seepferdchens (*hippocampus*) erinnern. An diese Zellen angrenzend verlaufen in den oberhalb (*stratum oriens*) und unterhalb (*stratum molekulare*) liegenden Schichten ihre Dendriten und Axone. Zahlreiche Interneuronen sind außerdem in allen Schichten vertreten. Die beschriebenen Prinzipalneurone erzeugen miteinander einen sogenannten trisynaptischen Kreislauf, der den Hauptverschaltungsweg innerhalb des Hippocampus bildet (Birbaumer et al. 2000).

Nach heutiger Vorstellung werden neu zu verarbeitende Informationen, beispielsweise nach einem Lernvorgang, zunächst im Hippocampus gespeichert und nach und nach in neocorticale Bereiche transferiert (Greenough und Bailey 1988; Bliss und Collingridge 1993; Birbaumer 2000). Bei Lernprozessen übernimmt der Hippocampus somit eine Art Verteilerfunktion von Lerninhalten und spielt eine wichtige Rolle bei der Konsolidierung von Gedächtnisinformationen, also der Überführung von Ge-

dächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis. Beispielsweise führt eine beidseitige Zerstörung des Hippocampus beim Menschen zum Verlust der Fähigkeit, Neues zu erlernen und neue Erinnerungen zu formen. Der Patient kann sich zudem nicht an Dinge erinnern, welche er unmittelbar vor der Zerstörung des Hippocampus lernte. Das Langzeitgedächtnis bleibt jedoch unverändert (Scoville und Milner 1957).

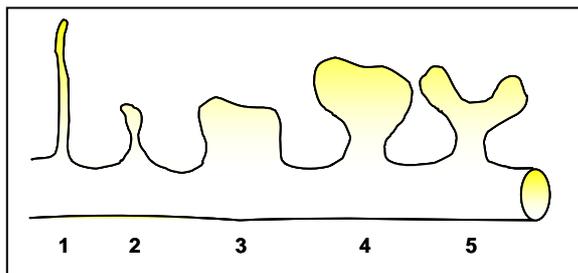
### **1.2.2 Die Langzeit-Potenzierung im Hippocampus – zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis**

Lernen und Gedächtnisbildung sind nur möglich in Hirnstrukturen, in denen Neuronen die Fähigkeit besitzen, die Effizienz ihrer synaptischen Kontakte zu modifizieren (synaptische Plastizität). Für die Gedächtnisfunktion des Hippocampus bedeutet dies, dass die Pyramidenzellen der CA1-Region bei wiederholter, tetanischer Reizung das Phänomen der **Langzeit-Potenzierung (LTP)** zeigen. Dabei kommt es nach einer ersten Stimulation und einer bestimmten Größe der Reizantwort in den CA1-Pyramidenzellen bei erneuter Reizung gleicher Intensität noch nach vielen Wochen zu einer Verstärkung der Reizantwort. Die Synapsen haben also ihre Übertragungseigenschaft in einem „Lernprozess“ deutlich und anhaltend gesteigert. Die Langzeit-Potenzierung beschreibt den für die synaptische Plastizität verantwortlichen zellulären Mechanismus und ist ein allgemein anerkanntes zelluläres Modell für Formen des Lernens und des Gedächtnisses (Bliss und Collingridge 1993; Malenka und Nicoll 1999). Dieses Phänomen zeigt, dass Synapsen keine statischen Strukturen im Sinne einfacher Schalter sind, sondern sich durch Änderung ihrer Effektivität dynamisch an funktionelle Bedingungen anpassen können (Matus 2000). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung zu morphologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene führt. Davon sind vor allem die Dornfortsätze der Dendriten betroffen.

### **1.3 Dendritische Dornen sind besondere morphologische Spezialisierungen von Neuronen**

Viele Säugerneuronen, wie z.B. cerebelläre Purkinjezellen oder hippocampale Pyramidenneuronen, weisen auf den Dendriten kleine Ausstülpungen auf, die auch als **dendritische Dornen**, oder **spines** bezeichnet werden (Hering und Sheng 2001). Diese dendritischen Fortsätze wurden erstmals von Ramón y Cajal (1891) beschrieben, der sie an den Dendriten Golgi-gefärbter Purkinjezellen entdeckte. Exzitatorische Synapsen werden im adulten Säugerhirn in über 90% zwischen Axonen und

dendritischen Dornen gebildet. Diese Dornen stellen somit die postsynaptischen Elemente exzitatorischer Synapsen dar. Anhand morphologischer Kriterien werden sie als filopodienartig („filopodia-like“), dünn („thin“), stummelförmig („stubby“), pilzförmig („mushroom-shaped“) oder verzweigt („branched“) beschrieben (Abb. 4). Die Dornen besitzen eine Länge von 1 bis 3  $\mu\text{m}$  und einen Durchmesser von weniger als 1  $\mu\text{m}$  (Kennedy et al. 2000). Entlang der Dendriten treten sie tausendfach auf, an reifen Neuronen in einer Dichte von 1-10 Dornen/ $\mu\text{m}$ , und führen somit zu einer enormen Vergrößerung der dendritischen Oberfläche (Sorra und Harris 2000).



**Abb. 4: Schematische Darstellung verschiedener Formen dendritischer Dornen**

Die morphologische Klassifizierung der dendritischen Dornen ist schematisch dargestellt. 1: filopodienartig, 2: dünn, 3: stummelförmig, 4: pilzförmig, 5: verzweigt.

Der Kopf der dendritischen Dornen beinhaltet die sogenannte **postsynaptische Dichte (PSD)**. Die PSD ist eine 30 nm breite elektronendichte Verdickung an der postsynaptischen Plasmamembran exzitatorischer Synapsen. Innerhalb der PSD befinden sich Rezeptoren und verschiedene funktionelle und Rezeptor-assoziierte Proteinnetzwerke, die untereinander verknüpft sind und der Aufnahme und Integration von synaptischen Signalen sowie deren Weiterleitung dienen. (Kirsch 1999; Walikonis et al. 2000; Kennedy 2000).

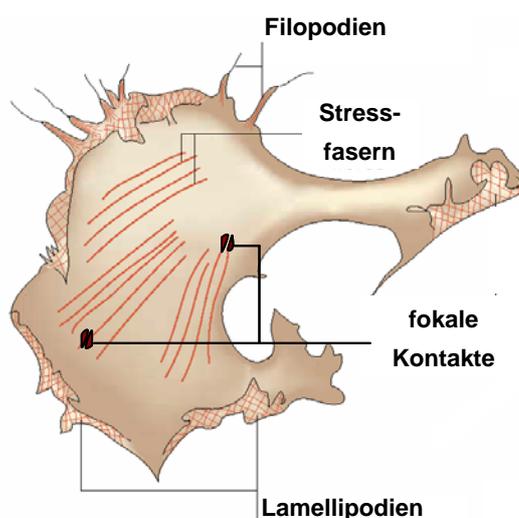
Als Vorgänger vieler dendritischer Dornen werden heute von zahlreichen Autoren sogenannte Filopodien angesehen, die als dünne und höchst motile Zellmembranausstülpungen aktiven Kontakt zu ausgewachsenen Axonen suchen (Ziv und Smith 1996; Dailey und Smith 1996; Fiala et al. 1998). Nach Kontaktaufnahme führt das Zusammenwirken zahlreicher Proteine und die Initiierung der damit verbundenen prä- und postsynaptischen Reaktionsketten zur Stabilisierung und Reifung des Axons und der Postsynapse (Zhang und Benson, 2000; Okabe et al. 2001). Im adulten Gehirn dominieren pilzförmige, reife Dornen (Dailey und Smith 1996; Collin et al. 1997; Fiala et al. 1998).

Dendritische Dornen enthalten hohe Mengen an filamentösem F-Aktin. Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt und Bestandteil des Zytoskelettes ist. In der Zelle bildet Aktin dynamische Aktinfilamente (F-Aktin), die sich im ständigen Umbau befinden und der Stabilisierung der äußeren Zellform sowie des intrazellulären Transportes dienen. Das Aktinzytoskelett nimmt für diverse Aufgaben der dendritischen Filopodien und der Dornen, wie die Balance zwischen Motilität und

Stabilität, ihr Wachstum oder die Verankerung von Rezeptoren in der PSD, eine bedeutende Rolle ein. Als potentielle Regulatoren für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts wurden Mitglieder der Rho-Familie, einer Gruppe von kleinen GTPasen, erkannt.

## 2. Rho GTPasen

Die Rho GTPasen ("Ras homology") bilden eine Untergruppe innerhalb der Ras-Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine mit Molekulargewichten von 20-40 kDa (McCormick, 1995). Bisher wurden 14 verschiedene Rho GTPasen beschrieben, wobei die Familienmitglieder Rac1, Cdc42 und RhoA am besten charakterisiert sind. Funktionell kommt diesen GTPasen eine große Bedeutung bei der Organisation und dem Umbau des Aktinzytoskeletts in allen eukaryotischen Zellen zu (Hall 1994; Narumiya et al. 1997; Tapon und Hall 1997; Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997). In Fibroblasten reguliert RhoA einerseits die Ausbildung von Aktinomyosinfasern (Stressfasern), die eine wichtige Rolle bei der Zellkontraktion spielen, andererseits ist die Aktivität von RhoA für die Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten verantwortlich, die für die Zell-Substrat-Adhäsion essentiell sind (Hall 1998). Dagegen führt die Aktivierung von Rac1 zur Bildung von Lamellipodien, das sind flache, netzartige Membranfortsätze, und zur Entstehung von Membranauffaltungen (Ridley et al. 1992). Cdc42 reguliert die Ausbildung von Filopodien, die als dünne, fingerartige Aktinfilamente an der Plasmamembran ausgebildet werden (Kozma et al. 1995; Nobes und Hall 1995a, b) (Abb. 5).



**Abb. 5: Verschiedene Organisationsformen von Aktinfilamenten in einer Fibroblastenzelle**

Schematisch dargestellt ist eine Fibroblastenzelle mit ihren verschiedenen Organisationsformen von Aktinfilamenten [verändert nach Luo, Nat Rev Neurosci 1:173-180 (2000)]. Aktin-haltige Strukturen sind in roter Farbe dargestellt. Filopodien, fingerförmige Strukturen, beinhalten parallel angeordnete Aktinfilamente. Die blattartigen Membranstrukturen stellen Lamellipodien dar, die durch ein dichtes Netzwerk an Aktin-Filamenten charakterisiert sind. Stress-fasern sind kontraktile Strukturen des Aktinzytoskeletts, die den gesamten Zellkörper durchziehen. Als fokale Kontakte werden die Bereiche genannt, welche den Kontakt mit der extrazellulären Matrix vermitteln.

## **2.1 Rho GTPasen sind an der Differenzierung von Neuronen und deren Zellfortsätzen beteiligt**

Das Aktinzytoskelett ist auch für die Funktionsfähigkeit des Nervensystems von entscheidender Bedeutung. Die polare Differenzierung von Neuronen in Dendriten und Axone ist eine Voraussetzung für eine geordnete neuronale Aktivität. Diese Vorgänge setzen eine hohe Dynamik der Zellform voraus, die auf einem komplexen und streng regulierten Umbau des Zytoskeletts, insbesondere der Aktin-Filamente, beruht. Die Rho GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA sind an der Steuerung der polaren Differenzierung und des Wachstums der Nervenzellen und ihrer Ausläufer (Neuritogenese) beteiligt (Sarner et al. 2000; Fujita et al. 2001; Aoki et al. 2004).

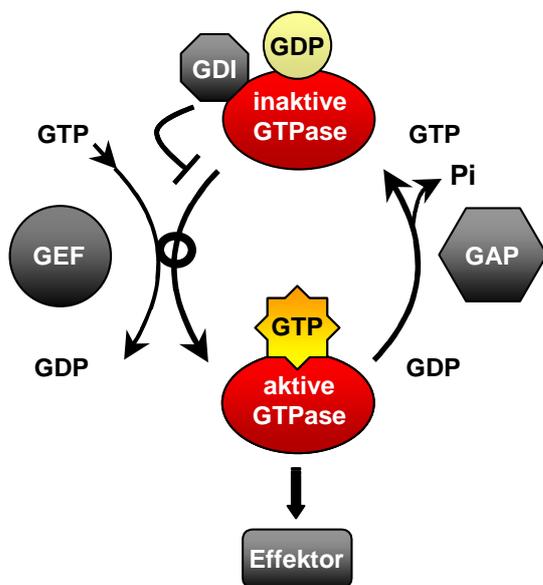
Auch bei der neuronalen Navigation spielen Rho GTPasen eine wichtige Rolle. Neuronen bilden an der Spitze des Axons einen Wachstumskegel, der über repulsive und attraktive Signale die Navigation des Axons bei der Projektion zu anderen Zellen hinsteuert. Die neuronale Navigation geschieht letztendlich durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts über die Aus- und Rückbildung von Filopodien und Lamellipodien, welche wiederum durch die Aktivität von Rac1, Cdc42 und RhoA gesteuert werden (Luo et al. 2000).

Zudem konnte einzelnen Mitgliedern der Rho GTPasen, RhoA und Rac1, eine Funktion bei der Regulation der Morphogenese Aktin-reicher dendritischer Dornen zugeordnet werden. So ist in transgenen Mäusen mit konstitutiv-aktiv exprimiertem humanem Rac1 die Anzahl dendritischer Dornen erhöht (Luo et al. 1996; Tashiro et al. 2000; Nakayama et al. 2000). Die konstitutive Aktivierung von RhoA führt hingegen zu einer Abnahme der Dichte und Länge dendritischer Spines (Nakayama et al. 2000; Tashiro et al. 2000; Pilpel und Segal 2004). Es wird angenommen, dass die antagonistische Wirkungsweise der beiden GTPasen für eine präzise Regulierung des Aktinzytoskeletts beispielsweise während der Bildung und Stabilität neuronaler Fortsätze und dendritischer Dornen notwendig ist (Govek et al. 2005).

## **2.2 Die Regulation von Rho GTPasen und ihre Wirkungsweise**

Rho GTPasen sind Proteine, die durch die alternierende Bindung von GDP oder GTP als molekulare Schalter innerhalb von Signaltransduktionsketten fungieren (Hall 1998). Sie liegen entweder in einer aktiven, GTP-gebundenen oder in einer inaktiven, GDP-gebundenen Form vor. Diese beiden Zustände können zum GTPase-Zyklus verbunden werden (Abb. 6). Das Umschalten von der aktiven zur inaktiven Form und umgekehrt wird von drei unterschiedlichen Typen von Regulatorproteinen beeinflusst

(Boguski und McCormic 1993; Symons und Settleman 2000). Der Wechsel von GDP- zu GTP-gebundener Form und damit die Überführung in den aktiven Zustand der GTPasen wird durch **Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs: guanine nucleotide exchange factors)** katalysiert. Die Bindung von GTP hat eine Konformationsänderung des Proteins zur Folge, wodurch die Wechselwirkung mit spezifischen Zielproteinen ermöglicht wird (Stouten et al. 1993). Zu den am besten charakterisierten Zielproteinen von Cdc42 und Rac1 zählen die **p21-aktivierten Kinasen 1-3 (PAK1-3: p21 activated kinase)** (Daniels et al. 1998; Bokoch 2003). **GTPase-aktivierende Proteine (GAPs: GTPase activating proteins)** beschleunigen die Überführung der GTP-gebundenen in die GDP-gebundene Form, indem sie die intrinsische GTPase-Funktion verstärken und somit die Hydrolyse von GTP zu GDP beschleunigen. In ihrer GDP-gebundenen Form liegen Rho GTPasen im Komplex mit **Guanin-Nukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs: guanine nucleotide dissociation inhibitor)** vor. Diese blockieren den Austausch von GDP zu GTP, indem sie die Interaktion zwischen Rho GTPasen und GEFs verhindern.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des Rho-GTPase-Zyklus**

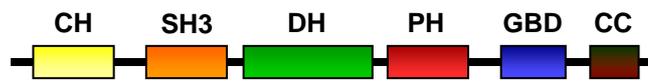
Rho GTPasen (rote Kreise) wechseln zwischen einer aktiven GTP-gebundenen und einer inaktiven GDP-gebundenen Konformation. Die biologische Aktivität des molekularen Schalters wird durch Regulatorproteine beeinflusst. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs, graue Kreise) stimulieren den Austausch von GDP (Guanosin-5'-diphosphat) nach GTP (Guanosin-5'-triphosphat). Im aktiven Zustand interagieren Rho GTPasen mit einem Effektor-Protein (graues Viereck), wodurch ein intrazelluläres Signal weitergeleitet wird. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs, graues Sechseck) beschleunigen die Hydrolyse von GTP nach GDP und überführen das Protein in die inaktive Form. Der inaktive Zustand wird durch GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDI, graues Achteck) stabilisiert.

### 3. $\alpha$ PIX/ARHGEF6: ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für die Rho GTPasen Cdc42 und Rac1

#### 3.1 Domänenstruktur von $\alpha$ PIX/ARHGEF6

**ARHGEF6** („alpha rho guanine nucleotide exchange factor 6“) codiert ein Protein, welches in der Literatur als  $\alpha$ PIX („ $\alpha$ PAK interacting exchange factor“) oder **Cool-2** („cloned out of library-2“) beschrieben wird und zur Familie der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) für Rho Proteine gehört. Der erste Säuger-GEF wurde ursprünglich als Onkogen aus einem diffusen B-Zell-Lymphom isoliert und entsprechend *diffuse B-cell lymphoma* (**Dbl**) benannt (Eva und Aaronson 1985). Rho GEFs gehören fast ausnahmslos zur Dbl-Familie, welche heute mehr als 60 bekannte, multifunktionale Proteine umfasst (Schmidt und Hall 2002). Sie sind für die Weiterleitung diverser intrazellulärer Signale verantwortlich, die zur Aktivierung von Rho GTPasen führen (Zheng 2001; Schmidt und Hall 2002).

Wie alle GEFs besteht auch  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 aus mehreren funktionellen Domänen (Abb. 7).



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6**

Die funktionellen Proteindomänen sind als Kästen dargestellt. (CH/  calponin homology; SH3/  : Src homology 3; DH/  : Dbl homology; PH/  : pleckstrin homology; GBD/  : GIT1-binding domain; CC/  : coiled coil).

$\alpha$ PIX/ARHGEF6 besitzt eine nach dem Prototyp Dbl benannte **DH-Domäne** („Dbl-homology“) und eine C-terminal benachbarte **PH-Domäne** („pleckstrin homology“). Die beiden als katalytische Einheit fungierenden Domänen treten bei allen Rho GEFs als gemeinsames Strukturmotiv auf und sind für die Austauschaktivität notwendig (Hart et al. 1994). Durch die Bindung der PH-Domäne an Inositol-Phospholipide ist diese möglicherweise für die korrekte subzelluläre Lokalisation der GEFs verantwortlich (Cerione und Zheng 1996; Lemmon und Ferguson 2000).

N-terminal von der DH-Domäne weist  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 eine **SH3-Domäne** („Src homology 3“) auf. Bei SH3-Domänen handelt es sich um Proteininteraktionsmodule, welche klassischerweise an prolinreiche Sequenzen anderer Proteine binden. Im Fall von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 ist die SH3-Domäne für die Interaktion mit PAK (Manser et al. 1998; Bagrodia et al. 1998) bzw. Cbl („Casitas B-lymphoma“) (Flanders et al. 2003; Wu et al. 2003) notwendig. Vor kurzem wurde gezeigt, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 mit Calpain 4, der kleinen regulatorischen Untereinheit der Protease Calpain, interagiert

und das Modul bestehend aus den Domänen SH3-DH-PH für diese Bindung notwendig ist (Rosenberger et al. 2005).

Am N-Terminus von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 befindet sich eine singuläre **CH-Domäne** („calponin homology“). Generell besitzen Proteine mit tandemförmig angeordneten CH-Domänen die Fähigkeit, F-Aktin zu binden (Gimona et al. 2002). Die F-Aktin-Bindfähigkeit einer einzelnen CH-Domäne ist bisher noch nicht völlig geklärt, verschiedene Studien weisen aber darauf hin, dass sie als Motiv für Protein-Protein-Interaktionen dient (Leinweber et al., 1999; Groysman et al. 2000) und sie weiterhin durch die Ausübung eines autoinhibitorischen Mechanismus in die Regulation der Aktivität von GEFs involviert sein kann (Aghazadeh et al. 2000). Für  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 wurde kürzlich gezeigt, dass die CH-Domäne ein Bindemotiv für dessen Interaktionspartner  $\beta$ -Parvin darstellt und für die korrekte Lokalisation von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 innerhalb der Zelle wichtig ist (Rosenberger et al. 2003).

Weiterhin besitzt  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 eine C-terminal gelegene **GBD-Domäne** („GIT1-binding“). Durch sie wird die Interaktion mit **GIT1** („G protein-coupled receptor kinase interactor 1“), auch **CAT-1** („Cool-associated tyrosine phosphosubstrate 1“) genannt, vermittelt (Bagrodia et al. 1999, Turner et al. 1999). In der Zelle ist GIT1 unter anderem an der Regulation von fokalen Adhäsionen, das sind Kontaktstellen zwischen Zellen und Proteinen der extrazellulären Matrix, und an der Ausbildung von Dendritenausläufern und Synapsen beteiligt (Zhang et al. 2003; 2005).

Schließlich besitzt  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 an seinem C-Terminus eine **CC-Domäne** („coiled coil“). CC-Domänen vermitteln vermutlich durch die Tendenz zur Homo- und Heterodimerisierung die Komplexbildung mit anderen Proteinen, die ebenfalls eine solche Domäne aufweisen. Es wurde bereits gezeigt, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 mit  $\beta$ PIX/ARHGEF7 (Manser et al. 1998), ein zu  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 sehr homologes Protein, ein Heterodimer bildet. Für diese Interaktion ist die jeweilige CC-Domäne notwendig (Koh et al. 2001, Rosenberger et al. 2003).

### 3.2 $\alpha$ PIX/ARHGEF6-abhängige Signalwege

$\alpha$ PIX/ARHGEF6 ist in unterschiedliche Signalwege involviert (zusammengefasst in Rosenberger und Kutsche 2006). Ein  $\alpha$ PIX/ARHGEF6-abhängiger Signalweg soll im folgenden beispielhaft vorgestellt werden. Der Kontakt einer Zelle mit der extrazellulären Matrix führt bei den meisten Zelltypen zur Zellanhaftung an das Substrat und nachfolgend zur Ausbreitung der Zelle (**Zellausbreitung**). Bestimmte Transmembranproteine, **Integrine**, vermitteln hierbei den Substratkontakt. Durch diese

Zell-Matrix-Interaktionen kommt es zur Bildung von Anheftungstellen in der frühen Phase der Zellausbreitung bis hin zur Reifung in **fokale Adhäsionen** in vollständig ausgebreiteten Zellen. Die auf diesen Prozessen basierende Zellausbreitung ist somit Integrin-abhängig und erfordert dynamische Veränderungen des Aktinzytoskeletts (Rottner et al. 1999; Abbi und Guan 2002; Sepulveda und Wu 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass sich  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 stimulierend auf die Integrin-abhängige Zellausbreitung auswirkt, da die ektopische Expression von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 in einer vermehrten Bildung von Lamellipodien-ähnlichen Strukturen resultiert (Rosenberger et al. 2005).

Die als Interaktionspartner von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 identifizierten Proteine  $\beta$ -Parvin und Calpain 4 lokalisieren in fokalen Adhäsionskomplexen und üben eine Funktion in der Integrin-vermittelten Signaltransduktion und bei der Aufrechterhaltung der fokalen Komplexe aus (Potter et al. 1998; Yamaji et al. 2001; 2002). Die Kolo-kalisation von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 mit  $\beta$ -Parvin, ILK („integrin-linked kinase“), verschiedenen Calpain-Proteasen (Calpain 4,  $\mu$ -Calpain und m-Calpain) und  $\beta$ 1-Integrin in frühen Integrin-haltigen Komplexen, die sich direkt nach der Zellausbreitung bilden, deutet auf eine Beteiligung von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 an Integrin-abhängigen Signalwegen hin (Rosenberger et al. 2003, 2005). Eine Inhibierung der Integrin-vermittelten Zellausbreitung durch Calpain-Inhibitoren kann sowohl durch  $\alpha$ PIX/ARHGEF6-Wildtyp als auch durch eine GEF-defiziente Mutante aufgehoben werden (Rosenberger et al. 2005).

Diese Daten haben zu dem Modell geführt, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 an einem Integrin-abhängigen Signalweg und bei der Entstehung von fokalen Adhäsionen zu einem frühen Zeitpunkt der Zellausbreitung beteiligt ist.  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 stimuliert die Zellausbreitung vermutlich durch zwei unterschiedliche Signalwege. In einem GEF-abhängigen Weg führt die direkte Aktivierung der GTPasen Rac1 und Cdc42 zur Bildung von Lamellipodien und Filopodien, wodurch die Integrin-abhängige Zellausbreitung vorangetrieben wird. Ein zweiter GEF-unabhängiger Signalweg, in dem  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 als Adaptorprotein fungiert, ist von der Interaktion von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 mit Calpain abhängig und führt ebenfalls zur Zellausbreitung (Rosenberger et al. 2005).

Über die neurobiologische Funktion von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 ist so gut wie nichts bekannt, wohingegen über  $\beta$ PIX/ARHGEF7 wesentlich mehr Daten vorliegen.  $\beta$ PIX/ARHGEF7 wird durch den Bindungspartner GIT1 an Synapsen rekrutiert, wodurch es zu einer lokalen Aktivierung von Rac kommt. Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass die exakte Lokalisierung von  $\beta$ PIX/ARHGEF7 an

Synapsen, die Bildung eines  $\beta$ PIX/ARHGEF7/GIT1/Rac/PAK-Signalkomplexes und die GEF-Aktivität von  $\beta$ PIX/ARHGEF7 entscheidend für die korrekte Ausbildung von dendritischen Dornen und Synapsen sind (Zhang et al. 2003; 2005). Damit spielt  $\beta$ PIX/ARHGEF7 bei der Regulation der Morphologie von dendritischen Dornen und bei der Bildung von Synapsen eine wichtige Rolle. Dadurch, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 und  $\beta$ PIX/ARHGEF7 zueinander homolog sind, kann vermutet werden, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 in ähnliche Prozesse involviert ist.

### 3.3 Expression von $\alpha$ PIX/ARHGEF6

Für das humane  $\alpha$ PIX/ARHGEF6-Gen wurde bereits eine ubiquitäre Expression beschrieben (Manser et al. 1998). Das murine  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Gen ist ebenfalls ubiquitär exprimiert, wobei die stärkste  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression unter anderem in der Milz und eine vergleichsweise schwache Expression im Hirn der adulten Maus nachgewiesen wurde. In Embryonen sehr früher Entwicklungsstadien ist  $\alpha$ Pix/Arhgef6-RNA nachweisbar, weshalb eine Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der Embryonalentwicklung der Maus vermutet wurde (Kutsche und Gal 2001). Neuere Studien haben gezeigt, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 während der Embryonalentwicklung in den lateralen Ventrikeln sowie im III. und IV. Ventrikel des Gehirns exprimiert ist. Die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression im Hirn der adulten Maus ist hingegen wesentlich schwächer und beschränkt sich auf die CA3-Region des *Cornu ammonis* und auf Teile des *Corpus callosum* (Kohn et al. 2004). Der Nachweis des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins wurde bisher noch nicht erbracht.

Im Gegensatz zum  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Gen, von dem bisher noch keine Spleissvarianten bekannt sind, wurden bis heute fünf  $\beta$ Pix/Arhgef7-Spleissvarianten charakterisiert (Kim et al. 2000; Kim und Park 2001; Koh et al. 2001; Rhee et al. 2004). Drei dieser Spleissvarianten sind in spezifischen neuronalen Zellpopulationen des Cortex, Cerebellums und Hippocampus nachweisbar (Kim et al. 2000; Kim und Park 2001).

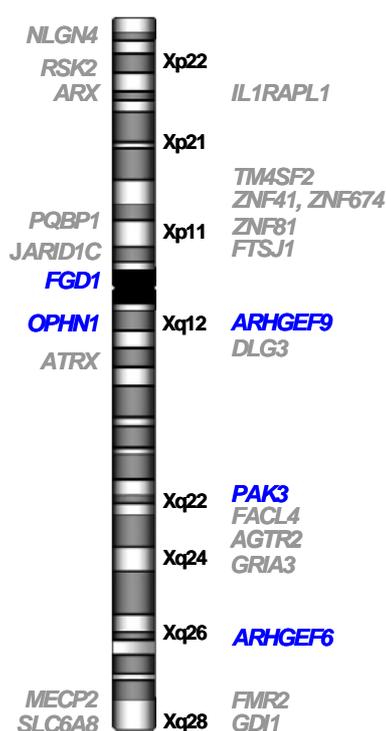
## 4. X-chromosomal vererbte, unspezifische mentale Retardierung (NS-XLMR)

Eine geistige Behinderung kommt bei etwa 3% der Bevölkerung vor und wird als ein Zustand verzögerter oder unvollständiger Entwicklung von geistigen Fähigkeiten mit einem Intelligenzquotienten unter 70 definiert (Chelly und Mandel 2001, Raymond 2006). Sie äußert sich in einem Rückstand von kognitiven, sprachlichen und sozialen

Fähigkeiten, auch durch Beeinträchtigung von Kontaktfähigkeit, Konzentration, Aufmerksamkeit, Gedächtnis sowie Problemlöseverhalten. Die leichte (IQ 50-70) und die moderate (IQ 35-49) Form der mentalen Retardierung (MR) treten dabei deutlich häufiger auf als die schwere (IQ 20-34) oder sehr schwere Form (IQ<20) (Raymond 2006). Die Ursachen für mentale Retardierung aller Schweregrade sind vielfältig. Neben mikroskopisch sichtbaren Chromosomenanomalien sind dies auch eine Reihe endogener und exogener Faktoren. Im Folgenden wird auf einige monogene Ursachen der MR eingegangen.

Die Beobachtung, dass eine mentale Retardierung bei männlichen Personen wesentlich häufiger als bei Frauen auftritt, führte zu der Schlussfolgerung, dass eine nicht unerhebliche Anzahl von Genen, welche eine Rolle bei der Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten spielen, auf dem X-Chromosom lokalisiert sind (Lehrke 1972). Die X-chromosomal vererbte, mentale Retardierung oder **XLMR** („X-linked mental retardation“) wird klinisch in die **syndromale** und die **nicht-syndromale** Form unterteilt. Die syndromale XLMR (**S-XLMR**) ist durch das Auftreten von zusätzlichen metabolischen oder neurologischen Symptomen und auch Dysmorphien, welche in Kombination mit der mentalen Retardierung auftreten, gekennzeichnet. Bei der nicht-syndromalen Form (**NS-XLMR**) werden neben der kognitiven Beeinträchtigung keine weiteren Auffälligkeiten beobachtet (Gecz und Mulley 2000; Ropers 2006).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden 25 nicht-syndromale MR-Gene auf dem X-Chromosom identifiziert, von deren Genprodukten angenommen wird, dass sie einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Gehirnentwicklung und -funktion ausüben (Ropers 2006) (Abb. 8).



**Abb. 8: Identifizierte Gene für die X-chromosomal vererbte, unspezifische mentale Retardierung**

Dargestellt ist das Idiogramm des X-Chromosoms. Die bis heute identifizierten NS-XLMR-Gene sind auf der rechten Seite des Idiogramms gezeigt. Gene, in denen Mutationen sowohl zur NS- als auch zur S-XLMR führen, sind auf der linken Seite genannt. Gene, deren Genprodukte in den Rho GTPase-Zyklus involviert sind, sind blau markiert.

Obwohl die genetischen Ursachen für eine NS-XLMR sehr heterogen sind, lassen sich dennoch einige der bisher identifizierten Gene entsprechend der Funktion ihrer Genprodukte gruppieren. Eine solche Gruppe bilden beispielsweise die Gene, *PAK3*, *OPHN1*, *ARHGEF9*, *FGD1* und *αPIX/ARHGEF6*, deren Genprodukte an unterschiedlichen Stellen des Rho GTPase-Zyklus eingreifen.

Die Aktivität von **PAK3**, einem Effektorprotein der GTPasen Rac1 und Cdc42, ist für die Steuerung zellulärer Prozesse wie Genexpression und Reorganisation des Aktinzytoskeletts notwendig (Bagrodia et al. 1999; Daniels und Bokoch 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PAK3 für die Neuritenbildung, die Regulierung der Morphologie dendritischer Dornen sowie für die Bildung von Synapsen von entscheidender Bedeutung ist (Daniels et al. 1998; Zhang et al. 2005).

**OPHN1** kodiert für ein Rho GAP-Protein, welches die GTP-Hydrolyseaktivität der GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 fördert. Es wird vermutet, dass OPHN1 bei der Morphogenese der dendritischen Dornen eine wichtige Rolle spielt (Fauchereau et al. 2003; Govek et al. 2004).

Das vom **ARHGEF9**-Gen kodierte Protein Collybistin ist ein Cdc42-spezifischer GEF, welcher als ein Interaktionspartner von Gephyrin identifiziert wurde (Kins et al. 2000). Gephyrin lokalisiert an der zytoplasmatischen Seite von glyzinerigen Synapsen und verbindet vermutlich inhibitorische Neurotransmitter-Rezeptoren mit dem subsynaptischen Zytoskelett (Kirsch und Betz 1995). Eine Funktion von Collybistin bei der Bildung von inhibitorischen Synapsen wird daher angenommen (Kneussel et al. 2001).

**FGD1**, ein GEF für Cdc42, ist für eine normale embryonale und skeletale Entwicklung essentiell (Zhang et al., 1995). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FGD1 an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt ist (Olson et al. 1996). Für die durch FGD1 induzierte Aktinpolymerisation und Bildung von Filopodien scheint neben der Aktivierung von Cdc42 auch die Interaktion mit Cortactin, einem Aktin-assoziierten und F-Aktin bündelnden Protein wichtig zu sein (Hou et al. 2003).

Bekanntes Daten zu **αPIX/ARHGEF6** sind in Kapitel 3 zusammengefasst.

Wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, sind Rho GTPasen für verschiedene Aspekte der neuronalen Morphogenese von entscheidender Bedeutung. Trotzdem sind die für die normale Entwicklung des ZNS wichtigen zellulären Mechanismen und die molekularen Ursachen der mentalen Retardierung bis heute kaum aufgeklärt. Durch die Identifizierung von Mutationen in NS-XLMR-Genen, deren Genprodukte an unterschiedlichen Stellen des Rho GTPase-Zyklus modulierend eingreifen, konnte jedoch die Annahme gestützt werden, dass eine Dysfunktion von Rac1- und Cdc42-abhängigen Signalwegen zur Beeinträchtigung einer normalen geistigen Entwicklung

führt. Zur Zeit werden die Ursachen einer mentalen Retardierung in einer Beeinträchtigung der Differenzierung von Neuronen sowie der Bildung funktioneller Synapsen gesehen. Weiterhin wird angenommen, dass die mentale Retardierung aus einer unreifen Form von dendritischen Dornen resultiert (Newey et al. 2005; Govek et al. 2005). Die genannten morphologischen Veränderungen könnten zu einer gestörten Prozessierung von Informationen führen und damit die kognitive Funktion beeinträchtigen.

In den vergangenen Jahren wurde anhand verschiedener Maus- und Zellkulturmodelle die Funktion der Genprodukte von solchen Genen, die nach Mutation zur mentalen Retardierung führen, untersucht. Die drastisch reduzierte Expression des *Ophn1*-Gens im Zellsystem führt zu einer reduzierten Länge dendritischer Dornen (Govek et al. 2004). In transgenen Mäusen, welche dominant-negatives PAK3 exprimieren, war die Dichte an dendritischen Dornen cortikaler Neuronen reduziert und gleichzeitig die Morphologie der Synapsen verändert. Zudem zeigten diese Mäuse eine Beeinträchtigung in der Konsolidierung von Langzeit-Erinnerungen (Hayashi et al. 2004). Im Zellsystem führte sowohl die Überexpression von C-terminal trunkiertem PAK3, entsprechend der humanen Nonsense-Mutation p.R419X (Allen et al. 1998), als auch die von dominant-negativem PAK3 in kultivierten Hippocampus-Neuronen zu einer Formveränderung dendritischer Dornen und zu einer Verringerung des Anteils an reifen Dornen. Die dendritischen Ausstülpungen waren zudem unfähig, synaptische Kontakte auszubilden (Boda et al. 2004). *Pak3*-Knockout-Mäuse wiederum wiesen Veränderungen in der späten Phase der Langzeitpotenzierung (L-LTP) und Defizite im Lernverhalten und Erinnerungsvermögen auf (Meng et al. 2005).

Die Ergebnisse dieser Studien legen die Vermutung nahe, dass die Aktivität von Rho GTPasen während der neuronalen Entwicklung einen entscheidenden Beitrag zur synaptischer Plastizität sowie zur Ausbildung normaler kognitiver Funktionen und den sich daraus ergebenden Phänomenen wie Lernen und Gedächtnis leistet. Somit wird angenommen, dass die Ursachen der X-chromosomal vererbten, mentalen Retardierung unter anderem in von Rho GTPasen-abhängigen Signalwegen zu suchen sind (Newey et al. 2005; Govek et al. 2005).

## 5. Ziel der Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Verifizierung der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene. Da alle käuflich zu erwerbenden Antikörper sowohl  $\alpha Pix/Arhgef6$  als auch das dazu sehr homologe  $\beta Pix/Arhgef7$  erkennen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Antikörper hergestellt werden, der für  $\alpha Pix/Arhgef6$  spezifisch ist. Mit Hilfe dieses Antikörpers sollte die Expression des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Proteins in verschiedenen Geweben der adulten Maus sowie von Mausembryonen analysiert werden, um erste Hinweise auf die Funktion von  $\alpha Pix/Arhgef6$  in den entsprechenden Organen zu erlangen. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf der Analyse der Expression von  $\alpha Pix/Arhgef6$  im murinen Hirn, genauer in spezifischen Hirnarealen sowie im Hirn vorkommenden Zelltypen, wie beispielsweise Neuronen und Astrozyten. Hierfür sollten verschiedene Methoden etabliert und angewendet werden.

Mit Hilfe der Mikroarray-Technik sollten mögliche differentiell exprimierte Gene im Hippocampus der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus identifiziert werden. Gene, die unterschiedliche Expressionslevel zeigen, sollten nachfolgend durch unabhängige Methoden bestätigt werden.

Mit der durch *in-vitro* Experimente gezeigten GEF-Aktivität von  $\alpha PIX/ARHGEF6$  für Rac1 und Cdc42 liegt es nahe zu untersuchen, ob sich die  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Defizienz auf den Aktivitätszustand dieser beiden GTPasen in bestimmten Organen der Knockout-Maus auswirkt, wobei insbesondere das Hirn von Interesse war zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten Rac1/Cdc42-Pull-Down-Experimente durchgeführt werden.

### III. Material und Methoden

#### 1. Material

Alle verwendeten Enzyme und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Biorad (München), Falcon (Oxnard, USA), Fluka (Neu-Ulm), ICN (Eschwege), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Metabion (Planegg-Martinsried), New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.), Pierce/Perbio (Bonn), Promega (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen), Stratagene (Heidelberg) und im Reinheitsgrad „reinst“ oder „p.a.“ bezogen.

##### 1.1 Material für molekularbiologische Methoden

1 Kb DNA Leiter	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
ABI Prism Big Dye Terminator	Applied Biosystems Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
Bacto Tryptone	BD (Heidelberg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Chloramphenicol	Sigma (Taufkirchen)
DNase I	Roche (Mannheim)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Gateway LR Clonase Enzym Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Sigma (Taufkirchen)
„JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit“	Genomed (Bad Oeynhausen)
Kanamycinsulfat	Fluka (Steinheim)
Mangandichlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma (Taufkirchen)
Orange-G	Sigma (Taufkirchen)
“pENTR/D-TOPO Cloning Kit”	Invitrogen (Karlsruhe)
PfuTurbo <sup>®</sup> DNA Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
PfuUltra <sup>™</sup> HF DNA Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
„QIAEX II Gel Extraction Kit“	QIAGEN (Hilden)
„QIAGEN Plasmid Maxi Kit“	QIAGEN, (Hilden)
„QIAGEN Plasmid Midi Kit“	QIAGEN, (Hilden)
Quick T4 DNA Ligase	NEB (Frankfurt)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Mannheim)
RNase A	Roche (Mannheim)
RNase A	Roche (Mannheim)
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma (Taufkirchen)
Spectinomycin	Sigma (Taufkirchen)
T4 DNA Ligase	Gibco BRL (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerase	QIAGEN (Hilden)
„TOPO <sup>®</sup> TA PCR Cloning Kit“	Invitrogen (Karlsruhe)

##### 1.2 Materialien für proteinbiochemische Arbeitstechniken

4-Nitroblautetrazoliumchlorid	Roche (Mannheim)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat	Roche (Mannheim)
Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA, 30%/0,8%)	Biorad (München)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)

Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Biorad (München)
Bradford Protein Assay	Biorad (München)
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten	Roche (Mannheim)
ECL <sup>TM</sup> Western-Blotting Detection Reagentien	Amersham Biosci. (Freiburg)
Gluthation-Agarose	Sigma (Taufkirchen)
Gluthation-Sepharose 4B	Amersham Biosciences (Freiburg)
Hyperfilm ECL Röntgenfilme	Amersham Biosci. (Freiburg)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (Taufkirchen)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma (Taufkirchen)
Nitrocellulosemembran	Roche (Mannheim)
Nonidet P40 / Igepal	ICN (Eschwege)
Normal Goat Serum	Sigma (Taufkirchen)
No-Weigh <sup>TM</sup> Dithiothreitol (DTT)	Pierce/Perbio (Bonn)
NuPAGE <sup>®</sup> LDS Proben Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE <sup>®</sup> MES Antioxidant	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE <sup>®</sup> MES Sample Reducing Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE <sup>®</sup> MES SDS Laufpuffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Pefabloc SC	Roche (Mannheim)
Phenylmethyl Sulphonyl Fluoride (PMSF)	Roche (Mannheim)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma (Taufkirchen)
Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Standards	Biorad (München)
PVDF Western-Blotting Membranen	Roche (Mannheim)
Restore Western-Blot Stripping Puffer	Pierce/Perbio (Bonn)
SimplyBlue <sup>TM</sup> SafeStain	Invitrogen (Karlsruhe)
Sucrose	Sigma (Taufkirchen)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)
Whatman-3MM-Chromatographie-Papier	Whatman (Kent, England)

### 1.3 Materialien für zellbiologische Methoden

100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Falcon (Oxnard, USA)
10x Trypsin-EDTA (0,5%)	Gibco BRL (Karlsruhe)
6- und 24-Loch-Platten für die Zellkultur	Falcon (Oxnard, USA)
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma (Taufkirchen)
B-27 Supplement	Sigma (Taufkirchen)
Blocking-Reagenz	Boeringer
BSA Fraction V	Sigma (Taufkirchen)
Cytosine-b-D-Arabinofuranoside (AraC)	Sigma (Taufkirchen)
Dimethylsulphoxide (DMSO)	Merck (Darmstadt)
DNase	Roche (Mannheim)
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlsg. (D-PBS)	Gibco BRL (Karlsruhe)
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Ficoll 400	Amersham Biosci. (Freiburg)
Formamid	Sigma (Taufkirchen)
Fötales Rinderserum (FBS)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Glutamat	Sigma (Taufkirchen)
Glycerol-Gelatine	Sigma (Taufkirchen)
Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Hefe-tRNA	Sigma (Taufkirchen)
Heparin	Sigma (Taufkirchen)
Insulin	Sigma (Taufkirchen)
Laminin	Roche (Mannheim)

L-Glutamin	Sigma (Taufkirchen)
Lipofectamin™2000-Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Minimal Essential Medium (MEM)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Neurobasal-Medium	Gibco BRL (Karlsruhe)
Optimem1-Medium	Gibco BRL (Karlsruhe)
Optiprep	Axis Shield (London, England)
Paraformaldehyd	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL (Karlsruhe)
Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4, 1x )	Gibco BRL (Karlsruhe)
Phosphatpuffer (PBS <sup>+/+</sup> )	Gibco BRL (Karlsruhe)
Poly-L-Lysin	Sigma (Taufkirchen)
Polyvinylpyrrolidone	Sigma (Taufkirchen)
RNase-Inhibitor	Invitrogen (Karlsruhe)
Transferrin	Roche (Mannheim)
Trypsin	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin-Inhibitor	Sigma (Taufkirchen)
VECTASHIELD® Mounting Medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Zellsieb Maschenweite 0,2 µm	Falcon (Oxnard, USA)

#### 1.4 Materialien für histochemische Arbeiten

DAB Substrat	DAKO Cytomation (Hamburg)
Eosin	Merck (Darmstadt)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck (Darmstadt)
Hämalaun-Lösung	Sigma (Taufkirchen)
Ketaminhydrochlorid	Parke-Davis, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL (Karlsruhe)
Permanent Mounting Medium	Clarion (Foster City, California)
Tissue Tek	Sakura (Niederlande)
“Vectastain ABC Kit”	Vector Laboratories
Xylazinhydrochlorid	Bayer, Leverkusen
Xylol	Merck (Darmstadt)

#### 1.5 Sonstige Chemikalien

Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt)
D-Glukose	Sigma (Taufkirchen)
di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulphoxide (DMSO) Hybri-Max®	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Roth (Karlsruhe)

N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES)	Serva (Heidelberg)
Na <sub>3</sub> -Citrat-2H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma (Taufkirchen)
Natriumchlorid (NaCl)	Baker (Deventer, NL)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Polyethylenglykol	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
TRIZMA <sup>®</sup> BASE (Tris)	Sigma (Taufkirchen)

## 1.6 Bakterienstämme und Zelllinien

	Name	Eigenschaften
Bakterienstämme	DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsd RMS-mcrBC</i> )Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139</i> Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK λ- rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>nupG</i>
	BL21	F- <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm rne131</i> (DE3)
	TOP10	F- Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ( <i>ara, leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>
Zelllinien	CHO-K1	Adhärente Fibroblasten, Ovarien, Chinesischer Hamster
	COS-7	Fibroblasten-ähnliche Zellen, Niere, Afrikanische grüne Meerkatze

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien

## 1.7 Plasmide

### 1.7.1 Ausgangsvektoren für Klonierungen

	Name	Eigenschaften	Herkunft
Klonierungsvektoren	pCR <sup>®</sup> -2.1-TOPO <sup>®</sup>	Km <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>	Invitrogen
	pBluescript <sup>®</sup> SK	Amp <sup>r</sup>	Stratagene
Prokaryotische Expressionsvektoren	pGEX-4-T3	Amp <sup>r</sup> , <i>lacI</i> , GST-Epitop	Amersham
Gateway <sup>™</sup> -Vektoren	pENTR/D-TOPO <sup>®</sup>	Km <sup>r</sup> , <i>ccdB</i>	Invitrogen
	pFLAG-CMV-4-DEST	Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , FLAG-Epitop (Eukaryotischer Expressionsvektor)	AG Kutsche, UKE (Hamburg)
	pMT2SM-HA-DEST	Amp <sup>r</sup> , HA-Epitop (Eukaryotischer Expressionsvektor)	AG Kutsche, UKE (Hamburg)
	pDEST <sup>™</sup> 27	Amp <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , <i>ccdB</i> , GST-Epitop	Invitrogen

Tab. 2: Zur Herstellung neuer Konstrukte verwendete Ausgangsvektoren

### 1.7.2 Hergestellte Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene αPix/Arhgef6-Konstrukte für die Expression in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen sowie für RNA-*in-situ*-Hybridisierungen und Southern-Blot-Analysen hergestellt. Die Genbankzugangsnummer der Referenzsequenz von murinem αPix/Arhgef6 lautet AF393831.

Name	Oligonukleotide	Ausgangsvektor/Template	Zielvektor und Herstellung	Aminosäuren / Nukleotide
Mittels Gateway-Technologie hergestellte Konstrukte für die eukaryotische Expression				
pENTR/D-TOPO®-αPix/Arhgef6-Wildtyp	FTopoAF6 RTopoAF6	IMAGp998G208547Q2	pENTR/D-TOPO® Topoisomerase-reaktion	2-772
pMT2SM-HA-DEST αPix/Arhgef6-Wildtyp		pENTR/D-TOPO®- αPix/Arhgef6	pMT2SM-HA-DEST Rekombination	2-772
pFLAG-CMV-4-DEST- αPix/Arhgef6-Wildtyp		pENTR/D-TOPO®- αPix/Arhgef6	pFLAG-CMV-4-DEST Rekombination	2-772
Konstrukt für die prokaryotische Expression				
pGEX-4-T3-GST αPix/Arhgef6-[CH-L]	Ep1-EcoRI Ep1-NotI	pMT2SM-HA-DEST αPix/Arhgef6-Wildtyp	pGEX-4-T3-GST EcoRI/NotI	2-161
Konstrukt für den Southern-Blot				
2.1-TOPO®-TA-SB3	152A P1 152A P6	MPMGc121KO4251Q	pCR®-2.1-TOPO®	-3100nt- -2514nt
Konstrukte für RNA- <i>in-situ</i> -Hybridisierungen				
2.1-TOPO®-TA-Cd99l2	CD_500_For CD_500_Rev	Murine Hirn-cDNA	pCR®-2.1-TOPO®	167-3'UTR
pBluescript®SK- 5'UTR_BL1	5'UTR_F3_EcoRI 5'UTR_R_BamHI	IMAGp998G208547Q2	pBluescript®SK EcoRI/BamHI	5'UTR-161

Tab. 3: Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte

### 1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen) oder Metabion (Martinsried) bezogen. Oligonukleotide zur Generierung von cDNA-Fragmenten für Klonierungen wurden durch HPLC („high pressure liquid chromatography“) aufgereinigt. Oligonukleotide zur Sequenzierung wurden lediglich entsalzt. Vor ihrer Verwendung wurden die Oligonukleotide laut Herstellerangaben mit 1x TE auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Aliquots aus diesen Stammlösungen wurden vor Gebrauch mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 10 pmol/μl verdünnt.

Name	Sequenz	Herkunft
FTopoAF6	5'-CACCAATCCAGAAGAACGCCTTGTGACATGG-3'	Diese Arbeit
RTopoAF6	5'-TTACTGGAGAATCGAGGTCTTGCTGC-3'	Diese Arbeit
Ep1-NotI	5'-ATAAGAATGCGGCCGCTTTATCACAACGGTGACTTCCATTTCCGTC-3'	Diese Arbeit
Ep1-EcoRI	5'-GGAATTCGAATCCAGAAGAACGCCTTGTGACATG-3'	Diese Arbeit
CD_500_For	5'-CCACTACTACAACCTAGAAGGCCAGGA-3'	Diese Arbeit
CD_500_Rev	5'-GCTTGCTGCTGTCTGATTTGTCTT-3'	Diese Arbeit
152A P1	5'-CTATTACATAGATTTGGCCATGGCTC-3'	K. Kutsche, Hamburg
152A P6	5'-GTGCTATTACTGGTGGTCACAATCTG-3'	K. Kutsche, Hamburg
5'UTR_F3_EcoRI	5'-CGGAATTCGCAAGCACCAGAAGAGCGCTC-3'	Diese Arbeit
5'UTR_R_BamHI	5'-CGGGATCCCGCAACTGGTGACTTCCATTTCCG-3'	Diese Arbeit

Tab. 4: Oligonukleotide für Klonierungen

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Herkunft</u>
Knockout-in	5'- ACTGTCACTGTGAGATTGTCTGAGGAC -3'	K. Kutsche, Hamburg
mGEF7	5'- TTGCACAACACTACCCCATTTTTTCAGC -3'	K. Kutsche, Hamburg
tau2	5'- GCATGATCTTCCATCACGTCGAACTCC -3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF35	5'-GCAGGTCGTAGGCAACTTAACTC-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF28	5'-GCACAGTGATGGTTACTGGAGAATC-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF28F	5'-TCACAGCTGCCCCGAGAGCTGTTCAG-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF34	5'-GCATGGGAAGGAGATGATATTAAG-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF22	5'-CAATTTCTCCAAGTTCTGAATAC-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF15	5'-AGAATTACTACACTGTGGTGTTAC-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF40	5'-GGATGGTAGTGAACAGATTGGATG-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF38	5'-GTACTGCTGCCCTGGAAGAGGATG-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_GEF13F-SH3	5'-TGGCCGTCCCAGCACAGCTCCAG-3'	K. Kutsche, Hamburg
M_Ex 1F-CH	5'-GCCTCAGTCATGAATCCAGAAGAACG-3'	Diese Arbeit
M_Ex 3R-CH	5'-GTATTCAGAACCCTTGAGAAATTGGC -3'	Diese Arbeit
M_Ex 5R-SH3	5'-GCCTCCTTCTTCAACTCGTGTGAC -3'	Diese Arbeit
M_Ex 7R-SH3	5'-CTTTTTCAAGTGTCCAAGATGTTCTG -3'	Diese Arbeit
M_Ex 7F-DH	5'-GTTACTTACCTAAGACCCCTTGACG -3'	Diese Arbeit
M_Ex 9F-DH	5'-GAGGCTGCCTACTGAACCTCATGCCTC-3'	Diese Arbeit
M_Ex 11R-DH	5'- GAATATCCTGATGGTCTGGATGAGTG-3'	Diese Arbeit
M_Ex 15R-PH	5'-CATCCACTCCTGGAAGTCTGGTT -3'	Diese Arbeit
M_Ex 18R-GIT	5'- CTTCTCGGATGCTTTCTCTCCG-3'	Diese Arbeit
M_Ex 35R-GIT	5'-GCAGGTCGTAGGCAACTTAACTC-3'	Diese Arbeit
M_Ex 21R-cc	5'- CTTCTTAGGTCCTTCTCGACTTC-3'	Diese Arbeit
3-UTR-R1	5'-GCTTAGCCTCCAGCGAATTAGGTAG-3'	Diese Arbeit
3-UTR-R2	5'-CTGTTGGGCATAGCAAAGTATTG-3'	Diese Arbeit
3-UTR-R3	5'-ACCAAGCAATAAACTCTGAATC-3'	Diese Arbeit

**Tab. 5: Sequenzierung von muriner  $\alpha$ Pix/Arhgef6-cDNA und Durchführung der Genotypisierungs-PCR**

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Herkunft</u>
CD_Ex5F_1A	5'-AGGAGGTTGGTCAGACAAGG-3'	Diese Arbeit
CD_Ex8R_1B	5'-TGGATACAGCTCCAATCAGG-3'	Diese Arbeit
CD_Ex6F_2A	5'-TCTTGAAGACATCGTGGAAAGG-3'	Diese Arbeit
CD_Ex9R_3B	5'-CACGTAGTCTGCATTGAGGCCCT-3'	Diese Arbeit
CD_Ex7F_4A	5'-TATGGCAGCAACGATGACC-3'	Diese Arbeit
CD_Ex9R_5B	5'-CACACACAACAGCTTCCAGG-3'	Diese Arbeit
CD_Ex3F_6A	5'-ACTTCAGCACCACGACTAGG-3'	Diese Arbeit
CD_Ex5R_6B	5'-GATCATCCAAGGCATCTTCC-3'	Diese Arbeit
CD_Ex5F_1AL	5'-AGGAGGTTGGTCAGACAAGG-3'	Diese Arbeit
CD_Ex6F_2AL	5'-TCTTGAAGACATCGTGGAAAGGTGG-3'	Diese Arbeit
CD_Ex8R_1BL	5'-TGGATACAGCTCCAATCAGGGCCATAATCT-3'	Diese Arbeit
2_GAPDH_For	5'-TCAACGGCACAGTCAAGGC-3'	Diese Arbeit
1_GAPDH_Rev	5'-TCCACGACATACTCAGCACC-3'	Diese Arbeit

**Tab. 6: Sequenzierung von muriner  $Cd99/2$ -cDNA und Durchführung der Real-Time-PCR**

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Herkunft</u>
M13uni	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	K. Kutsche, Hamburg
M13rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	K. Kutsche, Hamburg
cDNAT7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	K. Kutsche, Hamburg
pFLAG-CMV-N	5'-AATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGC-3'	K. Kutsche, Hamburg
pMT2_seq	5'-CACTCCCAGGTCCAAGTGCATAAG-3'	K. Kutsche, Hamburg

**Tab. 7: Universalprimer zur Sequenzierung der Inserts innerhalb von Vektoren**

## 1.9 Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Herstellung eines primären, polyklonalen Antikörpers gegen murines  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Auftrag gegeben. Außerdem wurden verschiedene kommerzielle primäre und sekundäre Antikörper verwendet, die in den Tabellen 8 und 9 aufgelistet sind.

<b>Name</b>	<b>Antigen</b>	<b>Hergestellt in</b>	<b>eingesetzte Verdünnung</b>	<b>Herkunft</b>
anti- $\beta$ PIX/ARHGEF7	SH3-Domäne von $\alpha$ Pix/Arhgef6	Kaninchen	WB 1:400	Chemicon
anti-FLAG®M2 FITC-Konjugat	Synthetisches FLAG-Peptid	Maus	IF 1:100	Sigma
anti-FLAG®M2 Cy3-Konjugat	Synthetisches FLAG-Peptid	Maus	IF 1:200	Sigma
anti-HA FITC-Konjugat	Hämagglutinin des humanen Influenza Virus	Ratte	IF 1:50	Roche
anti-GAPDH	Kaninchen GAPDH aus Muskel	Maus	WB 1:2000	Abcam
anti-PSD-95	Ratten PSD-95 (SAP90)	Kaninchen	WB 1:2000	S. Kindler, Hamburg
anti-Map2	Ratten Map2	Kaninchen	ISH 1:2000	S. Kindler, Hamburg
anti-GFAP	Schwein Rückenmark	Maus	IF 1:500	Chemicon
anti-Map2	Rinder MAP2	Maus	IF 1:500	Chemicon
anti-Neuromodulin	Synthetisches Peptid humanes Neuromodulin	Maus	WB 1:300	Transduction Lab./BD
anti-Digoxigenin-Cy3-Konjugat	Synthetisches Digoxigenin-Peptid	Maus	ISH 1:100	Jackson Immunoresearch
anti-Digoxigenin-AP	Schaf Immunglobuline	Maus	N/B 1:500	Roche
anti-CNPase	Humane CNPase	Maus	WB: 1:1000 IF 1:500	Sigma
anti-CDC42	Humanes CDC42	Maus	WB 1:1000	BD Transduction Laboratories
anti-Rac1	Humanes Rac1	Maus	WB 1:1000	Biomol

**Tab. 8: Übersicht über die verwendeten kommerziellen, primären Antikörper**

Name	Antigen	Konjugat	eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Alexa-Fluor®546 Ziege-anti-Kaninchen	Kaninchen Immunglobuline	Alexa-Fluor®568	IF 1:1000	Mol. Probes / MoBiTec
Alexa-Fluor®488 Ziege-anti-Kaninchen	Kaninchen Immunglobuline	Alexa-Fluor®488	IF 1:1000	Mol. Probes / MoBiTec
Alexa-Fluor®546 Ziege-anti-Maus	Maus Immunglobuline	Alexa-Fluor®568	IF 1:1000	Mol. Probes / MoBiTec)
Alexa-Fluor®488 Ziege-anti-Maus	Maus Immunglobuline	Alexa-Fluor®488	IF 1:1000	Mol. Probes / MoBiTec
Goat-anti-Rabbit-HRP	Kaninchen Immunglobuline	Meerrettich-peroxidase	WB 1:2500	Amersham Biosciences
Goat-anti-Maus-HRP	Maus Immunglobuline	Meerrettich-peroxidase	WB 1:2500	Amersham Biosciences

**Tab. 9: Übersicht über die verwendeten kommerziellen, sekundären Antikörper**

Western-Blot (WB), Immunfluoreszenz (IF) oder *in situ* Hybridisierung (ISH), alkalische Phosphatase (AP), horse radish peroxidase (HRP)

## 2. Molekularbiologische Methoden mit DNA

### 2.1 Anzucht und Lagerung von *E.coli*

Für die Anzucht von *E.coli* wurden unterschiedliche Mengen LB-Medium mit Aliquots aus Flüssig-Vorkulturen in der Verdünnung 1:50 bis 1:100 mit Einzelkolonien von einer Agarplatte oder Abstrichen von einer Gefrierkultur beimpft und über Nacht (ÜN) bei 37°C und 220 Upm inkubiert. Das LB-Medium wurde je nach Resistenz des Bakterienstamms mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Zur Lagerung von *E.coli* wurden ÜN-Kulturen im Verhältnis 1:5 mit sterilem Glycerin versetzt. Diese Glycerin-Stocks können bei - 80°C über Jahre gelagert werden.

**LB (Luria Brotn)-Medium (1000 ml) :**

Trypton	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	5,00 g
pH 7 einstellen, autoklavieren und je nach Bedarf Antibiotika zugeben	

**LB (Luria Brotn)-Agar (1000 ml) :**

Trypton	10,00 g
Hefeextrakt	5,00 g
NaCl	5,00 g
Agar	15,00 g
pH 7 einstellen, autoklavieren und je nach Bedarf Antibiotika zugeben	

**Antibiotikakonzentrationen für *E. coli* Medien:**

Ampicillin	150,00 µg/ml
Kanamycin	25,00 µg/ml
Chloramphenicol	50,00 µg/ml

### 2.2 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen für die chemische Transformation

Die Herstellung kompetenter DH10B und BL21 *E.coli*-Zellen erfolgte durch die Anwendung der Rubidium-Chlorid-Methode. Dazu wurden 2 ml  $\psi$ B-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und ÜN bei 37°C und 220 Upm geschüttelt. Von dieser Kultur wurde 1 ml in 100 ml  $\psi$ B-Medium gegeben und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,3-0,4 bei 550 nm kultiviert. Mit 5 ml dieser Kultur wurden nochmals 100 ml  $\psi$ B-Medium beimpft und erneut bis zu einer OD<sub>550</sub>=0,3-0,4 bei

37°C inkubiert. Die Bakterien wurden für 5 min in Eiswasser gekühlt und für 8 min bei 2.500 Upm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Bakterien in 15 ml 4°C kaltem Puffer TfB I resuspendiert und 30 min in Eiswasser gekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 8 min bei 2.500 Upm und 4°C wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem Puffer TfB II aufgenommen, auf 200 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterienzellen wurden bei -80°C für mehrere Monate gelagert.

<b>ψB-Medium (1000 ml):</b>	Hefeextrakt	5,00 g
	Trypton	20,00 g
	KCl	0,75 g
	pH 7,6 einstellen mit KOH, autoklavieren und 34 ml steril filtriertes 1 M MgSO <sub>4</sub> dazugeben	
<b>TfB I-Puffer (500 ml):</b>	RbCl	6,05 g
	MnCl <sub>2</sub>	4,95 g
	Kaliumacetat	1,47 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,74 g
	Glycerol	75,00 ml
	pH 5,8 einstellen mit 0,2 M Essigsäure, steril filtrieren und bei 5°C lagern	
<b>TfB II-Puffer (100 ml):</b>	MOPS (100 mM, pH 7)	10,00 ml
	RbCl	0,12 g
	CaCl <sub>2</sub>	1,10 g
	Glycerol	15,00 ml
	pH 8 einstellen mit KOH, steril filtrieren und bei 5°C im Dunkeln lagern	

### 2.3 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *E.coli* wurden kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und pro Ansatz jeweils 100 µl Bakteriensuspension mit 10-300 ng DNA oder einem halben Ligationsansatz (2.8) versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Temperaturschock bei 42°C für 1-1,5 min, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 700 µl SOC-Medium wurde die Suspension für 1 h bei 37°C inkubiert und dann auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert.

<b>SOC-Medium:</b>	Trypton	20,00 g
	Hefeextrakt	5,00 g
	NaCl	0,50 g
	auf 970 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen, pH 7 einstellen, autoklavieren und jeweils 10 ml sterilfiltriertes 1 M MgSO <sub>4</sub> , 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> und 10 ml 40% Glukose hinzufügen	

### 2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

#### Minipräparation

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mittels der Minipräparations-Methode isoliert, welche auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden 2 ml Übernachtskultur angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden für 5 min bei 8.000 Upm abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl Lösung I resuspendiert. Danach wurden 200 µl Lösung II zugegeben, und die Suspension wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Zugabe von 300 µl Lösung III. Der Ansatz wurde gut gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA und wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 350 µl Isopropanol gefällt und 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA befindet sich im Pellet, und der Überstand wurde verworfen. Um aus dem Plasmid-DNA-Sediment mit isolierte RNA zu eliminieren, wurde dieses

mit 100 µl TE/RNase-Puffer versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Es erfolgte eine Fällung durch Zugabe von 120 µl 88% Isopropanol/0,2 M K-Acetat, Schütteln und 10 minütige Inkubation bei RT. Der Ansatz wurde nochmals für 5 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment 5-10 min bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA in bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### **Midi- und Maxipräparation**

Größere Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen oder zur längeren Lagerung wurden nach alkalischer Lyse der Zellen durch Ionenaustausch-Chromatografie mit dem QIAGEN „Plasmid Midi“ (bis 100 µg DNA) oder „Maxi Kit“ (bis 500 µg DNA) der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde in bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

<b>Lösung I:</b>	Glukose	50,00 mM
	Tris-HCl, pH 8	25,00 mM
	EDTA	10,00 mM
<b>Lösung II:</b>	NaOH	0,20 N
	SDS	1,00%
<b>Lösung III:</b>	Kaliumacetat	4,00 M
	Essigsäure	2,00 M
<b>TE/RNase-Puffer:</b>	RNaseA in 1x TE	100,00 µg/ml
<b>1x TE:</b>	Tris	10,00 mM
	EDTA	1,00 mM
	pH 7,5	

## **2.5 Isolierung von genomischer DNA**

### **Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturzellen wurden die Zellen, welche in Zellkulturgefäßen mit 75 cm<sup>2</sup> oder 150 cm<sup>2</sup> Grundfläche konfluent waren, durch Trypsinierung geerntet und bei 1500 Upm für 10 min bei 4°C pelletiert. Nach Waschen in PBS und wiederholter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2 ml PBS aufgenommen und sodann mittels dem „Genomic DNA Kit“ (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet.

### **Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe**

Zur Genotypisierung der Wildtyp- bzw. *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäuse mittels der Genotypisierungs-PCR (2.9.1) wurde diesen im Alter von zwei Wochen unter Äthernarkose ca. 0,3 cm der Schwanzspitze abgeschnitten. Diese Schwanzbiopsien wurden in 120 µl Schwanzlysis-Puffer unter Schütteln bei 55°C ÜN lysiert. Am folgenden Tag wurden die lysierten Biopsien zur Pelletierung des restlichen Schwanzmaterials für 5 min bei 12.000 Upm und RT zentrifugiert und 1 µl des Überstandes für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

<b>Schwanzlysis-Puffer I:</b>	Tris-HCl pH 8,0	50,00 mM
	KCl	50,00 mM
	EDTA pH 8,0	2,50 mM
	NP-40	0,45%
	Tween-20	0,45%
	Proteinase K (20mg/ml)	0,02%

Für die genomische Southern Blot-Analyse (2.15) wurden Schwanzbiopsien von 0,5 - 1 cm Länge adulter Wildtyp- bzw. *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäuse genommen und mit 500 µl Schwanzlysis-Puffer II unter Zusatz von 20 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) ÜN bei 55°C und unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 wurde das Lysat 15 min rotiert, dann 15 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Zur Entfernung restlichen Phenols wurde nun die wässrige Phase mit Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 versetzt und erneut, wie oben beschrieben, rotiert, zentrifugiert und die wässrige Phase überführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 50 µl 8 M LiCl und 500 µl Isopropanol durch vorsichtiges Invertieren gefällt. Die DNA war deutlich als weißer filamentöser Niederschlag erkennbar. Die genomische DNA wurde durch Zentrifugation (15 min bei 14.000 Upm und 4°C) pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 100 µl 1 x TE resuspendiert. Um ein optimales Lösen der DNA zu erreichen, wurde dieser Ansatz bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

<b>Schwanzlysis-Puffer II:</b>	Tris-HCl pH 8,0	50,00 mM
	EDTA pH 8,0	100,00 mM
	NaCl	100,00 mM
	SDS	1,00%
	Proteinase K (20mg/ml)	4,00%

## 2.6 Restriktion von DNA (Smith & Birnstiel, 1976)

Restriktionsenzyme spalten DNA durch Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats an spezifischen Erkennungssequenzen. Endonukleasen vom Typ II erkennen spezifische palindromische DNA-Sequenzen aus 4-8 Basenpaaren und schneiden diese in Anwesenheit von MgCl<sub>2</sub>. Sie erzeugen dabei enzymabhängige überstehende („sticky“) einzelsträngige oder glatte („blunt“) doppelsträngige Enden. Die enzymatische Hydrolyse von DNA wurde mit Enzymen von Promega (Mannheim) durchgeführt und die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Doppelrestriktionen erfolgten bei übereinstimmenden Bedingungen (Puffer und Temperatur) gleichzeitig, bei unterschiedlichen Bedingungen aufeinander folgend. Pro Ansatz wurden für analytische Zwecke 0,2-1 µg und für präparative Zwecke 1-3 µg DNA bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl und 0,5–1 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Zur Analyse der Restriktionsverdau wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese angewendet.

## 2.7 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte durch Bestimmung der Absorption (A) bei 260 nm. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50 mg/ml DNA. Die Bestimmung der Absorption bei 280 nm und die Bildung des Quotienten aus beiden Werten gibt einen Anhaltspunkt bezüglich der Reinheit der Präparation. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> von ~1,8 oder weniger aufweisen.

## 2.8 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Zwischen den freien 3'-OH- und 5'-PO<sub>4</sub>-Gruppen der DNA-Enden werden Esterbindungen geknüpft. Durch diese Reaktion können DNA-Fragmente in Vektorplasmide eingeführt und kovalent verbunden werden. Die Vektor-DNA sollte in dephosphoryliertem Zustand vorliegen, wohingegen die Insert-DNA an ihren Enden Phosphatgruppen aufweisen muss. Für eine Ligation wurde die mit Hilfe von Restriktionsenzymen linearisierte Vektor-DNA zusammen mit einem dreifachen molaren Überschuss eines entsprechend

geschnittenen DNA-Fragments eingesetzt. Die Ligation erfolgte mittels einer Enzymeinheit (U) T4 DNA Ligase (Gibco) bei 16°C ÜN oder durch 1 U *Quick T4 DNA Ligase* (NEB) bei Raumtemperatur für 20 min nach den Angaben des Herstellers.

## 2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „*p*olymerase *c*hain *r*eaction“) wurde zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet. Sie ist ein *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation von DNA unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie zweier Startoligonukleotide (Primer), die zu je einem Abschnitt der DNA komplementär sind (Mullis & Faloona, 1987). In der Regel wurden 10-500 pg Template (Matrize) mit je 10 pmol eines Forward- bzw. Reverse-Oligonukleotids und 0,1-0,2 µl Polymerase (1U) verwendet. Diese wurden mit 10x PCR Puffer, Desoxynukleotiden (2,5 mM je Nukleotid) und Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl gebracht. Nach Denaturierung des PCR-Ansatzes (1 min, 94°C) wurden 30-35 Zyklen aus Denaturierung (30 s, 94°C), Anlagerung der Primer („annealing“, 30 s, 48-68°C) und Polymerisation (1-5 min, 72°C) durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach den Schmelzpunkten der verwendeten Primer, die Zeitdauer für die Polymerisation nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei die verwendeten Polymerasen unter diesen Bedingungen etwa 700-1.000 bp pro min polymerisieren können. Um die Spezifität des entstehenden Produkts zu erhöhen, wurde in bestimmten Fällen eine so genannte „Touch-Down“-PCR-Reaktion durchgeführt. Hierbei wurde die Annealingtemperatur anfangs hoch gewählt (z.B. 66°C), dann jedoch zweimal nach je drei Zyklen um 2°C gesenkt. Dabei ergibt sich bei den restlichen Zyklen eine Anlagerungstemperatur von z.B. 62°C. Generell wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (QIAGEN) eingesetzt. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden hitzeresistente DNA-Polymerasen mit Korrektoreigenschaften („proofreading“), wie z.B. die PfuTurbo™ oder die PfuUltra™ (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reaktionen wurden in einem PTC-200 Thermocycler der Firma MJ Research (Biorad, München) durchgeführt. Verwendete Primer sind im Materialteil verzeichnet.

### 2.9.1 Genotypisierungs-PCR

Für die Genotypisierung von Jungtieren aus der Nachzucht sowie von präparierten Maus-Embryonen wurden spezifische Oligonukleotide verwendet und optimierte Reaktionsbedingungen in Anlehnung an Standard-PCR-Reaktionen etabliert. Es wurden drei Oligonukleotide in einer kombinierten „Multiplex“-PCR eingesetzt. Grundsätzlich erfolgte diese Genotypisierungs-PCR unter Verwendung einer im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten *Taq*-DNA-Polymerase und eines entsprechenden Reaktionspuffers. Als Template diente 1 µl genomischer DNA aus in Kapitel 2.5 beschriebener Präparation. Nach erfolgter Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit Hilfe eines 1,5%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Das Vorhandensein eines Wildtyp-Allels war durch ein PCR-Fragment von 785 bp, das eines Knockout-Allels durch ein Fragment der Größe von 695 bp kennzeichnend.

Genotypisierungs-AnsatzProgramm:

1,00 µl genomische DNA	94°C / 5,00 min	
1,00 µl dNTP's (10 mM)	94°C / 15,00 sec	} x 33
3,00 µl 10x PCR-Puffer (- MgCl <sub>2</sub> , Gibco)	68°C / 30,00 sec	
2,00 µl knockout-in-Primer (10 pmol/µl)	72°C / 1,00 min	
1,00 µl mGEF7-Primer (10 pmol/µl)	72°C / 4,00 min	
1,00 µl tau2-Primer (10 pmol/µl)		
1,20 µl MgCl <sub>2</sub> (50 mM, Gibco)		
1,00 µl Taq-Polymerase (aufgereinigt)		
<u>19,00 µl</u> H <sub>2</sub> O		
30,00 µl		

**2.10 Agarosegelelektrophorese**

Die Analyse von Plasmiden, Restriktionsreaktionen und PCR-Produkten erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,8- 2% (w/v) gewählt. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, auf etwa 50°C abgekühlt und in eine geeignete Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/4 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard diente eine DNA-Leiter (Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte bei 10-15 V/cm. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht (254 nm) die DNA durch die resultierende Fluoreszenz sichtbar macht (Ethidiumbromid 1:1000 verdünnt, 1 µl/10 ml Gel).

<b>Ladepuffer:</b>	Glycerol	25,00 ml
	1x TBE	25,00 ml
	Orange-G	~ 20,00 mg
<b>10x TBE:</b>	Tris	890,00 mM
	Borsäure	890,00 mM
	EDTA	20,00 mM

**2.11 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsprodukten**

Um Primer, Enzyme, Nukleotide und kleinere DNA-Fragmente aus einer PCR-Reaktion oder Restriktionsreaktion zu entfernen, wurde der „JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit“ (GENOMED) nach Angaben des Herstellers verwendet. Alternativ wurden Restriktionsprodukte auf TAE-Agarosegelele aufgetragen, die benötigten Banden aus diesen ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

<b>TAE-Puffer 50x (1 l):</b>	Tris	242,00 g
	Eisessig	57,10 ml
	EDTA 0,5 M, ph 8	100,00 ml
	auf 1 l auffüllen	

**2.12 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem „ABI Prism Big Dye Terminator Kit“ und dem Sequenzierungsgerät ABI Prism 377 DNA Sequencer der Firma PE Applied Biosystems (Darmstadt) durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht auf dem Einbau von fluoreszenzmarkierten Di-Desoxynukleotiden (ddNTP) in einen ui synthetisierenden DNA-Strang. Diese führen zum Abbruch der Synthese, so dass sich am Ende jeder Kette ein markiertes Di-Desoxynukleotid befindet. Dabei ist jedes der vier ddNTPs mit einem unterschiedlichen

Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, welcher während der Elektrophorese von einem Laser detektiert wird. Anhand der Größe der einzelnen PCR-Fragmente und deren 3'-terminalen Fluoreszenzmarkierung kann nun die Sequenzabfolge der Probe bestimmt werden.

### 2.13 Klonierung mittels TOPO™-Technologie

Die TOPO™-Technologie (Invitrogen) bietet eine Möglichkeit für die direkte Insertion von mit der *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in bestimmte Vektoren. Sie nutzt das Enzym Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus, welches zugleich als Restriktionsenzym und Ligase fungiert. Es spaltet die Vektor-DNA und bindet dabei kovalent an den Vektor. Anschließend wird die Bindung der Topoisomerase an den Vektor gelöst und gleichzeitig das PCR-Produkt in den Vektor ligiert. Für diese Arbeit wurde der „pCR®-2.1-TOPO®-Cloning Kit“ und „pENTR/D-TOPO®-Cloning Kit“ verwendet.

### 2.14 Klonierung mittels Gateway™-Technologie

Bei der Gateway™-Technologie (Invitrogen) wird die herkömmliche Klonierungsweise über Restriktion und Ligation durch Rekombinationsreaktionen, mittels derer ein DNA-Insert in einen gewünschten Vektor überführt wird, ersetzt. Solche Rekombinationen beruhen auf der ortsspezifischen Rekombinationsreaktion des *E.coli*-Bakteriophagen  $\lambda$ , durch die er während seines lysogenen Zyklusses in das Genom des Bakteriums integrieren kann. Dazu sind lediglich zwei spezifische, kurze DNA-Sequenzen, die so genannten Att-Stellen („attachment sites“) notwendig, die als Erkennungssequenzen für die Rekombination dienen. Um dieses System verwenden zu können, muss das zu klonierende DNA-Fragment zunächst zwischen zwei Att-Stellen in einen Eingangsvektor eingeführt werden. Von diesem Eingangsklon kann das Insert durch Rekombination (LR-Reaktion) in jeden beliebigen Zielvektor bezeichnet, welcher entsprechende Att-Stellen für die Rekombination besitzt, überführt werden. Als LR-Reaktion wird die Rekombination des DNA-Inserts aus einem Eingangsvektor in einen Zielvektor. In dieser Arbeit erfolgte eine Topoisomerase-unterstützte Klonierung in den Eingangsvektor pENTR/D-TOPO. Als Zielvektor wurde der pDEST27-Vektor verwendet. Eine detailliertere Beschreibung dieser Technologie findet sich auf der Internetseite der Firma Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). Die Gateway-Reaktionen erfolgten nach Angaben des Herstellers.

### 2.15 Southern-Blot-Analyse

Als „Southern-Blotting“ wird ein molekularbiologisches Verfahren bezeichnet, welches den Nachweis einer Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch innerhalb kurzer Zeit erlaubt. Dazu werden DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägermembran übertragen und immobilisiert, wobei das im Gel vorliegende Trennmuster der DNA-Fragmente erhalten bleibt. Die Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde lokalisiert die DNA-Sequenzen, die zur Sonde komplementär sind.

#### Durchführung des Southern-Blots

Pro Ansatz wurden 20 µg isolierte genomische DNA (2.5) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 1 U *KpnI* pro µg DNA 1h verdaut. Nach Auftrennung der fragmentierten DNA durch Agarosegelelektrophorese (0,8% Agarose in 1 x TAE) bei geringer Spannung 1h wurde das Gel am folgenden Tag mit einem angelegten fluoreszierenden Lineal im schwachen UV-Licht fotografiert. Um die Effektivität des nachfolgenden Transfers langer DNA-Fragmente (> 5 kb) zu verbessern, erfolgte zur weiteren Fragmentierung der DNA ein 15 minütiges Schwenken des Gels in 0,25 M HCl

(Verfärbung des im Gel enthaltenen Farbmarkers Bromphenolblau nach gelb). Nach kurzem Spülen in bidest H<sub>2</sub>O wurde die DNA sodann durch Schwenken des Gels in 0,4 M NaOH für weitere 15 min in Einzelstränge denaturiert (Verfärbung des Farbmarkers von gelb nach blau). Die Hybond-N<sup>+</sup>-Nylonmembran (0,45 µm, Amersham Biosciences) wurde auf Gelgröße zugeschnitten. Um sie zu aktivieren, wurde sie für 5 min in bidest H<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend für 15 min in 0,4 M NaOH äquilibriert.

Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte ÜN im Kapillarblot-Verfahren. Dazu wurde eine brettartige Unterlage quer über eine mit 0,4 M NaOH befüllte Plastikwanne gelegt. Um während des Transfers ein Trockenfallen zu vermeiden, wurde die Unterlage mit einem breiten Streifen *Whatman 3MM*-Papier so bezogen, dass die Enden des Streifenpapiers in das Laugenbad reichten. Darauf wurden zwei auf die Größe des Gels zugeschnittene, in 0,4 M NaOH getränkte *Whatman*-Papiere platziert und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Die Membran wurde ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt und mit zwei Lagen in 0,4 M NaOH getränkten *Whatman*-Papieren abgeschlossen. Durch Auflegen einer mit ca. 1 kg beschwerten dicken Lage Zellstoffs auf den Stapel erfolgte der Transfer der DNA auf die Trägermembran. Die treibende Kraft bildet dabei der Flüssigkeitsstrom, der vom Laugenbad ausgehend von unten durch das Gel, weiter durch die Membran zu dem Stapel saugfähigen Zellstoffs läuft. Dieser Strom zieht die DNA aus dem Gel mit, die anschließend in den Maschen der Membran hängen bleibt. Nach etwa 15 h wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen auf der Membran mit einem Bleistift markiert und diese zur Neutralisation 20 min in 2 x SSC geschwenkt. Zur Immobilisierung der DNA auf der Membran war es notwendig, diese mindestens 20 min bei RT an der Luft zu trocknen. Anschließend konnte die Membran direkt für die Hybridisierung verwendet oder alternativ in *Whatman*-Papier eingeschlagen und über Tage bis Wochen bei 4°C bzw. -20°C aufbewahrt werden.

#### **Herstellung $\alpha$ P<sup>32</sup>-markierter DNA-Sonden**

Die DNA-Sonden (ca. 500-600 Bp) wurden für die Southern-Hybridisierung mittels PCR amplifiziert (2.9), in pCR<sup>®</sup>-2.1-TOPO<sup>®</sup> subkloniert, durch einen entsprechenden Restriktionsverdau ausgeschnitten (2.6) und über Agarosegelelektrophorese (2.10) und Gelextraktion (2.11) aufgereinigt. Etwa 100 ng Sonden-DNA wurden mit 1xTE auf ein Volumen von 50 µl gebracht und mit Hilfe des „Random Prime Labeling Kit“ (Amersham Biosciences) unter Verwendung von 50 µCi  $\alpha$ P<sup>32</sup>-dCTP nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences) nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Die Messung der spezifischen Aktivität der  $\alpha$ P<sup>32</sup>-dCTP markierten Sonde erfolgte durch Szintillationszählung (ca. 1x10<sup>5</sup> cpm/µl). Zur Trennung der doppelsträngigen DNA wurde die markierte Sonde direkt vor ihrer Verwendung auf 95°C für 10 min aufgeköcht und bis zur Hybridisierung auf Eis aufbewahrt.

#### **Identifizierung von DNA-Fragmenten durch Hybridisierung**

Die Membran wurde in eine Rollflasche aus Glas überführt und zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen in 10 ml vorgewärmter Speed HybII-Lösung mit frisch denaturierter Heringsspermien-DNA (200 µg/ml) bei 68°C in einem Rollerofen (Bacherofer) vorhybridisiert. Nach 30 min wurde die Hybridisierungslösung gewechselt und dabei die  $\alpha$ P<sup>32</sup>-dCTP markierte Sonde hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei gleicher Temperatur ÜN. Nach etwa 15 h wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde aufeinanderfolgend zweimal mit Waschpuffer I für je 20 min und gegebenenfalls einmal mit Waschpuffer II für 5-10 min bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Nach jedem Waschriff erfolgte eine Bestimmung der Signalstärke mittels eines Handmessgerätes. Es wurde so lange gewaschen, bis die Radioaktivität des Blots unter 20 Raten pro Sekunde gesunken war. Abschließend wurde die Membran im feuchten Zustand in *Saran*-Folie

eingeschlagen und auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) in einer signalverstärkenden Röntgenfilmkassette bei - 80°C für ein bis fünf Tage exponiert.

<b>20 x SSPE-Puffer:</b>	NaCl	3,00 M
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,20 M
	EDTA	0,02 M
	pH 7,4 mit NaOH einstellen, autoklavieren	
<b>Speed HybII-Lösung:</b>	SDS	7,00% (w/v)
	SSPE	1,50 x
	Polyethylenglykol	10,00% (w/v)
<b>Heringsspermien-DNA:</b>	10,00 mg/ml in TE	
<b>20 x SSC:</b>	NaCl	3,00 M
	Na <sub>3</sub> -Citrat-2H <sub>2</sub> O	0,30 M
	PH 7,0 einstellen mit HCl, autoklavieren	
<b>Waschlösung I:</b>	SDS	0,50% (v/v)
	SSC	5,00% (v/v)
<b>Waschlösung II:</b>	SDS	0,10% (v/v)
	SSC	10,00% (v/v)

### 3. Molekularbiologische Methoden mit RNA

#### 3.1 Allgemeine Bedingungen für das Arbeiten mit RNA

RNasen kommen ubiquitär vor, sind äußerst stabil und können nach ihrer Denaturierung, wie z.B. durch Autoklavieren, erneut renaturieren. RNA dagegen ist überaus anfällig für die enzymatisch katalysierte Hydrolyse durch RNasen, weshalb besondere Vorkehrungen für das Arbeiten mit RNA notwendig waren. Glaswaren wurden zur Inaktivierung von RNasen autoklaviert bzw. über Nacht bei 220°C gebacken und alle benötigten Lösungen mit autoklaviertem, HPLC gereinigtem Wasser (LiChrosolv, Merck) angesetzt. Die Isolierung und Transkription von RNA, Real-Time-PCR-Reaktionen sowie RNA-*in-situ*-Hybridisierungen wurden mittels RNase-freiem Reinstwasser ("PCR-H<sub>2</sub>O") und sterilem Plastikmaterial, Eppendorf-Reaktion Gefäße, Spitzen etc. durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden mit Handschuhen und auf Eis durchgeführt.

#### 3.2 Isolierung und Reinigung totaler RNA

##### Isolierung totaler RNA aus Gewebe

Die Isolierung totaler RNA aus dem Hippocampus von Mäusen wurde nach der Trizol-Methode und anschließend mit Hilfe des „RNeasy Total RNA Kits“ der Firma QIAGEN durchgeführt. Dafür wurde das Gehirn getöteter Mäuse entnommen, beide Hippocampi aus dem Vorderhirn präpariert und diese in 800 µl Trizol™ (Invitrogen) aufgenommen. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte durch sukzessives Passieren durch kleiner werdende Kanülen der Stärke 19, dann 22 und zuletzt 27 in Trizol™. Die weitere Prozessierung wurde analog den Herstellerangaben der Firmen Invitrogen und QIAGEN durchgeführt. Die Gesamt-RNA-Fractionen wurden abschließend in 50 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert.

##### Isolierung totaler RNA aus kultivierten Zellen

Zur Isolierung totaler RNA aus kultivierten Zellen (ca. 1x10<sup>6</sup> Zellen ) wurden diese bei etwa zu 80% konfluentem Zellrasen zur Erhöhung der Transkriptionsaktivität umgesetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Kulturschale gelöst (6.1.3), in ein mit Medium vorgelegtes 14 ml-Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und nach Zentrifugation bei 880 Upm und 4°C für 5 min

einmal mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden wiederum bei 880 Upm und 4°C für 5 min pelletiert und anschließend in 200 µl PBS resuspendiert. Die Isolierung der RNA erfolgte mittels des „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers. Die gewonnene RNA wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei - 80°C gelagert.

### 3.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA in wässriger Lösung wurde in Einmalplastikküvetten (Eppendorf Uvette) im Photometer (Eppendorf BioPhotometer) über die Absorption bestimmt. Als Maß für die Reinheit der Lösung wurde das Verhältnis Absorption bei 260nm/Absorption bei 280nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD<sub>260nm</sub> = 1 ungefähr 40 µg/ml einzelsträngiger RNA.

### 3.4 Auftrennung von RNA

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1,5%igen Agarosegelen. Die RNA-Proben wurden mit ½ Volumen RNA-Ladepuffer (PeqLab) versetzt, 10 min bei 70 °C erhitzt und nach Abkühlung auf Eis in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard diente die „High-Range RNA Leiter“ (PeqLab). Die Dokumentation erfolgte wie in (2.10) beschrieben.

### 3.5 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Das Enzym Reverse Transkriptase zeichnet sich durch eine hohe Prozessivität aus und ist in der Lage, labile mRNA-Moleküle in stabilere, zur Ausgangs-RNA komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden 1 µg isolierte RNA (3.2), 4 U Omniscript-Reverse Transkriptase (QIAGEN), 10 U RNase Inhibitor (Invitrogen), 1 x Reaktionspuffer, 0,5 mM dNTPs sowie 10 µM Hexamer-Primer eingesetzt. Solche Hexamere hybridisieren in zufälliger Weise an RNA-Moleküle und ermöglichen somit der Reversen Transkriptase durch die Bereitstellung eines kurzen doppelsträngigen Bereiches den Beginn der cDNA-Synthese. Zur Auflösung der Sekundärstruktur der RNA wurde der Reaktionsansatz vor Zugabe der Reversen Transkriptase für 10 min auf 70°C erhitzt. Erst nach diesem Denaturierungsschritt wurde das Enzym hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die synthetisierte cDNA konnte als Matrize in eine RT-PCR sowie in eine „Real-Time“-PCR (3.6) eingesetzt oder bei - 20°C gelagert werden.

### 3.6 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Sie bietet die Möglichkeit, den Expressionslevel von Genen schnell und verlässlich zu detektieren und zu quantifizieren. Das Sichtbarmachen eines PCR-Verlaufes geschieht mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe, die während der PCR-Reaktion in die Amplifikate interkalieren. Die „Real-Time“-PCR wurde am „Rotor-Gene 2000“ (Corbett-Research) unter Anwendung des „SYBR-Green PCR Master Mix“ (Applied Biosystems) durchgeführt. SYBR-Green-Moleküle besitzen die Eigenschaft, nur an doppelsträngige DNA zu binden und durch Anregung der Wellenlänge von 470 nm stark zu fluoreszieren. Mehrere SYBR-Green-Moleküle binden an ein PCR-Amplikon, und der dabei entstehende Fluoreszenzanstieg wurde gegen die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Die gesammelten Daten wurden durch das Softwareprogramm „GeneScan © 3.1“ (Applied Biosystems) ausgewertet und in Graphiken dargestellt.

### **Etablierung der PCR-Bedingungen auf dem Rotor-Gene Gerät**

Die Herstellung der cDNA-Proben wurde wie in Kapitel 3.2 und 3.5 beschrieben durchgeführt. Die gewählten Oligonukleotide wurden vorab in einer Standard-PCR getestet und mittels eines Kontroll-Agarosegels auf optimale Spezifität hin untersucht. Sobald keine unspezifischen Produkte oder Primerdimere mehr erkennbar waren, wurden diese PCR-Bedingungen auf das „Rotor-Gene 2000“-Gerät übertragen. Um die Reaktionsbedingungen in jeder PCR weitmöglichst zu standardisieren, wurde der „SYBR Green PCR Master Mix Kit“ verwendet. Die cDNA und die Oligonukleotide wurden zu den Komponenten dieses Kits hinzugegeben. Durch Verwendung der im Mastermix enthaltenen Hot-Start-Polymerase wurde gewährleistet, dass die Reaktion in allen Ansätzen zur gleichen Zeit nach der Enzymaktivierung (95°C für 10 min) begann. Für ein Gesamtvolumen von 20 µl wurden 10 µl „SYBR Green PCR Master Mix“, 40-80 ng cDNA und je 10 pmol Primer eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden initial für 15 min auf 95°C zur Denaturierung und Enzymaktivierung erhitzt, folgend schlossen sich 40 Zyklen bei 95°C für 15 sec, 57°C für 30 sec und 72°C für 30 sec an. Zur Normierung wurde bei jeder Reaktion ein PCR-Produkt für GAPDH mitamplifiziert. GAPDH ist ein in allen Geweben hoch exprimiertes „Housekeeping“-Gen, dessen Expression mit der des Zielgens verglichen wurde und somit als eine notwendige Referenz diente. Durch einen entsprechenden Vergleich konnte die Menge an Ziel-RNA ins Verhältnis zu der insgesamt in der Probe vorhandenen RNA-Menge gesetzt werden.

### **Quantifizierung der Genexpression**

Jeder PCR-Lauf wurde mehrfach wiederholt und dabei jedes Template grundsätzlich zweimal angesetzt. Während der Reaktion wurde das Fluoreszenzsignal, welches entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes anstieg, durch das „Rotor-Gene 2000“-Gerät detektiert. Dabei war die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat proportional. Die Auswertung der Analyse erfolgte über den so genannten CT-Wert („threshold cycle“). Durch den CT-Wert konnte eine Trennlinie zur Unterscheidung zwischen signifikanter Zunahme der Fluoreszenz und dem Grundrauschen und somit der niedrigste messbare positive Wert, bei dem die Reaktion die exponentielle Amplifikationsphase erreicht hat, dargestellt werden. Dieser Wert gibt demgemäß eine Zyklenzahl an und steht in direkter Beziehung zur Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA.

### **Auswertung der Real-Time-PCR**

Für die beiden je PCR-Lauf ermittelten Werte jeder untersuchten cDNA-Zielsequenz wurde der Mittelwert errechnet und die Standardabweichung mittels der Software bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Anwendung der „comparativen  $\Delta\Delta CT$ “-Methode, bei der die normalisierten PCR-Amplifikatmengen und damit die Fluoreszenzintensitäten des definierten CT-Wertes jeder untersuchten Probe in das Verhältnis zu denen eines Kalibrators gesetzt wurden. Als Kalibrator dienten die PCR-Daten einer ausgewählten Kontrolle. Die Berechnung der relativen Transkriptmengen erfolgte in drei Schritten:

1. Schritt: Es wurde die Differenz zwischen dem CT-Wert des Zielgens und dem des Referenzgens (GAPDH) gebildet. Dieser Schritt diente der Normalisierung der Zielgen-PCR, bei der unterschiedliche cDNA-Mengen sowie Qualitätsunterschiede der Ziel-cDNA und Kontroll-cDNA ausgeglichen wurden.

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{GAPDH}}$$

2. Schritt: Die berechneten  $\Delta\text{CT}$ -Werte wurden in das Verhältnis mit dem  $\Delta\text{CT}$ -Wert des Kalibrators gesetzt.

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} - \Delta\text{CT Kalibrator}$$

3. Schritt: Die Umrechnung des  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes in einen absoluten Wert erfolgte mittels der Formel:  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ . Die so berechneten Werte ergaben die relative Kopienzahl des Ziel-Gens zum Kalibrator.

### 3.7 RNA-in-situ-Hybridisierung an embryonalen hippocampalen Neuronen der Maus

#### 3.7.1 Herstellung der RNA-Sonden

##### Aufreinigung des Plasmid-DNA-Templates

Für die Herstellung der Sonde wurden zunächst 20  $\mu\text{g}$  des Plasmids pBluescript-SK-5'UTR\_CH\_L in zwei unabhängigen Restriktionsreaktionen mit 20 U des Enzyms *KpnI* bzw. *SacI* in einem Restriktionsvolumen von 100  $\mu\text{l}$  bei 37°C ÜN linearisiert (2.6). Zur Analyse des erfolgreich linearisierten Plasmids wurde zunächst 1  $\mu\text{l}$  dieses Reaktionsansatzes auf ein analytisches Gel aufgetragen. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 1/50 0,5 M EDTA (pH 8,0) zu dem Reaktionsgemisch. Dann wurde das linearisierte Plasmid mit Phenol/Chloroform extrahiert und durch Zugabe von 1/10 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 3 Vol. eiskaltem 100%igem Ethanol nach Zentrifugation (13.000 Upm für 15 min bei 4°C) gefällt. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen und in 30  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Reinstwasser aufgenommen. Es wurde erneut 1  $\mu\text{l}$  des aufgereinigten linearisierten Plasmids in einem Agarosegel analysiert.

##### In vitro-Synthese DIG-markierter RNA-Sonden

Die *in vitro*-Transkription DIG-markierter RNA-Sonden erfolgte in zwei verschiedenen Ansätzen, zum einen mit aufgereinigtem *KpnI*-, und zum anderen mit *SacI*-linearisiertem pBluescript-SK-5'UTR\_CH\_L-Plasmid als Template. Dabei führte eine Linearisierung des Plasmids durch *KpnI* und die Verwendung der T3-RNA-Polymerase zu einer Transkription einer spezifischen  *$\alpha$ Pix/Arhgef6*-„Antisense“ RNA-Sonde. Die Linearisierung durch *SacI* und die Verwendung der T7-RNA-Polymerase dagegen führt zu einer unspezifischen „Sense“-RNA-Sonde. Hierzu wurde von der jeweiligen DNA (1  $\mu\text{g}$ ) unter Verwendung von je 1 mM ATP, GTP und CTP, 0,65 mM UTP (Promega), 0,35 mM DIG-UTP (Roche), 4 U RNase-Inhibitor (Invitrogen) und 5 U T7- bzw. T3-RNA-Polymerase (Fermentas) in 20  $\mu\text{l}$  des dazugehörigen Transkriptionspuffers eine mit Digoxigenin markierte RNA-Sonde transkribiert. Nach 2 h *in vitro*-Transkription bei 37°C wurden dem Transkriptionsansatz 80  $\mu\text{l}$  RNase-freies Reinstwasser, 4 U RNase-Inhibitor sowie 10 U RNase-freie DNaseI (Promega) hinzugefügt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurde der DNase-Abbau der Plasmid-DNA durch Zugabe von 1/50 Vol. 0,5 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Um den Erfolg der *in vitro*-Synthese zu kontrollieren, wurden dem Ansatz 2  $\mu\text{l}$  entnommen und auf einem Agarosegel analysiert. Bei zu langen RNA-Transkripten wird der Vorgang der RNA-Hybridisierung innerhalb der Zellen stark beeinträchtigt. Aus diesem Grund muss eine Kürzung der markierten RNA auf eine Fragmentlänge von etwa 200-300 Bp erfolgen, um eine bessere Eintrittsmöglichkeit der Sonde in das Gewebe zu erreichen. Die Fragmentierung der RNA-Stränge erfolgte mittels alkalischer Hydrolyse durch Zugabe von 1/5 Vol. 0,4 M Natriumhydrogencarbonat und 1/5 Vol. 0,6 M Di-Natriumcarbonat in einem Endvolumen von 200  $\mu\text{l}$  bei einer Inkubationstemperatur von 60°C. Die Transkriptlänge wird dabei durch die Länge der Inkubationszeit eingestellt, die sich aus der Berechnung nach folgender Formel ergibt:

$$t = (l_o - l_f) / (k \times l_o \times l_f)$$

t: Inkubationszeit in min;  $l_o$ : Transkriptlänge in kb;  $l_f$ : gewünschte Länge in kb; k:  $0,11 \text{ kb}^{-1} \text{ min}^{-1}$   
(Angerer *et al.*, 1987)

Nach Zugabe von 1/200 Vol. 100%iger Essigsäure und der schnellen Abkühlung auf Eis kam es zum Abbruch der Hydrolysereaktion. Anschließend wurde die RNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2), welches zugleich die Neutralisierung der Lösung bewirkt, und 3 Vol. 100%igem Ethanol auf Eis für 30 min oder bei  $-20^\circ\text{C}$  ÜN gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm für 20 min bei  $4^\circ\text{C}$ ) und anschließendem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die Sonde in 100  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Reinstwasser gelöst. Die Quantifizierung der aufgereinigten Sonde erfolgte mit 5  $\mu\text{l}$  der gelösten RNA über Agarose-Gelelektrophorese.

### **Quantifizierung der RNA-Sonde mittels Dot Blot**

Ein anschließender immunologischer Nachweis dieser Sonden diente zur Probenquantifizierung. Dazu wurde von der transkribierten „Antisense“- bzw. „Sense“-Sonde je eine 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung angesetzt. Aus diesen und aus entsprechenden Verdünnungen einer Digoxigenin-markierten Kontroll-RNA bekannter Konzentration wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  auf ein beschriftetes Stück Hybond-Membran punktförmig aufgetragen. Nach Fixierung der Nukleinsäuren durch eine einminütige Bestrahlung mit UV-Licht (120 mJ, Stratalinker 2400, Stratagene), wurde die Membran kurzzeitig in Puffer 1 gespült und anschließend für 30 min in 1% Blocking-Reagenz inkubiert. Für den Nachweis des Digoxigenins wurde ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) verwendet. Dieser wurde 1:500 in 1% Blocking-Reagenz verdünnt und zur Inkubation der Membran für 60 min bei RT eingesetzt. Es folgte zweimaliges Waschen mit Puffer 1 für jeweils 10 min und zweimal fünfminütiges Waschen mit Puffer 2. Im Anschluss wurde durch die Inkubation der Membran in NBT/BCIP-Farblösung für ca. 10 min bei Dunkelheit eine Farbreaktion erzeugt. Dabei katalysiert die alkalische Phosphatase die Substrate NBT (4-Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) zu einem dunkelvioletten Farbstoff, der in der Umgebung der RNA ausfällt und somit die relative Menge der transkribierten RNA anzeigt. Durch zweimaliges Waschen der Membran mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  wurde die Reaktion gestoppt. Die Mengen der transkribierten cRNA-Sonden konnten auf der getrockneten Membran durch Vergleich mit der Kontroll-RNA bekannter Konzentration abgeschätzt werden.

<b>Puffer 1:</b>	Tris-HCl pH 7,5 NaCl	100,00 mM 150,00 mM
<b>Puffer 2:</b>	Tris-HCl pH 9,5 NaCl	100,00 mM 100,00 mM
<b>1% Blocking-Reagenz</b>	1% Blocking-Reagenz (Boehringer) in Puffer 1	
<b>NBT/BCIP-Farblösung:</b>	NBT (Roche) BCIP (Roche)	4,50 $\mu\text{l}$ / ml Puffer 2 3,50 $\mu\text{l}$ / ml Puffer 2

### **3.7.2 RNA-*in-situ*-Hybridisierung**

#### **Fixierung der Neurone**

Nach einer Kultivierungszeit von etwa 12 bis 14 Tagen waren die Hippocampus-Neurone hinreichend ausdifferenziert und für weitere Experimente verwendbar. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte wie in

Kapitel 6.1.6 beschrieben. Die Zellen wurden zweimal mit Spülpuffer 1 ab gespült, dann in 4% Fixierungslösung für 15 min bei RT fixiert und anschließend dreimal für 5 min in Spülpuffer 1 gewaschen. Danach wurden die Neurone in 0,3% Permeabilisierungspuffer für 3 min permeabilisiert und dreimal mit Spülpuffer 2 für jeweils 5 min gewaschen.

<b>Spülpuffer 1:</b>	4% (w/v) Sucrose in 1 x PBS, pH 7,4
<b>Spülpuffer 2:</b>	2 mM MgCl <sub>2</sub> in 1 x PBS, pH 7,4
<b>4% Fixierungslösung</b>	Paraformaldehyd 4,00% (w/v) Saccharose 4,00% (w/v) EGTA 5,00 mM MgCl <sub>2</sub> 2,00 mM
<b>0,3% Permeabilisierungspuffer:</b>	0,3% Triton-X-100 in 1 x PBS, pH 7,4

### Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die Deckgläser, auf denen sich die fixierten Neurone befanden, dem Puffer entnommen und auf Parafilm in einer feuchten Kammer mit 50% Formamid in einer Prähybridisierungslösung bei 50°C hybridisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Prähybridisierungslösung zuvor 250 µg/ml denaturierte Heringsspermien-DNA (5 min 100°C) zugegeben. Nach 2 h erfolgte auf neuem Parafilm in derselben Kammer die Hybridisierung der Neurone ÜN. Dazu wurden 200 bis 400 ng/ml *αPix/Arhgef6*-„antisense“ bzw. „sense“-Sonde mit 250 µg/ml Heringsspermien-DNA in einem Ansatz für 5 min bei 100°C denaturiert und zu der Hybridisierungslösung gegeben. Am darauffolgenden Tag wurden die Deckgläschen in eine 12- bzw. 24-Loch-Kulturplatte gelegt und zum Entfernen unspezifisch gebundener Sonde zweimal für 5 min mit Waschlösung 1 und zweimal mit Waschlösung 2 bei 50°C im Wasserbad für je 10 min gewaschen.

<b>Prähybridisierungslösung:</b>	Formamid (Sigma, deionisiert) 50,00% (v/v) SSC 25,00% Denhardt's Lösung 5,00% SDS 0,20% (w/v) Heparin (Sigma) 50,00 µg/ml Hefe-tRNA 250,00 µg/ml Heringsspermien-DNA (Sigma) 250,00 µg/ml
<b>Hybridisierungslösung:</b>	Prähybridisierungslösung RNA-Sonde 200 - 400 ng/ml
<b>Waschlösung 1:</b>	SDS 0,10% (v/v) SSC 5,00% (v/v)
<b>Waschlösung 2:</b>	SDS 0,10% (v/v) SSC 1,00% (v/v)
<b>20 x SSC:</b>	NaCl 3,00 M Na <sub>3</sub> -Citrat-2H <sub>2</sub> O 0,30 M pH 7,0 einstellen mit HCl, autoklavieren
<b>100 x Denhard's Lösung:</b>	Ficoll 400 (Amersham) 2,00% (w/v) Polyvinylpyrrolidone (Sigma) 2,00% (w/v) BSA Fraction V (Sigma) 2,00% (w/v)

**Immuncytochemische Detektion der cRNA/mRNA-Hybride**

Der Nachweis der cRNA/mRNA-Hybride erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen. Dafür wurden die Zellen zweimal für 5 min mit Waschlösung 3 gewaschen und für 30 min in 1% Blocking-Reagenz auf Parafilm inkubiert. Zur Detektion der Digoxigenin-markierten cRNA wurde ein mit Cy3-konjugierter anti-Digoxigenin-Antikörper (PeqLab) in einer Verdünnung von 1:200 in 1% Blocking-Reagenz verwendet. Zur Sichtbarmachung der Neuronen wurde ein spezifisch gegen das Mikrotubulin gerichteter anti-Map2-Antikörper eingesetzt. Dieser wurde zuvor 1:2000 in 1% Blocking-Reagenz verdünnt. Die Inkubation der jeweiligen Antikörper erfolgte auf neuem Parafilm in einer feuchten und dunklen Kammer ÜN bei 4°C. Am nachfolgenden Tag wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in Waschpuffer 3 mit den sekundären Antikörpern Alexa-Fluor 546-konjugierter anti-Maus bzw. Alexa-Fluor 488-konjugierter anti-Kaninchen für 1 bis 2 h inkubiert und anschließend noch einmal dreimal für 10 min mit Waschpuffer 3 gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Permafluor (Beckman Coulter) auf Objektträgern eingebettet. Die Auswertung der Präparate erfolgte wie in (6.3) beschrieben.

<b>Waschlösung 3:</b>	Tris-HCL pH 7,5	1,00 M
	NaCl	5,00 M

**4. Proteinbiochemische Methoden****4.1 Isolierung von Proteinen aus verschiedenen Geweben der Maus**

Um Proteine mittels Western-Blot nachzuweisen, wurden Proteinfractionen aus verschiedenen Geweben der Wildtyp- sowie der  $\alpha$ Pixl/Arhgef6-Knockout-Maus hergestellt. Zur Isolation der cytosolischen Fraktion wurde das entsprechende Gewebe der Maus entnommen und sofort auf Trockeneis gefroren. Im gefrorenem Zustand wurde nun das Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert, dann in ein adäquates Volumen eiskalten Gewebelysispuffer überführt und mittels eines Glashomogenisators bzw. alternativ mit einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel) bei Stufe 2 homogenisiert. Die Homogenisierung kleinerer Geweberegionen, wie z.B. Hippocampus, Cortex und Cerebellum erfolgte mittels Kanülen der Stärken 20G bis 27G. Um eine vollständige Lyse der Gewebezellen zu erreichen, wurden Gewebehomogenate für 30 min auf Eis inkubiert. Durch eine erste Zentrifugation bei 4000 Upm für 10 min bei 4°C wurden gröbere Gewebetrümmer entfernt. Die Gewinnung der cytosolischen Fraktion erfolgte dann durch eine 15 minütige Zentrifugation des Überstandes bei 14.000 Upm und 4°C. Anschließend wurde der Überstand (cytosolische Fraktion) aliquotiert und bei -80°C gelagert.

<b>Gewebe-Lysispuffer:</b>	Tris-HCl pH 7,6	20,00 mM
	NaCl	140,00 mM
	EDTA	5,00 mM
	Glycerol	5,00%
	Nonidet P40 (Fluka)	1,00% (v/v)
	SDS	0,10% (v/v)
	Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette/30 ml Lysispuffer
	Pefablock (Roche)	0,50 mg/ml

**4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Quantifizierung von Proteinen in Lösung erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Diese colorimetrische Messung beruht auf der Absorptionsänderung des gebundenen Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau im Vergleich zum freien Farbstoff in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbstoff reagiert mit basischen und aromatischen Aminosäureresten unter Entstehung von Komplexen, die ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda=595$  nm aufweisen, während der

ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda=465$  nm zeigt. Als Referenz der gemessenen Proteinkonzentration der Probe diente eine Eichkurve des BSA-Proteins (Bovines Serum-Albumin), hergestellt mit verschiedenen bekannten Konzentrationen (20, 40, 60, 80, 100, 120 und 140  $\mu\text{g/ml}$ ). Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Bradford-Reagenzlösung (Bradford Protein Assay, Biorad) 1:5 mit Wasser verdünnt, davon 5 ml mit 3  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Es wurde die  $\text{OD}_{595}$  ermittelt, der erhaltene Messwert anschließend mit den Daten der Eichkurve verglichen und so die Proteinkonzentration bestimmt.

#### 4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels der diskontinuierlichen, eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Polyacrylamid (PAA) als Trägermedium besitzt den Vorteil, dass die Porengröße des Gels durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid (AA) und Bisacrylamid (BAA) variiert und an die Größe der Proteine angepaßt werden kann. Der Zusatz von SDS zum Proteingemisch bewirkt die Zerstörung nicht kovalenter Wechselwirkungen in den nativen Proteinen und die Bildung eines SDS/Protein-Komplexes. Die Geschwindigkeit, mit der Proteine durch das SDS-haltige Gel im elektrischen Feld wandern, ist abhängig vom Vernetzungsgrad des Gels und von ihrem Molekulargewicht, da die Proteine denaturiert und proportional zum Molekulargewicht von dem stark negativ geladenen SDS umhüllt werden. Die Polyacrylamid-Gellösung (Trenngel) wurde zur Gelelektrophorese nach dem unten angegebenen Schema hergestellt, zwischen zwei Glasplatten in einer Mini-Gelapparatur (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> II, Bio-Rad) gegossen und mit 200  $\mu\text{l}$  Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Isobutanol mit Wasser entfernt und ein Sammelgel auf das Trenngel gegossen, um die Protein/SDS-Komplexe vor ihrer eigentlichen Auftrennung zu fokussieren. Die Proteinproben wurden mit 4x Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Es wurden jeweils 10  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Proteinprobe eingesetzt. Es wurde immer ein Proteingrößenstandard aufgetragen (Precision Plus Protein<sup>™</sup> All blue Standards, Biorad). Der Gellauf erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer für ca. 15 min bei 90 V. Nach Fokussierung der Proteine an der unteren Grenze des Sammelgels wurde die Elektrophoresespannung auf 130 V erhöht. Zur schnellen Anfärbung der durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, wurde „Simply Blue<sup>™</sup> SafeStain“ (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben angewendet.

	15%	12,5%	10%	7,5%
<b>bidest H<sub>2</sub>O</b>	1,23 ml	1,65 ml	2,1 ml	2,5 ml
<b>4x Trenngelpuffer</b>	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
<b>30% AA/BAA (37,5:1)</b>	2,5 ml	2,1 ml	1,7 ml	1,25 ml
<b>TEMED</b>	4 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$
<b>10% APS (w/v)</b>	70 $\mu\text{l}$	70 $\mu\text{l}$	70 $\mu\text{l}$	70 $\mu\text{l}$

Tab. 10: Trenngel

	3,9%
<b>bidest H<sub>2</sub>O</b>	2,1 ml
<b>4x Sammelgelpuffer</b>	0,84 ml
<b>30% AA/BAA (37,5:1)</b>	0,45 ml
<b>TEMED</b>	4 $\mu\text{l}$
<b>10% APS (w/v)</b>	70 $\mu\text{l}$

Tab. 11: Sammelgel:

<b>4x Trenngelpuffer (500 ml):</b>	Tris	91,00 g
	SDS	2,00 g
	pH 8,8 einstellen mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
<b>4x Sammelgelpuffer (500 ml):</b>	Tris	30,30 g
	SDS	2,00 g
	pH 6,8 einstellen mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
<b>10x SDS-Laufpuffer (20 ml):</b>	Tris	50,60 g
	SDS	40,00 g
	Glycin	288,40 g
	pH 8,3	
<b>4x Probenauftragspuffer:</b>	Glycerol	33,00%
	DTT	0,30 M
	SDS	6,70%
	Bromphenolblau	0,01%
	Tris-HCL (ph 6,8)	0,08 M
	anstatt DTT kann auch 12,5% β-Mercaptoethanol verwendet werden	

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte alternativ mit Hilfe käuflich erworbener Gradientengele (4-12%) der Firma Sigma nach Angaben des Herstellers.

#### 4.4 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus Polyacrylamid-Gelen wurden auf eine PVDF- (Polyvinylidendifluorid) Membran transferiert, wofür die negative Ladung der durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entstandenen SDS/Protein-Komplexe genutzt wird (Elektro-Blot). Für den Blot wurde die PVDF-Membran (Millipore, Eschborn) auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und für 1 min in Methanol, für 1 min in bidest. H<sub>2</sub>O und für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Zur Entfernung störender Salze wurden die PAA-Gele nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Sechs Blatt auf Gelgröße zugeschnittenes 1 mm Whatman-Papier wurden mit Transferpuffer getränkt und der Blot wie folgt luftblasenfrei in einer Semi-dry-Blot-Apparatur (Biometra, Göttingen) aufgeschichtet: Anode / 3 Blatt Whatman-Papier / PVDF-Membran / PAA-Gel / 3 Blatt Whatman-Papier / Kathode. Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke (4-5 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche) für 20-30 min. Nach Immobilisierung der Proteine auf der Membran wurde das Gel mit SimplyBlue™-SafeStain angefärbt, um die Effizienz des Blots zu überprüfen. Die Membran wurde gekennzeichnet, und es folgte die immunologische Detektion der Proteine.

<b>Transferpuffer:</b>	Tris-HCl (pH 8,3)	25,00 mM
	Glycin	150,00 mM
	Methanol	10,00% (v/v)
	bei 4°C lagern	

#### 4.5 Immunologische Detektion auf PVDF-Membranen immobilisierter Proteine

Für den spezifischen Proteinnachweis wurden die auf der Membran immobilisierten Proteine mit einem spezifischen primären Antikörper (AK) inkubiert. Nach Reaktion dieses Antikörpers mit seinem Antigen erfolgte in einem zweiten Schritt die Bindung eines sekundären Antikörpers an diesen Komplex. Die an den sekundären Antikörper konjugierte Peroxidase (HRP) katalysiert eine Lichtreaktion (Chemilumineszenz), welche mit einem Röntgenfilm detektiert wird und somit der Nachweis der gebildeten Komplexe möglich gemacht wird.

Vor der Immundetektion wurde die PVDF-Membran zur Absättigung freier Proteinbindungskapazitäten auf der Membran mit 4% (w/v) Milchpulver in TBST für mindestens 30 min bei RT oder bei 4°C ÜN

abgesättigt. Die Inkubation mit dem proteinspezifischen, primären Antikörper erfolgte in Antikörperlösung für 1-2 Stunden bei RT bzw. ÜN bei 4°C. Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen sind unter Kapitel 1.10 angegeben. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1 x TBST für je 10 min entfernt. Spezifisch gebundene, primäre Antikörper wurden mit einem gegen diese gerichteten, HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper (HRP, „Horse Radish Peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase) gebunden. Nach 1h Inkubation bei RT wurde der Blot dreimal 15 min mit TBST gewaschen. Die vom Antikörper detektierten Proteine wurden durch eine Chemilumineszenz-Reaktion identifiziert. Zu diesem Zweck wurde der „ECL™ Western-Blotting Detection Kit“ nach Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences) angewandt. Die erzeugte Chemilumineszenz wurde durch Exposition der Membran auf Autoradiographie-Filmen (ECL-Hyperfilm) sichtbar gemacht. In einigen Fällen wurden die Antikörper nach der Detektion mittels „Restore Western-Blot Stripping Puffer“ (Pierce) entsprechend den Herstellerangaben heruntergewaschen, und es konnte eine neue Immundetektion erfolgen.

<b>10x TBST-Puffer:</b>	Tris-HCl (pH 7,4)	0,20 M
	Natriumchlorid	1,50 M
	Tween 20	1,00%
	pH 7,5 mit HCl einstellen	

**Antikörperlösung:** 0,4% (w/v) Milchpulver in 1x TBST

#### 4.6 Aufreinigung der synaptosomalen Fraktion und der postsynaptischen Dichte (PSD)

Um eine nähere Einordnung von Proteinen in subsynaptische Kompartimente des Gehirns vorzunehmen, wurden die synaptosomale Fraktion und die postsynaptische Dichte aufgereinigt. Dabei war es wichtig, alle Arbeitsschritte sehr zügig und stets auf Eis sowie mit vorgekühlten Materialien durchzuführen. Es wurden die Gehirne von je fünf adulten Wildtyp- bzw.  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen nach der Dekapitation aus dem Schädel gelöst und jeweils in 5 ml Homogenisationslösung A homogenisiert. Nach Zentrifugation (für 10 min bei 1900 Upm und 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Gefäß überführt, das Pellet zur weiteren Homogenisierung erneut in 5 ml Homogenisationslösung A aufgenommen und danach nochmals abzentrifugiert (für 10 min bei 1900 Upm und 4°C). Die Überstände wurden vereint, die Membranen durch Zentrifugation bei 11.000 Upm für 10 min (4°C, Sorvall SS34) pelletiert und anschließend in jeweils 9 ml Homogenisationslösung B resuspendiert und wiederholt homogenisiert. Diese Rohpräparation (*crude membrane fraction*, CMF) konnte bei -80°C gelagert oder zur weiteren Aufreinigung eingesetzt werden.

Die weitere Fraktionierung erfolgte über einen Saccharosegradienten. Hierzu wurden für jeden Ansatz je drei SW40-Zentrifugenröhrchen jeweils mit folgenden Saccharoselösungen, beginnend mit der dichtesten, gefüllt: 3 ml 1,2 M Saccharose, 3 ml 1 M Saccharose und 2 ml 0,85 M Saccharose (jeweils in 4 mM HEPES, pH 7,6). Die Gradienten wurden sodann vorsichtig mit 3 ml der Rohpräparation beschichtet und daraufhin für 2 h bei 25.000 Upm (4°C, Sorvall SW41) zentrifugiert. Die als synaptosomale Fraktion bezeichnete weiße Bande grenzte sich zwischen 1,2 M und 1 M Saccharose deutlich ab und konnte nun sorgfältig mittels einer Pipette abgenommen werden. Gleiche Ansätze wurden gepoolt und bei -80°C gelagert.

Zur weiteren Aufreinigung wurde die synaptosomale Fraktion in 7,5 ml Homogenisationslösung B resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Triton-X-100-Lösung für 15 min bei 4°C unter Rühren versetzt. Die solubilisierten Proteine der postsynaptischen Dichte wurden durch 20 minütige Zentrifugation bei 16.500 Upm (4°C, Sorvall SS34) pelletiert, in 1 ml Homogenisationslösung B aufgenommen und schließlich in 100 µl Aliquots als PSD bei -80°C gelagert.

<b>Homogenisationslösung A:</b>	Sucrose	320,00 mM
	HEPES pH 7,4	4,00 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,00 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,50 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1:25
	PMSF	1:100
<b>Homogenisationslösung B:</b>	Sucrose	320,00 mM
	HEPES pH 7,4	4,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1:25
	PMSF	1:100
<b>Triton-X-100-Lösung:</b>	Triton-X-100	1,00%
	Sucrose	320,00 mM
	Tris-HCl pH 8,1	12,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1:25
	PMSF	1:100

#### 4.7 Herstellung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren

Die Antikörperherstellung basiert auf der humoralen Immunantwort eines Organismus bei Kontakt mit einer antigenen (immunogenen) Substanz. Dabei induzieren antigene Determinanten (Epitope) des körperfremden Stoffes die Antikörpersynthese. Handelt es sich bei dem Antigen um ein komplexes Molekül, wie z.B. ein Protein, sind eine Vielzahl antigener Determinanten exprimiert. Jede dieser Determinanten induziert die Differenzierung spezifischer B-Lymphozyten und die Bildung antikörpersezernierender Plasmazellen und damit die Ausschüttung von Antikörpern mit variierender biologischer Aktivität, Spezifität und Affinität. Man spricht daher auch von einem polyklonalen Antiserum.

##### 4.7.1 Expression und Aufreinigung des GST-CH-L-Fusionsproteins

Zur Herstellung eines geeigneten Antikörpers gegen das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein wurde die CH-Domäne in Kombination mit der Linkersequenz zwischen der CH- und der SH3-Domäne des Proteins als das zur Immunisierung von Kaninchen verwendete Antigen eingesetzt. Dazu wurde zunächst das entsprechende Genfragment in den Vektor pGEX-4-T3 kloniert. Dieser Vektor erlaubt die Expression von Proteinen als Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum*. Aufgrund der hohen Affinität zwischen Glutathion und GST können in *E.coli* überexprimierte GST-Fusionsproteine aus dem bakteriellen Lysat durch Affinitätschromatographie hochspezifisch aufgereinigt werden. Der GST-Anteil besitzt eine Größe von 26 kDa und bewahrt nach Expression in *E.coli* seine enzymatische Aktivität.

*E.coli* BL21 wurde mit dem Konstrukt pGEX-4-T3-GST- $\alpha$ Pix/Arhgef6[CH-L] transformiert, auf eine Ampicillin-haltige LB-Agarplatte (2.1) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (2.1) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und mit 200 Upm bei 37°C geschüttelt. Nach ca. 6 h wurde das gesamte Volumen dieser Vorkultur in 50 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und ÜN mit 200 Upm bei 37°C inkubiert. Diese Vorkultur wurde am darauffolgenden Tag in Ampicillin-haltigem TB-Medium 1:100 verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,6 bei 37°C und 200 Upm kultiviert (ca. 2-3 h). Durch Zugabe von IPTG (Isopropyl b-D-Thiogalactopyranosid, Endkonzentration 0,1 mM) wurde sodann die Expression des GST-CH-L-Fusionsproteins induziert. Nach einem Inkubationsschritt bei 30°C und 200 Upm für 1-2 h wurde die Bakterienkultur mit 6.000 Upm abzentrifugiert und das Pellet zur Zellyse in 50 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Um die bakterielle DNA zu scheren, wurde diese Lösung auf Eis sonifiziert. Danach wurde die Suspension in Corex-Glasröhrchen überführt und bei 12.000 Upm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, 1 ml „GST-Bind™ Resin“ (Glutathion-Kügelchen) zugefügt und die Lösung für 1 h bei 4°C auf einem Überkoprotator gemischt.

Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4.000 Upm und 4°C. Der Überstand wurde bis auf 4 ml entfernt und die restliche Glutathion-GST-Proteinlösung auf eine *Glutathion Sepharose 4B* (Säulen-Matrix) gegeben. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine erfolgte ein sechsmaliges Waschen der Säule mit jeweils 4 ml PBS bei 4°C. Um die an der Matrix gebundenen Fusionsproteine zu eluieren, wurde 1 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben, 10 min bei RT inkubiert und schließlich das Eluat aufgefangen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, die Eluate vereint und letztlich das GST-CH-L-Fusionsprotein gegen 1 x PBS ÜN dialysiert. Die Überprüfung der Qualität und Quantität der Proteine erfolgte mittels einer SDS-PAGE und einer folgenden Färbung mit „SimplyBlue™-SafeStain“ (4.3). Die Proteinsuspension wurde in Aliquots abgefüllt und bei -80°C gelagert.

#### **TB-Medium (1 l):**

<b>Lösung I:</b>	Bacto Tryptone	12,00 g
	Hefeextrakt	24,00 g
	Glycerol	4,00 ml
	auf 900 ml mit bidest. H <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren	
<b>Lösung II:</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 M
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,72 M
	in 90 ml bidest. H <sub>2</sub> O lösen, auf 100 ml auffüllen und autoklavieren	

Lösung I und Lösung II zusammenführen und entsprechendes Antibiotikum zugeben

<b>Lyse-Puffer:</b>	Tris-HCL, pH 8	50,00 mM
	NaCl	150,00 mM
	NP-40 (Igepal)	1,00%
	PMSF	1,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette/20 ml Puffer

#### **4.7.2 Herstellung des polyklonalen anti- $\alpha$ Pix/Arhgef6-Antiserums**

Das aufgereinigte GST-CH-L-Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von zwei Kaninchen genutzt. Die Immunisierung und Herstellung des Antiserums, welches im folgenden als anti-CH-L bezeichnet wird, wurde von der Firma „Biogenes“ durchgeführt. Die Injektion des GST-CH-L-Antigens wurde mehrmals in einem Rhythmus von zwei Wochen wiederholt, und das entnommene Antiserum wurde im Vergleich zum Präimmunserum auf entsprechende Immunreaktivitäten hin getestet. Konnte das Antiserum eine adäquate Menge des endogenen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins immunologisch auf Western-Blot-Ebene detektieren, so wurde zur weiteren Erhöhung der Spezifität eine affinitätschromatische Aufreinigung des anti-CH-L-Antikörpers veranlasst. Dazu wurden die Antiseren der mehrfach immunisierten Kaninchen über eine Bromcyan-Sepharose-Matrix mit kovalent gebundenen GST-CH-L-Fusionsprotein aufgereinigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche affinitätschromatische Aufreinigung dreimal in angemessenen Zeitabständen in Auftrag gegeben. Zeigte sich eine zufriedenstellende bzw. eine stagnierende Immunreaktivität der aufgereinigten Antiseren, so wurde das Ausbluten des Tieres veranlasst.

#### **4.7.3 Biochemische Affinitätsaufreinigung des polyklonalen anti-CH-L-Antiserums**

##### **Affinitätsaufreinigung über eine Nitrocellulosemembran**

Um die Konzentration des spezifischen anti-CH-L-Antikörpers zu und damit dessen Spezifität zu erhöhen wurde das Antiserum einer Affinitätsaufreinigung unterzogen. Dazu wurden alle Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels mit in CHO-K1-Zellen ektopisch exprimiertem  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein beladen. Nach Auftrennung wurden die Proteine auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und die äußeren Membranstreifen mit je einer Proteinspur abgetrennt.  $\alpha$ Pix/Arhgef6 wurde auf jedem

dieser Membranstreifen mittels des CH-L-Antiserums immunodetektiert. Um nun die entsprechenden Proteinbanden auf der verbleibenden Membran zu detektieren, wurden die Proteine mit Hilfe einer Ponceau-Färbelösung gefärbt und durch korrektes Anlegen der beiden äußeren Membranstreifen sowie der entsprechenden ECL-Hyperfilm-Streifen die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteinbanden identifiziert. Diese Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und zweimal für jeweils 30 min mit 1 x TBST-Puffer gewaschen. Daraufhin folgte eine zweistündige Inkubation mit dem anti-CH-L-Antiserum in einer 100fachen Verdünnung in 1 x TBST unter leichtem Schwenken bei RT. Die polyklonalen Antikörper wurden nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min durch Zugabe von 1,5 ml Elutionspuffer (0,2 M Glycin, pH 2,8, 0,2% BSA) 2 min bei RT schwenkend von der Membran eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 500  $\mu$ l 1 M Tris-Lösung neutralisiert und portioniert bei -20°C gelagert.

#### **Affinitätsaufreinigung mit Hilfe von Hirngewebeschnitten der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus**

Es wurden zunächst horizontale Gefrierschnitte des Gehirns einer  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mit einer Schnittdicke von 50  $\mu$ m angefertigt. Insgesamt zwölf Vertiefungen einer 24-Lochkulturplatte wurden mit jeweils zwei Gehirnschnitten pro Vertiefung befüllt. Es folgte eine 10 minütige Fixierung der Schnitte mit -20°C kaltem Methanol und daraufhin ein dreimaliges Waschen mit PBS für 5 min bei RT. Nach 30 minütigen Inkubation der Gewebeschnitte in Blocking-Lösung wurden diese mit 500  $\mu$ l CH-L-Antiserum (50-100fache Verdünnung) versetzt und 2 h bei RT leicht geschwenkt. In der Zwischenzeit konnten weitere Schnitte des Gehirns einer zweiten  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus angefertigt, in einer frischen 24-Lochkulturplatte gesammelt und in gleicher Weise wie oben beschrieben fixiert und geblockt werden. Anschließend wurden die Überstände des GST-CH-L-Antiserums des ersten Durchgangs auf die bereits vorgelegten Knockout-Schnitte des zweiten Durchgangs gegeben. Diese Vorgänge wurden zweimal wiederholt. Die in den verbleibenden Überständen befindlichen spezifischen anti-CH-L-Antikörper wurden gepoolt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

<b>Blocking-Lösung:</b>	BSA	2,00%
	Normal Goat Serum	3,00%
	Triton-X-100	0,20%
	in 1 x PBS	

#### **4.8 Cdc42/Rac1-Pull-Down-Experimente**

Zur Messung des Aktivitätszustandes von Cdc42 und Rac1 in Geweben der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus wurden Cdc42/Rac1-Pull-Down-Experimente durchgeführt. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren wie  $\alpha$ Pix/Arhgef6 stimulieren den Austausch von GDP nach GTP bei GTPasen und aktivieren diese somit. Aktive, GTP-gebundene GTPasen interagieren mit einem Effektorprotein (Ren et al., 1999). Als Effektorprotein von Cdc42 und Rac1 wurde die PAK[PBD]- („p21 activated kinase [p21-rho binding domain]“) Domäne als GST-Fusionsprotein GST-PAK[PBD] verwendet (Tapon und Hall, 1997). Die im Homogenat vorhandenen aktiven, GTP-gebundenen GTPasen interagieren spezifisch mit GST-PAK[PBD] und können somit präzipitiert werden. Die Menge von aktivem, GTP-gebundenem Cdc42 und Rac1 wird dann durch Western-Blot bestimmt.

#### **Aufreinigung des GST-PAK[PBD]-Fusionsproteins**

*E.coli* BL21 wurde mit dem Konstrukt pGEX-2TK-GST-PAK[PBD] transformiert, auf eine Ampicillin-haltige LB-Agarplatte ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Die Herstellung einer Vorkultur mit entsprechenden Medium und die Expression des GST-PAK[PBD]-Fusionsproteins erfolgte wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml GTBLI-Puffer resuspendiert und 10-20

min. bei 4°C auf einem Überkoprotator inkubiert. Dann wurden 8 ml GTBLII-Puffer dazugegeben und die Suspension wurde wieder für 10 min. bei 4°C auf einem Überkoprotator gemischt. Um die bakterielle DNA zu scheren, wurde diese Lösung auf Eis sonifiziert. Danach wurde die Suspension in Corex-Glasröhrchen überführt und bei 12.000 Upm und 4°C für 45 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert, 1 ml „GST-Bind™ Resin“ (Glutathion-Kügelchen) wurde zugefügt und die Lösung für 1 Std. bei 4°C auf einem Überkoprotator gemischt. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt für 1-2 min. von 2.500 Upm bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 4x mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden 500 µl Lagerungspuffer dazugegeben, die Proteinsuspension in 50 µl Aliquots abgefüllt und bei -80°C gelagert.

<b>GTBLI-Puffer:</b>	Tris-HCl (pH 8)	50,00 mM
	EDTA	40,00 mM
	Sucrose	25,00% (w/v)
	PMSF	1,00 mM
	EDTA	720,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette/20 ml Puffer

<b>GTBLII-Puffer:</b>	Tris-HCl (pH 8)	50,00 mM
	MgCl <sub>2</sub>	100,00 mM
	Triton X-100	0,20%
	PMSF	1,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette/20 ml Puffer

<b>Waschpuffer:</b>	Tris-HCl (pH 8)	50,00 mM
	NaCl	50,00 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5,00 mM
	PMSF	1,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette/20 ml Puffer

### **Herstellung von Proteinlysate und Cdc42/Rac1-Pull-Down**

Die Herstellung einer zytosolischen Proteinfraction von Gesamthirn, Cortex, Cerebellum sowie Hippocampus erfolgte wie in Kapitel 4.1 beschrieben. Dabei wurde das Gesamthirn in 5 ml, der Cortex und das Cerebellum in 2 ml Lysispuffer überführt. Um eine möglichst hohe Proteinausbeute aus dem Hippocampus zu erzielen, wurden die Hippocampi von zwei Mäusen gepoolt und diese zusammen in 800 µl Lysispuffer verarbeitet. Aus diesen Ansätzen wurden 500 µl mit 50 µl des aufgereinigten GST-PAK[PBD]-Fusionsproteins vermischt und 45 min. lang bei 4°C auf einem Überkoprotator langsam gemischt. Danach wurden die Suspensionen mit 2.500 Upm bei 4°C 2 min. abzentrifugiert und 4x mit Lysepuffer (4.1) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 20 µl abgehoben und verworfen. Der Rest wurde mit 8 µl 4x SDS-Probenauftragungspuffer vermischt (Präzipitat). Rohlysate und Präzipitate wurden für 5 min. aufgekocht und mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Immundekdetion analysiert. Das Rac1-Protein wurde mit Hilfe des anti-Rac1-, das Cdc42-Protein mit Hilfe des anti-Cdc42-Antikörpers nachgewiesen.

## **5. Histologische Methoden**

### **5.1 Perfusionsfixierung von Mäusen**

Vor der Perfusionsfixierung wurden die Mäuse zunächst durch die Injektion eines Anästhetikums, welches sich aus 0,8% (w/v) Xylazinhydrochlorid und 1,2% (w/v) Ketaminhydrochlorid in 1 x PBS zusammensetzt, narkotisiert (100 µl pro 10 g Körpergewicht). Das Herz wurde freigelegt und eine an eine peristaltische Pumpe (Gilson) angeschlossene Kanüle in die linke Herzkammer geschoben und mit einer Klemme fixiert. Durch die Kanüle wurde zunächst 20 ml Heparinlösung (0,01% Heparin in 1 x

PBS) mit einem Druck von 140 mm Hg und dann 150 ml 4% Paraformaldehyd gepumpt. Das Öffnen des rechten Vorhofes im Herz verhinderte das Aufstauen der Lösungen. Dieser Vorgang führte zur Fixierung des gesamten Körpers. Die zu untersuchenden Organe wurden unmittelbar präpariert und ÜN bei 4°C in 4% Paraformaldehyd nachfixiert.

## **5.2 Anfertigung von Gewebeschnitten**

### **5.2.1 Paraffinschnitte**

Das perfundierte Gewebe wurde mittels einer aufsteigenden Isopropanolreihe entwässert (3 h 60%, 2 h 75%, 2 h 90% und ÜN 100%) und anschließend für 12 h bei 63°C in einem Isopropanol-Paraffin-Gemisch (1:1) sowie in reinem Paraffin UN inkubiert. Nach dem Ausgießen in Paraffin wurden die mit den Geweben enthaltenen Blöcken zum Aushärten ÜN bei 4°C belassen. Am Vibratom wurden dann von den in Paraffin eingebetteten fixierten Geweben horizontale Schnitte mit einer Dicke von 5-10 µm angefertigt und in warmem Wasser bei 45°C gestreckt. Mit einem Haarpinsel wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgezogen und ÜN bei 37°C getrocknet.

### **5.2.2 Gefrierschnitte**

In dieser Arbeit wurden Gefrierschnitte von Organen nicht-perfundierter Mäuse angefertigt. Dazu wurde das bei -80°C gelagerte Gewebe sowie auf Trockeneis gefrorene, frisch präparierte Organe einige Zeit auf Schneidetemperatur (-18 bis -24°C) äquilibriert. Je nach Größe des zu schneidenden Gewebestücks wurde bei RT ein entsprechend großer Tropfen des flüssigen Einbettmediums (Tissue-Tek, Sakura) auf eine kalte Metallplatte getropft, das Gewebe auf diesen Tropfen gesetzt und in den Kryostat zurückgelegt. Nach Festigung des Einbettmediums und damit der Arretierung des Gewebes konnte diese Metallplatte in den dafür vorgesehenen Einsatz angebracht und Gefrierschnitte mit einer Dicke von 4-10 µm angefertigt werden. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger bei RT aufgezogen und nach Trocknung für 1h bei RT bei -20°C aufbewahrt.

## **5.3 Histologische Färbungen**

### **5.3.1 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung**

Bei Verwendung frisch aufgezogener Paraffinschnitte wurden diese zunächst dreimal kurzzeitig in 1 x PBS gewaschen, während die bei -80°C gelagerten Schnitte vorab aufgetaut wurden. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte für 8 min in ein erstes, dann für weitere 3 min in ein zweites Xylolbad getaucht. Darauf folgte die Rehydrierung des Gewebes mittels einer absteigenden Ethanolreihe (4 min in 100%, 4 min in 90%, 4 min in 70%, 4 min in 50%, 2 min in bidest. H<sub>2</sub>O). Zur Blaufärbung der Kerne wurden die Schnitte 10 min in 20% Hämalaun-Lösung inkubiert, in bidest. H<sub>2</sub>O für 8 min gespült und in HCl-Ethanol (1% HCl in 70% Ethanol) differenziert bis keine Farbstoffwolken mehr abgegeben wurden. Die Schnitte wurden in bidest. H<sub>2</sub>O mehrfach gespült und anschließend zur Anfärbung des plasmatischen Anteils der Gewebezellen 5 min in 0,3% Eosin-Lösung gefärbt. Nach wiederholten Waschschritten in bidest. H<sub>2</sub>O durchliefen die Gewebeschnitte folgende Ethanolreihe: 10 s in 50%, 30 s in 70%, 1 min in 90%, 4 min in 100%. Nach einer Äquilibrierung der Schnitte in Xylol für 6 min wurden diese luftblasenfrei in Entellan eingedeckelt und ÜN unter dem Abzug getrocknet.

### **5.3.2 Histochemische Färbungen mit Diaminobenzidin**

Der spezifische Nachweis/Visualisierung beruht auf der PAP-Methode (Peroxidase-Antiperoxidase-Markierung), bei der die an den Zweit-Antikörper konjugierte Peroxidase eine Enzymreaktion mit

einem farbgegebenen Substrat katalysiert, durch die an Stelle des gesuchten Antigens ein Präzipitat entsteht.

Alle folgenden Schritte fanden, wenn nicht anders erwähnt, bei RT unter orbitaler Schüttelbewegung bei Waschsritten sowie in einer Feuchtekammer während der Inkubationen statt.

Es wurden Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm (5.2.2) angefertigt, etwa 30 min getrocknet, danach in -20°C kaltem Methanol für 20 min fixiert und anschließend wiederum für 1 h unter dem Abzug getrocknet. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen folgte eine 30 min Inkubation in einer 0,3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Nach zweimaligem Waschen in 1 x PBS für jeweils 5 min wurden die Schnitte für 30 min in Blocking-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu vermindern. Das in der Blocking-Lösung enthaltene Triton-X-100 führt dabei zu einer Permeabilisierung des Gewebeschnittes, wodurch das Gewebe für die Antikörper durchlässig wird. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers in seiner jeweiligen Verdünnung in Blocking-Lösung bei 4°C ÜN. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für je 5 min in 1 x PBS gewaschen und folgend mit dem biotinylierten sekundären Kaninchen-Antikörper nach Herstellerangaben („Vectastain ABC-Kit“, Vector Laboratories) für 1 h versetzt. Nach erneutem dreimaligen Waschen für jeweils 5 min wurden die Schnitte mit den Lösungen A und B des „Vectastain ABC-Kits“ nach Angaben des Herstellers bei RT inkubiert. Nach 30 min Inkubation folgten drei Waschsritte für jeweils 5 min. Die Färbereaktion erfolgte dann durch Zugabe der Substrat-Chromogenlösung DAB (Diaminobenzidin) nach Angaben des Herstellers (Dako), bei der DAB durch die Peroxidase zu einem braunen unlöslichen Präzipitat umgesetzt wird. Die Färbereaktion wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und bei entsprechend gewünschter Farbintensität durch Überführen der Schnitte in bidest. H<sub>2</sub>O gestoppt. Zur Überprüfung des Anteils markierter Zellen an der Gesamtheit aller Zellen erfolgte eine Kernfärbung der Gewebezellen durch die Inkubation in einer 50% Hämalaun-Lösung für 30 s. Die Schnitte wurden dann ausgiebig in bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen, für 1 h getrocknet und mit Einbettungsmedium (Permanent Mounting Medium, Clarion) eingedeckelt.

<b>Blocking-Lösung:</b>	BSA	2,00%
	Normal Goat Serum	3,00%
	Triton-X-100	0,20%
	in 1 x PBS	

## 6. Zellbiologische Methoden

### 6.1 Zellkultur

#### 6.1.1 Allgemeine Inkubationsbedingungen

Für die Zellkulturexperimente wurden verschiedene Zelllinien sowie hippocampale Neurone und Gliazellen aus der Maus verwendet. Diese Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in Begasungsbrutschränken gehalten. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Die Zellen wurden als adhärenente Monolayer-Kulturen in Polystyren-Gefäßen kultiviert. Dabei erfolgte die Kultivierung in Zellkulturgefäßen mit 75 cm<sup>2</sup> oder 150 cm<sup>2</sup> Grundfläche.

#### 6.1.2 Kultivierung verschiedener Zelllinien

Die Kultivierung von CHO-Zellen erfolgte in „F-12 Nutrient Mixture“ (Ham) mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin. Alle anderen Zellen wurden in „Dulbecco’s modifiziertem Eagle Medium“ (DMEM) mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin gehalten. Diese Zusammensetzungen werden

im folgenden Vollmedium genannt. Für Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen auf Deckgläschen in 24-Loch-Kulturplatten kultiviert.

### 6.1.3 Passagieren von Zellen

Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden die Zellen etwa alle drei bis vier Tage (bei ungefähr 90% Konfluenz) auf neue Kulturschalen umgesetzt. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums einmal mit 10 ml PBS gewaschen, um im Rinderserum enthaltene Proteinaseinhibitoren zu entfernen. Durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA, Inkubation bei 37°C und leichtes Abklopfen wurden die Zellen von der Platte gelöst. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Menge der benötigten Zellen wurden die Zellen mit frischem Vollmedium zwischen 1:2 und 1:20 verdünnt, mit der Pipette dissoziiert und auf frische Kulturschalen verteilt.

### 6.1.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut. Dazu wurden die gefrorenen Zellaliquots direkt aus dem Stickstoff in einem 37°C Wasserbad erwärmt und unmittelbar nach dem Auftauen in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellen wurden bei 1.000 Upm für 10 min abzentrifugiert und das Sediment in 10 ml Vollmedium auf eine Kulturschale überführt. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese mittels Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst und in 10 ml Vollmedium aufgenommen. Die Zellen wurden für 10 min bei 1000 Upm abzentrifugiert und in 3 ml Vollmedium resuspendiert. Zur Vermeidung von Eiskristallen wurde dem Vollmedium 10% DMSO zugegeben. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (Nunc) auf 1 ml Aliquots verteilt, für 1 h bei 4°C abgekühlt, anschließend über Nacht auf Trockeneis gelagert und am folgenden Tag in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 6.1.5 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofectamin<sup>TM</sup>2000-Reagenz

Die in dieser Arbeit verwendete Transfektionsmethode mit dem Lipofectamin<sup>TM</sup>2000-Reagenz (Invitrogen) beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Dazu werden kationische Lipide eingesetzt, die durch ionische Interaktion mit der eingesetzten Plasmid-DNA Lipid-DNA-Komplexe bilden. Diese werden dann endocytotisch von den Zellen aufgenommen und die DNA wird intrazellulär freigesetzt. Am Tag vor der Transfektion wurden  $1,2 \times 10^6$  CHO-K1- bzw. COS-7-Zellen ausgesät, so dass sie für die Transfektion etwa 80-90% Konfluenz erreichten. Die optimalen DNA- und Lipofectamin<sup>TM</sup>2000-Reagenz-Verdünnungen wurden für die verschiedenen Plasmide und Zelllinien jeweils ausgetestet. Zur Transfektion wurden Lösung I (400 µl Optimem1-Medium und 5-15 µg Plasmid-DNA) und Lösung II (400 µl Optimem1-Medium und 10-30 µl Lipofectamin<sup>TM</sup>2000-Reagenz) angesetzt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend vermengt. Diese Transfektionslösung wurde dann gut vermischt und 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 3,2 ml erwärmtem Optimem1-Medium bedeckt. Anschließend wurde die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben, durch leichtes Schwenken die Lösung vermischt und 6 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Zeit ist in der Regel der Transfektionsvorgang abgeschlossen und die Transfektionslösung wurde abgesaugt. Die Zellen wurden in 10 ml Vollmedium für weitere 18-28 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und konnten nun für weiterführende Experimente verwendet werden. Für Immunfluoreszenzexperimente mit transient transfizierten Zellen wurden diese auf Deckgläschen in 24-Loch-Kulturplatten angezogen. In diesem Fall wurden für die Lösung I 50 µl Optimem1 und 1-2 µg Plasmid-DNA und für die Lösung II 50 µl Optimem1 und 3-5 µl Lipofectamin<sup>TM</sup>2000 eingesetzt. Die Zellen wurden mit 400 µl Optimem1-Medium bedeckt und nach der Transfektion in 800 µl Vollmedium inkubiert.

### 6.1.6 Kultivierung embryonaler primärer Hippocampus-Neurone der Maus und Herstellung eines neuronalen Proteinlysates

#### Vorbereitung der Deckgläschen

Die Kultivierung primärer Hippocampus-Neurone erfolgte auf vorbehandelten und beschichteten Deckgläschen. Dafür wurden die Deckgläser (18 mm) für 4 h in 100% Ethanol unter leichtem Schwenken gewaschen und anschließend zweimal mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Trocknung und Sterilisation wurden die Deckgläser ÜN bei 200°C gebacken. Um ein optimales Anheften der Zellen zu gewährleisten, wurden die Deckgläser bei RT für 2 h mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin in 0,1 M Boratpuffer pH 8,5 beschichtet und im Anschluss zweimal mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen.

Alternativ angewandte Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen der Firma BD Biosciences wurden vor der Zellausplattierung mit Laminin (40 µg/µl in MEM-Medium) für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen.

#### Präparation und Kultivierung von Hippocampus-Neuronen

Zur Kultivierung embryonaler primärer Hippocampus-Neuronen wurden zunächst die Hippocampi aus den Cortex-Hemisphären der Gehirne von Wildtyp- bzw. *αPix/Arhgef6*-Knockout-Embryonen (E 16 – E 18) präpariert und nach Entfernen der Meningen mit 1 x HBSS („Hanks buffered salt solution“, Gibco BRL) gewaschen. Um einer Bakterien-Kontamination des Gewebes vorzubeugen, wurde der HBSS-Puffer mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt. Die Hippocampi wurden dreimal mit 3 ml Dissection-Lösung gewaschen und anschließend in 1,8 ml Trypsin-Lösung für 5 min bei RT inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Gewebe viermal mit jeweils 3 ml Dissection-Lösung gewaschen und mit 2,5 ml Trypsininhibitor-Lösung versetzt. Nach 5 min wurde der Überstand erneut abgenommen und durch 1,5 ml frische Trypsininhibitor-Lösung für 3 min ersetzt. Zur vollständigen Inaktivierung restlichen Trypsins folgte eine 10 minütige Inkubation mit Protease-Inhibitoren enthaltener Serum-Lösung. Im Anschluss wurden die Hippocampi viermal mit Dissection-Lösung gespült, um die nun in der Lösung enthaltenen, hoch konzentrierten Serumproteine auszuwaschen. Die Hippocampi wurden in 1 ml DNase-Lösung aufgenommen, zur Auflösung des Gewebes in Einzelzellen mit einer feuerpolierten Pasteurpipette etwa 10 x auf- und abpipettiert (Trituration) und die Ansätze anschließend für 1-2 min stehengelassen. Durch die Sedimentation nicht vereinzelter Gewebestücke konnten die im Überstand befindlichen trituierten Einzelzellen abgenommen werden. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden beide Zellsuspensionen gepoolt, in 5 ml Dissection-Lösung verdünnt und für 15 min bei 1.000 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Plattiermedium auf eine Zelldichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen/ml verdünnt und zu je 400 µl (24-Lochkulturplatten) bzw. 1 ml (12-Lochkulturplatten) auf die vorbereiteten Deckgläser gegeben. Nach Inkubation von 3 h bei 37°C in 5%iger Atmosphäre wurde das Plattiermedium gegen Neurobasal-Medium mit zugesetztem Glutamat ersetzt (1 ml pro Vertiefung). Die Zugabe von Glutamat zum Medium erfolgte nur am Tag der Präparation, da Neurone während ihrer Differenzierung eine höhere Konzentration an Glutamat benötigen als in ihrem ausgereiften Stadium. Um das Wachstum von nicht-neuronalen (Gliazellen, Fibroblasten etc.) zu hemmen, wurden 2 bis 3 Tage nach der Präparation dem Medium 4 µM AraC (Cytosine-β-D-Arabinofuranoside) zugesetzt. Die Neuronen konnten bis zu 3 Wochen in Kultur gehalten werden, wobei zweimal die Woche die Hälfte des Mediums durch frisches Neurobasal-Medium ohne Glutamat ersetzt wurde.

#### **Hanks-Lösung (1l):**

Mediumpulver ( <i>Hanks` balanced salts</i> )	1 Aliquot
NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g
HEPES	10,00 mM
D-Glukose	6,00 g
Gentamycin	5,00 µg/ml
pH 7,4, steril filtrieren, bei 4°C lagern	

<b>Dissection-Lösung (240 ml):</b>	Hanks-Lösung	240,00 ml
	Albumin, bovine serum	720,00 mg
	MgSO <sub>4</sub>	347,00 mg
	pH 7,4, steril filtrieren, bei 4°C lagern	
<b>Digestion-Lösung (100 ml):</b>	NaCl	800,00 mg
	KCl	37,00 mg
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	99,00 mg
	HEPES	595,00 mg
	NaHCO <sub>3</sub>	35,00 mg
	pH 7,4, steril filtrieren, bei 4°C lagern	
<b>Trypsin-Lösung (1,8 ml):</b>	Digestion-Lösung	1,80 ml
	Trypsin	6,00 mg
	DNase I (15 x 10 <sup>4</sup> Units)	1,50 mg
	steril filtrieren	
<b>Trypsininhibitor-Lösung (4 ml):</b>	Dissection-Lösung	4,00 ml
	Trypsininhibitor	2,40 mg
	DNase I (15 x 10 <sup>4</sup> Units)	1,50 mg
	steril filtrieren	
<b>Serum-Lösung (1,8 ml):</b>	Dissection-Lösung	2,50 ml
	Pferdeserum	0,50 ml
<b>DNase-Lösung (2,5 ml):</b>	Dissection-Lösung	2,50 ml
	DNase I (15 x 10 <sup>4</sup> Units)	1,00 mg
<b>Plattiermedium:</b>	Glucose	0,60% (w/v)
	Pferdeserum	10,00% (v/v)
	in MEM	
<b>Neurobasalmedium mit Glutamat:</b>	1 x B-27 Supplement	
	L-Glutamin	500,00 µM
	Glutamat	25,00 µM

### Herstellung eines neuronalen Proteinlysates

Zur Herstellung eines neuronalen Zelllysates wurden embryonale primäre hippocampale Zellen der Wildtyp- bzw. der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus isoliert und in AraC-freiem Neurobasal-Medium in 24-Lochkulturplatten auf präparierten Deckgläsern kultiviert (6.1.6). Nach 24 h Kultur wurde das Medium durch frisches Neurobasal-Medium ohne Glutamat mit dem Zusatz von 4 µM AraC ersetzt. Nach weiteren 36 h wurden die Zellen auf Eis zweimal mit eiskaltem 1 x HBSS gewaschen, in 100 µl eiskaltem Lysepuffer abgeschabt und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Proteinlysate bei -80 °C weggefroren.

<b>Lyse-Puffer:</b>	Tis-HCl , pH 8	50,00 mM
	NaCl	150,00 mM
	NP-40 (Igepal)	1,00%
	PMSF	1,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette/10 ml Puffer

### **6.1.7 Kultivierung primärer Astrozyten postnataler Mäuse und Herstellung eines Astrozytenangereicherten Proteinlysates**

Zur Kultivierung primärer Astrozyten wurden beide Cortexhälften von postnatalen Wildtyp- bzw. *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäusen (P 2) präpariert, in 1 x HBSS auf Eis überführt und von Meningen befreit. Die jeweiligen Cortex-Hälften wurden mit einem Skalpell grob zerkleinert, in ein Falcon mit 3 ml Trypsin-Lösung pro Cortex überführt und für 15 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Um eine effizientere Vereinzelnung der Cortex-Zellen zu erreichen, wurde die Zellsuspension während dieser Inkubation mehrfach kräftig geschüttelt. Die Gewebestückchen wurden mit dem zweifachen Volumen

Gliazell-Medium versetzt und für 5 min bei RT und 900 Upm pelletiert. Nach der Aufnahme des Gewebe-Pellets in 8 ml Gliazell-Medium erfolgte die Trituration des Gewebes mit einer feuergeglätteten Pasteurpipette. Die dissoziierte Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (1.3) filtriert und das Filtrat für 5 min bei RT und 900 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit Gliazell-Medium auf eine Zelldichte von  $8 \times 10^4$  Zellen/ml verdünnt und zu je 10 ml auf ein Kulturgefäß mit  $75 \text{ cm}^2$  Grundfläche verteilt. Nach 24 h Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  erfolgte ein Mediumwechsel mit frischem Gliazell-Medium und im Verlauf der weiteren Kultivierung ein Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage. Durch diese Kultivierung ließen sich weitgehend homogene Astrozyten-Kulturen gewinnen, die nach ca. 3 Wochen biochemisch analysiert werden konnten. Dazu wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 5 ml eiskaltem 1 x HBSS gewaschen, in 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem Lysepuffer abgeschabt und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Proteinlysate bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren.

<b>Trypsin-Lösung:</b>	Trypsin (Sigma)	2,50%
	DNase I ( $15 \times 10^4$ Units)	0,09%
	in 1 x HBSS	
	steril filtrieren	
<b>Gliazell-Medium:</b>	MEM	500,00 ml
	Glukose	0,60%
	Pferdeserum	10,00%
	Penicillin	100,00 U/ml
	Streptomycin	100,00 $\mu\text{g/ml}$
<b>Lyse-Puffer:</b>	Tis-HCl, pH 8	50,00 mM
	NaCl	150,00 mM
	NP-40 (Igepal)	1,00%
	PMSF	1,00 mM
	Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette/10 ml Puffer

## 6.2 Isolierung hippocampaler Zellen der adulten Maus, Anreicherung verschiedener Zellpopulationen mittels Dichtegradientenzentrifugation und Herstellung eines Proteinlysates

Zur selektiven Anreicherung von Neuronen und einzelnen Gliazellpopulationen wurde die Dichtegradientenzentrifugation angewandt, bei der verschiedene Zelltypen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt werden. Zur Präparation vereinzelter Hippocampuszellen wurde der Hippocampus zunächst aus den beiden Cortex-Hälften einer adulten Wildtyp- und  $\alpha\text{Pix/Arhgef6}$ -Knockout-Maus präpariert. Dies erfolgte in 1 x HBSS auf Eis. Der Hippocampus wurde in 400  $\mu\text{l}$  Trypsin/DNase in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert und 15 min bei RT inkubiert. Das Gewebe wurde in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und zur vollständigen Inaktivierung restlichen Trypsins in 1 x HBSS/Protease-Inhibitor-Lösung gewaschen. Nach Zentrifugation des Gewebes für 1 min bei 900 Upm wurde der Überstand verworfen und erneut in 1 x HBSS/Protease-Inhibitor-Lösung gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und anschließend das Sediment in 1 ml DNase-Lösung aufgenommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Gewebe mit einer feuerpolierten Pasteurpipette mehrmals auf- und abpipettiert (Trituration) und die Ansätze anschließend für 1-2 min stehengelassen. Durch die Sedimentation nicht vereinzelter Gewebestücke konnten so die vereinzelter Zellen im Überstand abgenommen werden. Dieser Vorgang wurde mit zwei Pasteurpipetten mit jeweils kleiner werdender Öffnung wiederholt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen gepoolt, in 6 ml Neurobasal/PI-Medium verdünnt und die Zellsuspension über ein Zellsieb (1.3) filtriert. Nach Zentrifugation bei 10 min für 900 Upm wurde das Zellpellet erneut in 6 ml Neurobasal/PI-Medium resuspendiert. Während des letzten Zentrifugationsschrittes wurde der Dichtegradient vorbereitet, welcher aus vier verschiedenen Trennschichten besteht. Zur Herstellung

eines für Mauszellen optimierten Dichtegradienten wurde durch Verdünnung mit Neurobasal/PI-Medium jeweils eine 50%, 45%, 40% und 30%ige Optiprep-Trennlösung mit einem Endvolumen von 1 ml angesetzt und diese zur Schichtung des Gradienten mit einer Pipette langsam in ein 15 ml-Falcon entlang der Wandung gegeben. Dabei liegt die höchste Dichte (50%) am Boden des Zentrifugenglases, und jede Schicht hat eine größere Dichte als die unmittelbar darüber liegende Schicht. Die Zellsuspension wurde danach vorsichtig auf die Oberfläche der letzten Optiprep-Trennschicht (30%) gegeben und der gesamte Ansatz 15 min bei 1900 Upm und RT zentrifugiert. Durch die Fliehkraft sedimentieren einzelne Zelltypen aufgrund ihrer Dichtunterschiede in die entsprechende Trennlösung. Je größer der Dichteunterschied zwischen einem bestimmten Zelltyp und der Trennlösung ist, desto schneller wandern die Zellen durch diese Lösung. Ist die Dichte dieser Zellen gleich der der Trennlösung, so stellt sich ein Gleichgewicht ein und die Zellen befinden sich an einer definierten Stelle des Zentrifugenglases. Nach Abbruch der Zentrifugation wurden die als Fraktion 1-4 bezeichneten, einzelnen Zellpopulationen mit einer Pipette entnommen, jeweils in 5 ml Neurobasal/PI-Medium gewaschen und für 10 min bei 900 Upm und RT abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Nach Pelletierung der Zellen wurden diese in 5 ml 1 x HBSS gewaschen und erneut für 10 min bei 900 Upm und RT abzentrifugiert. Zur Lyse der Zellen wurden diese auf Eis in einem adäquaten Volumen Lysispuffer (Fraktion 1: 30 µl; Fraktion 2: 200 µl; Fraktion 3: 30 µl; Fraktion 4: 30 µl) resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis bei -80°C weggefroren.

<b>DNase-Lösung:</b>	DNase in 1 x HBSS	0,50%
<b>Trypsin/DNase (1 ml):</b>	Trypsin/EDTA DNase-Lösung	400,00 ml 600,00 ml
<b>HBSS/Protease-Inhibitor-Lösung:</b>	PMSF Complete Mini Protease Inhibitor in 1 x HBSS	1,00 mM 1 Tablette/5 ml
<b>Neurobasal/PI-Medium</b>	PMSF Complete Mini Protease Inhibitor in Neurobasal	1,00 mM 1 Tablette/5 ml
<b>Lyse-Puffer:</b>	Tis-HCl , pH 8 NaCl NP-40 (Igepal) PMSF Complete Mini Protease Inhibitor	50,00 mM 150,00 mM 1,00% 1,00 mM 1 Tablette/10 ml Puffer

### 6.3 Immunfluoreszenz-Analysen

Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen wurde mittels Immunfluoreszenzexperimenten untersucht. Dazu wurden CHO-K1- oder COS-7-Zellen auf Deckgläschen in 24-Lochkulturplatten ausgesät und am darauffolgenden Tag transient mit den zu untersuchenden Konstrukten transfiziert. 24 h nach der Transfektion konnte mit der Immunfluoreszenzfärbung begonnen werden. Für die Immunfluoreszenzfärbung an kultivierten primären Neuronen (6.1.6) wurden fünf bis zehn Tage alte Hippocampusneurone verwendet. Es erfolgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit PBS+/+ (4°C) und zur Fixierung eine anschließende 10 minütige Inkubation in 500 µl PFA-Lösung. Nach dreimaligem 10 minütigen Waschen mit PBS+/+ folgte zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen eine Inkubation in 500 µl Blockierungslösung bei RT für 30-60 min. Darauf folgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper in 200 µl Antikörper-Lösung für 2 h bei RT. Danach wurden die Zellen zweimal mit 1 ml Hoch-Salz-PBS+/+ und zweimal mit 1 ml PBS+/+ für jeweils 10 min bei RT

gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation in 200 µl Antikörperlösung mit einem entsprechenden fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS<sup>+/+</sup> für jeweils 10 min wurden die Zellen anschließend in Glycerol-Gelatine (Sigma) oder VECTASHIELD® Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf Objektträgern eingebettet. Bei Verwendung primärer Antikörper mit direkter Fluoreszenzmarkierung erfolgte nach Inkubation mit diesem ein zweimaliges Waschen mit 1 ml Hoch-Salz-PBS<sup>+/+</sup> und ein dreimaliges Waschen mit 1 ml PBS<sup>+/+</sup> für jeweils 10 min bei RT. Im Anschluss wurden die Zellen in Glycerol-Gelatine eingebettet. Die simultane Darstellung von zwei Proteinen, mittels welcher Kolkalisationen untersucht werden können, wird durch die Verwendung von primären Antikörpern aus verschiedenen Spezies ermöglicht. Die Detektion der Erstantikörper wurde dann mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten sekundären Antikörpern ermöglicht.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop Leica DM RA (Leica Mikrosysteme, Bensheim) und der CytoVision™-Software (Applied Imaging, Newcastle, GB) oder am konfokalen Laserscan Inversmikroskop Leica TCS-NT (Leica Mikrosysteme, Bensheim) mit der zugehörigen Leica TCS-Software. Wurde für den Nachweis eines Proteins ein Cy3- bzw. Alexa-Fluor®568-konjugierter Antikörper verwendet, so wurde dieser mit Hilfe eines TexasRot-Filters (Leica; Anregung 576 nm, Emission 628 nm) bzw. eines Helium-Neon-Lasers (Anregung 543 nm, Emission 570 nm) visualisiert. Erfolgte der Nachweis eines Proteins über einen Fluorescein- bzw. einen Alexa-Fluor®488-konjugierten Antikörper, so wurde für dessen Visualisierung ein L5-Filter (Leica; Anregung 480 nm, Emission 505 nm) bzw. ein Argon-Laser (Anregung 488 nm, Emission 515-525 nm) verwendet. Die Aufnahmen wurden anschließend mit dem Programm Jasc Paint Shop Pro™ Version 7.0 (Jasc Software, Panningen, NL) weiterbearbeitet.

<u>Name</u>	<u>Anregungswellenlänge</u>	<u>Emissionswellenlänge</u>
Fluorescein	488 nm	515 nm
Alexa-Fluor®488	495 nm	519 nm
Cy3 (Cyanin 3)	552 nm	568 nm
Alexa-Fluor®546	556 nm	573 nm
Texas®Rot	591 nm	608 nm
<b>PBS:</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,10 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50 mM
	NaCl	137,00 mM
	KCl	2,70 mM
	pH 7,3 mit HCl einstellen	
<b>PBS<sup>+/+</sup>:</b>	CaCl <sub>2</sub>	0,50 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1,00 mM
	in 1 x PBS	
<b>Hoch-Salz-PBS<sup>+/+</sup>:</b>	NaCl	500,00 mM
	in 1 x PBS <sup>+/+</sup>	
<b>PFA-Lösung:</b>	Paraformaldehyd	4,00%
	in 1 x PBS <sup>+/+</sup> , durch einen Filter filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern	
<b>Blockierungs-Lösung:</b>	BSA	2,00%
	Ziegen-Serum	3,00%
	NP-40	0,50%
	in 1 x PBS <sup>+/+</sup>	
<b>Antikörper-Lösung:</b>	Ziegen-Serum	3,00%
	NP-40	0,10%
	in 1 x PBS <sup>+/+</sup>	

## IV. Ergebnisse

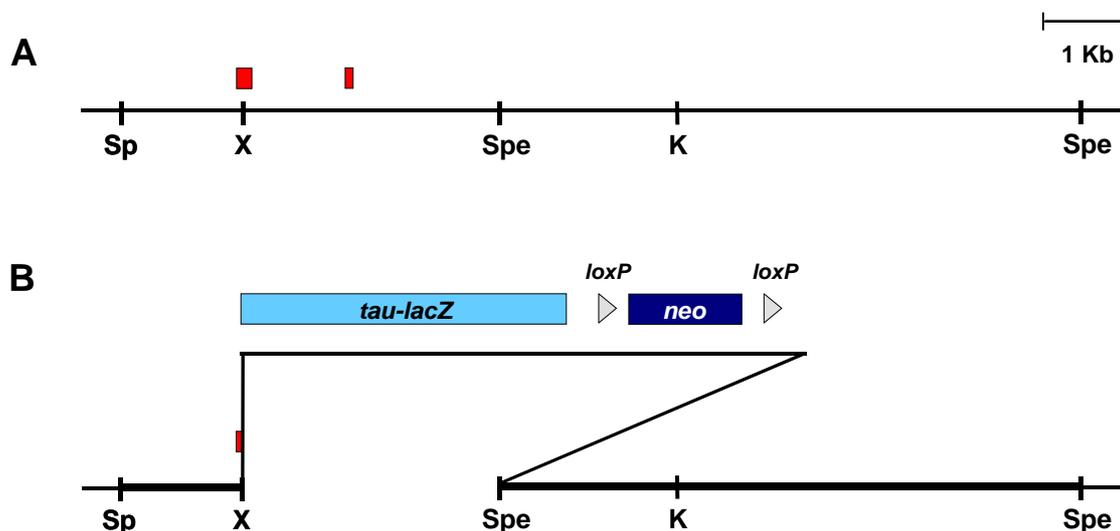
### 1. Analyse der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus auf genomischer DNA-Ebene

#### 1.1 Vorbemerkungen

Mutationen in  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 führen zur X-chromosomal vererbten unspezifischen geistigen Behinderung. Um den menschlichen Phänotyp der mentalen Retardierung besser zu verstehen, wurde im Vorfeld dieser Doktorarbeit eine Knockout-Maus etabliert, die eine partielle Deletion im X-chromosomalen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Gen aufweist. Das natürliche Startcodon des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Gens wurde genutzt, um es mit einem *tau-lacZ*-Reporter gen zu fusionieren. Dieses sollte es später erlauben, die unter der Kontrolle eines  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Promotors getriebene Expression eines tau- $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteins in verschiedenen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen zu analysieren. Auf diese Weise sollte die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in verschiedenen Geweben durch eine einfache  $\beta$ -Galaktosidase-vermittelte Farbreaktion verfolgt werden. Da das tau- $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein durch tau in Mikrotubuli-reiche Fortsätze neuronaler Zellen transportiert wird, sollten sich gegebenenfalls  $\alpha$ Pix/Arhgef6-positive Neurone inklusive ihrer Fortsätze darstellen lassen.

Die Konstruktion des *Targeting*-Vektors und die Herstellung der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus wurde von Frau Prof. K. Kutsche, auch in Kollaboration mit anderen Wissenschaftlern (siehe unten), durchgeführt. Der zur Generierung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen verwendete *Targeting*-Vektor enthält eine Kasette, die aus dem oben genannten *tau-lacZ*-Reporter gen und einem PGK-Promotor getriebenen *Neomycin*-Resistenzgen (*PGK-neo*-Gen) besteht (Abb. 9). Das von zwei *loxP*-Sequenzen flankierte *neo*-Gen vermittelt eine Resistenz gegenüber dem cytotoxischen Aminoglykosid-Antibiotikum G418 und dient somit als positiver Selektionsmarker. Bei den *loxP*-Sequenzen handelt es sich um 34 Bp lange Erkennungssequenzen des Enzyms Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1. Das *Cre/loxP*-System stellt ein Rekombinationssystem dar, welches unter anderem zur Eliminierung einzelner DNA-Sequenzen verwendet wird. Für die Generierung der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus war jedoch die Deletion des *neo*-Gens nicht nötig und wurde daher mittels des *Cre/loxP*-Systems nicht durchgeführt.

Mit dem Ziel, das  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gen zu inaktivieren, wurde die *tau-lacZ*-Kassette zusammen mit dem *neo*-Resistenzgen gegen ein genomisches *XbaI-SpeI*-DNA-Fragment ausgetauscht und so in den Zielvektor kloniert. Außerdem wurde jeweils ein Rekombinationsarm (1,6 Kb bzw. 6 Kb), die beide identisch mit den endogenen Sequenzen sind, 5' bzw. 3' von der *tau-lacZ-neo*-Kassette in den *Targeting*-Vektor kloniert. Dadurch wurde die Integration der Fremd-DNA in das Maus-Genom über homologe Rekombination in ES-Zellen ermöglicht. Die homologe Rekombination (*gene targeting*) führte somit zu einer Insertion der *tau-lacZ-neo*-Kassette in das Genom und damit zu einer partiellen Deletion des Exons 1, der kompletten Deletion des Introns 1 und Exons 2 sowie zu einer teilweisen Deletion des sich anschließenden Introns 2 des murinen  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens (Abb. 9). Damit geht der Beginn der Kodierregion (246 Bp) verloren, wodurch es zu keiner Expression des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens mehr kommen sollte.



**Abb. 9: Schematische Darstellung der Targeting-Strategie des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens**

Der  $\alpha Pix/Arhgef6$  Wildtyp-Locus ist in (A) und der nach homologer Rekombination veränderte Knock-out-Locus in (B) dargestellt. Waagerechte Linien repräsentieren einen genomischen Abschnitt des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens. Restriktionsschnittstellen sind mit Buchstaben und kurzen Querstrichen gekennzeichnet (K=*KpnI*, Sp=*SphI*; Spe=*SpeI*, X=*XbaI*). Exons des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens sind als rote Kästchen dargestellt; die als Reportergen verwendete *tau-lacZ*-Kassette ist als hellblauer Kästchen gekennzeichnet. Die als Selektionsmarker verwendete *neo*-Kassette wird von zwei *loxP*-Sequenzen (graue Dreiecke) flankiert und ist als dunkelblauer Kästchen markiert. Die DNA-Bereiche, die zur homologen Rekombination dienen, sind durch dicke Linien hervorgehoben.

Der generierte *Targeting*-Vektor wurde in Kollaboration mit Dr. Michael Bösl aus dem Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg durch Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht. Positive Klone, in denen die homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurden durch eine Neomycinresistenz identifiziert. Um die-

jenigen ES-Zellklone zu finden, bei denen eine korrekte homologe Rekombination stattgefunden hatte, wurde von Frau Prof. K. Kutsche eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es wurden drei positive, mit KIV-B5, KH8-A1 und KH8-A6 bezeichnete ES-Zellklone ausgewählt und diese in Wirtsblastozysten injiziert. Anschließend wurde die Blastozyste in den Uterus scheinchwangerer Mäuse implantiert. Die Wahl der Donor-Mauslinien der ES-Zellen und der Blastozysten erfolgte in einer Weise, dass in der Nachkommenschaft der Grad des Chimärismus und somit eine Keimbahntransmission anhand der Fellfarbe mit hoher Wahrscheinlichkeit ermittelt werden konnte. Es wurden nachfolgend hoch chimäre Männchen mit weiblichen Wildtyp-Mäusen verpaart. Nach Genotypisierung der Nachkommen wurden männliche Träger der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Mutation mit heterozygoten  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Weibchen verpaart. Die Genotypisierung erfolgte mit einer in Kapitel 1.2 näher beschriebenen Genotypisierungs-PCR. Aus dieser Verpaarung sollten weibliche Nachkommen zu 50% heterozygot und zu 50% homozygot für die  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Mutation sein. Männliche Nachkommen sollten in 50% der das Wildtyp- bzw. in 50% ein mutiertes Allel tragen. Es wurden Tiere in den genannten Verhältnissen erhalten. Aus diesem Grund konnte ein embryonal letaler Phänotyp ausgeschlossen werden. Sowohl weibliche als auch männliche  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse waren lebensfähig.

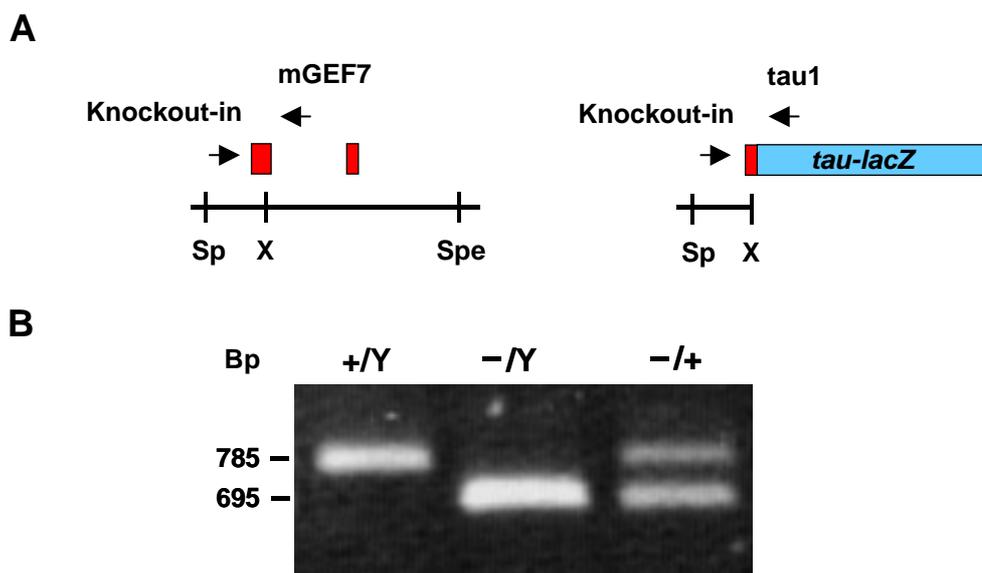
Es erfolgte eine konsequente Rückkreuzung der Knockout-Tiere in den C57bl/6-Hintergrund, damit ein durch die 129svJ-Linie (ES-Zellen) möglicher genetischer Hintergrund die geplanten verhaltensbiologischen Untersuchungen nicht beeinflussen konnte. In der Regel wurden hierfür heterozygote Weibchen mit C57bl/6 Wildtyp-Männchen verpaart. Diese Verpaarungen wurden mehrfach wiederholt.

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden ausschließlich männliche Knockout-Tiere verwendet. Für die Erzeugung männlicher Knockout-Tiere wurden heterozygote Weibchen mit C57bl/6 Wildtyp-Männchen verpaart (siehe oben). Aus diesen Verpaarungen resultierten 50%  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout- und 50% Wildtyp-Männchen sowie 50% heterozygote und 50% Wildtyp-Weibchen. Die  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse zeigen innerhalb ihrer Lebensspanne keine Auffälligkeiten. Die äußerliche Gestalt und Größe der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse zeigt keine ersichtlichen Veränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Desweiteren besteht zwischen dem Gewicht eines Wildtyp- und eines Knockout-Tieres kein Unterschied.  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse, die gemeinsam mit mehreren Wildtyp-Geschwistertieren in einem Käfig gehalten wurden, zeigten keine auffälligen Zuchtanomalien.

## 1.2 Genotypisierung der Mäuse mittels Multiplex-PCR-Reaktion und Southern-Blot-Analyse

### PCR-Analyse

Um zwischen den einzelnen Genotypen unterscheiden zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Jungtiere aus der Nachzucht mittels PCR genotypisiert (Genotypisierungs-PCR). Die dabei verwendeten PCR-Bedingungen wurden in dieser Arbeit etabliert. Im Alter von etwa zwei Wochen wurden den Mäusen Schwanzbiopsien entnommen und nach Lyse der Zellen genomische DNA isoliert. Um zwischen dem  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Wildtyp- und dem partiell deletierten  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Allel unterscheiden zu können, wurden drei spezifische Oligonukleotide abgeleitet und in einer Multiplex-PCR an genomischer DNA eingesetzt. Durch Verwendung der Oligonukleotide „Knockout-in“ und „mGEF7“ wurde von dem Wildtyp-Allel ein 785 Bp und im Falle des partiell deletierten  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Allels mittels der Oligonukleotide „Knockout-in“ und „tau1“ ein 695 Bp Fragment amplifiziert. Heterozygote Tiere wiesen Fragmente beider Größen auf (Abb. 10A und B).

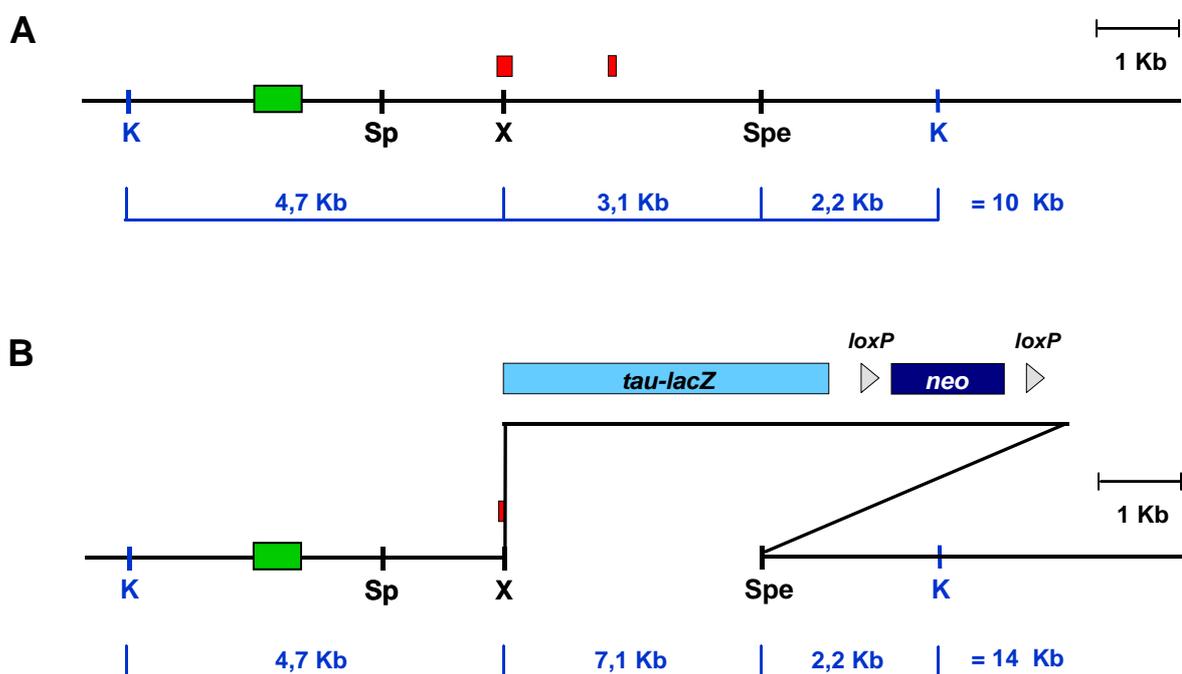


**Abb. 10: Genotypisierung der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Wildtyp- und Knockout-Mäuse sowie heterozygoter Mäuse durch PCR**

**(A)** Der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Wildtyp-Locus (links) und der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Locus (rechts) sind als waagerechte Linien dargestellt. Pfeile markieren die Lage der verwendeten Oligonukleotide (Knockout-in, mGEF7 und tau1). Die Exons des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens sind als rote Kästchen, die  $\tau$ -lacZ-Kassette als blaues Kästchen dargestellt. Einzelne Restriktionsschnittstellen sind mit Buchstaben bezeichnet (Sp=*Sph*I, Spe=*Spe*I, X=*Xba*I) und mit kurzen Querstrichen versehen. **(B)** Dargestellt ist ein 1,5%iges Agarosegel mit den PCR-Produkten nach Genotypisierungs-PCR. Für den Nachweis des Wildtyp-Allels wird ein 785 Bp-Fragment (+/Y) und für das mutierte Allel ein 695 Bp-Fragment amplifiziert (-/Y bzw. -/+). Links neben dem Gel ist die Größe der Banden in Bp angegeben.

### Southern-Blot-Analyse

Für einen definitiven Beweis der partiellen Deletion im  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gen auf genomischer Ebene sollte die Bestimmung der Genotypen einiger Mäuse mittels Southern-Blot erfolgen. Nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *KpnI* wurde im Fall der genomischen DNA der Wildtyp-Maus ein Fragment von 10 Kb erwartet, bei der durch homologe Rekombination veränderten DNA dagegen eines von 14 Kb (Abb. 11A und B). Anhand dieser Fragmentlängen-Differenz sollte die Deletion des genomischen Bereichs der beiden Exons 1 und 2 nachgewiesen werden. Die DNA heterozygoter Knockout-Tiere weist sowohl das kürzere Wildtyp- als auch das längere Knockout-Allel auf, weshalb DNA-Fragmente von 10 Kb und 14 Kb erwartet wurden.

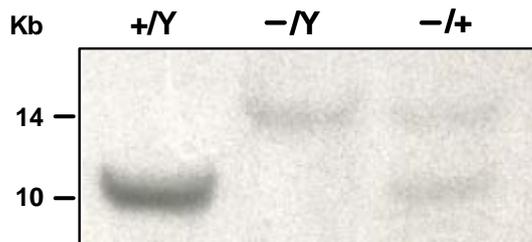


**Abb. 11: Schematische Darstellung der angewandten Strategie für die Southern-Blot-Analyse**

Als waagerechte Linien sind dargestellt der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Wildtyp-Locus (**A**) und der nach *gene targeting* veränderte Knockout-Locus (**B**). Restriktionsschnittstellen sind durch kurze Querstriche und Buchstaben markiert (K=*KpnI*, Sp=*SphI*, Spe=*SpeI*, X=*XbaI*). Die *KpnI*-Schnittstellen sind blau gekennzeichnet. Die Position der Sonde ist durch ein grünes Kästchen, die Exons des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens durch rote Kästchen gezeigt. Die *tau-lacZ*-Kassette ist als ein blaues und die durch zwei *loxP*-Sequenzen (graue Pfeilspitzen) flankierte *neo*-Kassette als ein dunkelblaues Kästchen dargestellt. Die bei der Southern-Blot-Analyse zu erwartenden Fragmente (10 und 14 Kb) bzw. deren Zusammensetzung sind mit waagerechten blauen Linien gezeigt, und die Größe der Fragmente ist in Kb angegeben.

Isolierte genomische DNA aus Mausschwänzen von Wildtyp-, heterozygoten und  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen wurde mit dem Restriktionsenzym *KpnI* verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die DNA auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde (SB3-Sonde) hybridisiert.

Diese Sonde liegt außerhalb der im *Targeting*-Vektor vorhandenen genomischen  $\alpha Pix/Arhgef6$ -DNA-Sequenz. Wie erwartet, wurde der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Wildtyp-Locus als 10 Kb *KpnI*-Fragment identifiziert, während die durch Insertion der *tau-lacZ-neo*-Kassette veränderte genomische DNA der Knockout-Mäuse ein Fragment von 14 Kb aufwies. Bei heterozygoten Tieren konnten beide Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 12).



**Abb. 12: Autoradiographische Darstellung des Southern-Blots mit der  $\alpha P^{32}$ -markierten DNA-Sonde SB3 an genomischer DNA verschiedener Mäuse**

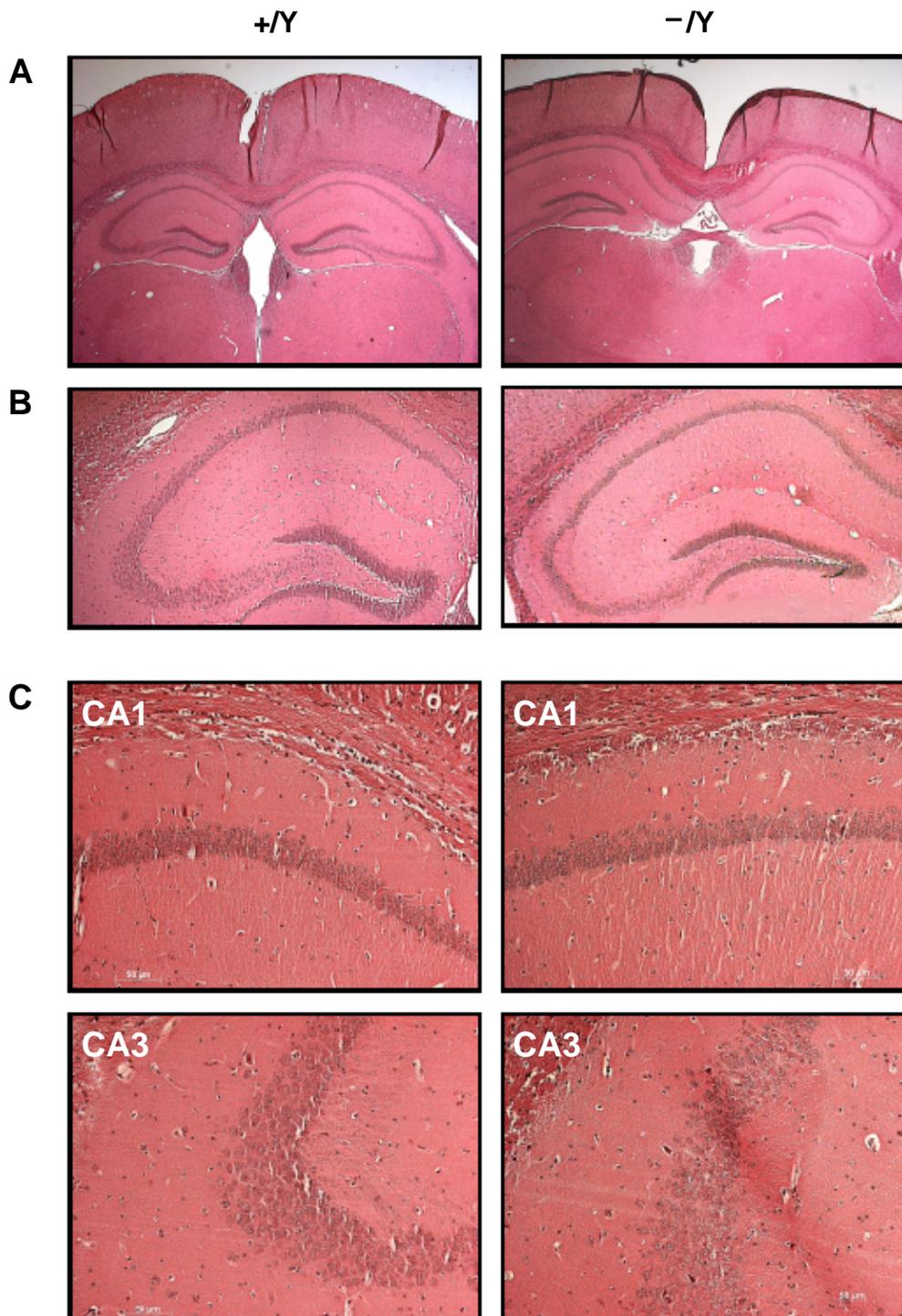
Dargestellt ist das Bandenmuster nach Southern-Blot-Hybridisierung mit der  $\alpha P^{32}$ -markierten SB3-Sonde von genomischer DNA einer Wildtyp-, einer heterozygoten und einer

$\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus. Der Nachweis des Wildtyp-Allels (+/Y) erfolgte durch die Detektion eines 10 Kb-Fragmentes, der des mutierten Allels (-/Y) durch ein 14 Kb-Fragment. Heterozygote Mäuse (-/+) weisen beide Fragmente auf. Links vom Blot sind die Größen der hybridisierenden DNA-Fragmente angegeben.

## 2. Morphologische Analyse des Gehirns der Wildtyp- und der $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus mittels histologischer Hämatoxylin-Eosin-Färbungen

Histologische Untersuchungen sollten der Beantwortung der Frage dienen, ob die partielle Deletion des  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Gens in den  $\alpha Pix/Arhgef6$ -exprimierenden Organen zu morphologischen Veränderungen führt. Dazu wurde das Gehirn der adulten  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus im Vergleich zum Gehirn der Wildtyp-Maus in einer Übersichtsfärbung auf morphologische Auffälligkeiten hin untersucht. Die Gehirne beider Genotypen wurden nach Perfusion der Tiere entnommen, es wurden horizontale Paraffinschnitte angefertigt und diese einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen. Die HE-Färbung ist ein Färbeverfahren der Histologie, mit dem verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können. Das Oxidationsprodukt des Hämatoxylins färbt dabei den Zellkern blau, während Eosin durch Anlagerung an eosinophile Gewebebestandteile das Cytoplasma rötlich färbt. Anhand der intensiv gefärbten Zellschichten lassen sich die typischen hippocampalen Strukturen gut erkennen. Die stark gefärbte Körnerschicht des *Gyrus dendatus* und die pyramidale Schicht des *Cornu ammonis* bilden zwei ineinander greifende Strukturen (Abb. 13).

Die lichtmikroskopische Analyse des gesamten Gehirns (Daten nicht gezeigt) und die Betrachtung der Hippocampus-Region der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus ergab sowohl in der Gesamtübersicht als auch in einer weiteren Vergrößerung der HE-gefärbten Paraffinschnitte keine augenscheinlichen morphologischen Unterschiede zum Wildtyp-Organ (Abb. 13A und B). Mit Rücksicht auf die Grenzen dieser Methode ergab die Färbung auch eine Untersuchung bei 63-facher Vergrößerung keine lichtmikroskopisch auffälligen Veränderungen in den Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bezüglich der Anzahl und Anordnung pyramidaler Zellen und Körnerzellen (Abb. 13C).



**Abb. 13: Morphologische Analyse von Gehirnstrukturen der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gehirnschnitten**

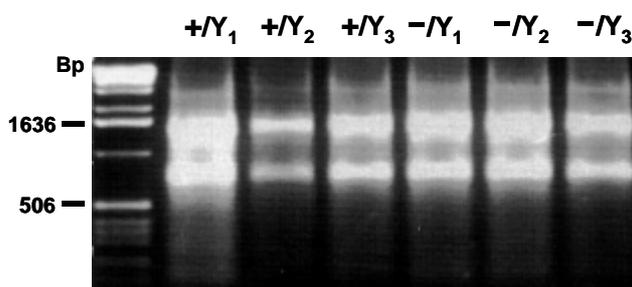
Dargestellt sind Ausschnitte von Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten horizontalen Gehirnschnitten (10  $\mu$ m) der adulten Wildtyp-Maus (+Y) und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus (-Y) in verschiedenen Übersichtsgrößen. Die morphologische Beurteilung erfolgte im direkten Vergleich mit einem Durchlichtmikroskop in der 10-fachen (A), 20-fachen (B) und 63-fachen Vergrößerung (C). (A) Gezeigt ist die Formation beider Hippocampi in der Gesamtübersicht. In (B) ist jeweils die Formation eines Hippocampus dargestellt. Durch die intensive Anfärbung sind die Körnerzellen des *Gyrus dendatus* und die Pyramidenzellen des *Cornu ammonis* stark hervorgehoben. (C) Ausschnittsvergrößerungen der CA1- und der CA3-Region beider Genotypen zeigen keine histologischen Auffälligkeiten.

### 3. Vergleich des Genexpressionsprofils im Hippocampus der Wildtyp- und der $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus

#### 3.1 Genexpressionsanalyse im Hippocampus der Wildtyp- und der $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus mit Hilfe der Mikroarray-Technologie

Die DNA-Mikroarray-Analyse stellt eine schnelle und effiziente Methode zur Erstellung von RNA-Expressionsprofilen dar. Ihre Besonderheit liegt in der Eigenschaft, dass mehrere zehntausend Gene einer Probe gleichzeitig auf die Stärke ihrer Expression (Genaktivität) untersucht werden können und darüberhinaus die vergleichende Expressionsanalyse zwischen verschiedenen Proben vollzogen werden kann. Der hohe Parallelisierungsgrad ist einer der wesentlichen Vorteile dieser Technik gegenüber klassischen molekularbiologischen Methoden, mit denen die Expression von nur einzelnen oder wenigen Genen zugleich untersuchbar sind.

In dieser Arbeit sollten gezielt solche Gene identifiziert werden, welche möglicherweise im Hippocampus der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus zu einem bestimmten Zeitpunkt differentiell exprimiert sind. Zu diesem Zweck wurden die Genexpressionsprofile in diesem Gewebe von drei Knockout- und drei Wildtyp-Mäusen in sechs parallelen Mikroarray-Analysen miteinander verglichen. Dazu wurde zunächst Gesamt-RNA aus dem Hippocampus von 14 Tage alten Wildtyp- und  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen isoliert und diese in einem Agarosegel sowohl quantitativ als auch qualitativ geprüft (Abb. 14). Diese RNA wurde für die nachfolgenden Mikroarray-Experimente verwendet.



**Abb. 14: Agarosegel mit isolierter RNA aus dem Hippocampus von Wildtyp- und  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen**

Aus dem Hippocampusgewebe von drei Wildtyp-Mäusen ( $+Y_{1-3}$ ) bzw. drei  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen ( $-Y_{1-3}$ ) wurde Gesamt-RNA isoliert und in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Links neben der Abbildung sind einige Größen eines 1 Kb-Markers angegeben.

Die weitere experimentelle Durchführung erfolgte am Institut für Immunologie der Universität Rostock durch Herrn Dr. Koczan. Es wurden kommerziell erhältliche Mikroarrays der Firma Affymetrix verwendet, auf welchen etwa 20.000 gut charakterisierte Gene aus der Maus repräsentiert sind. Dabei handelt es sich um Oligonukleo-

tide, die an definierte Positionen eines Rasters auf einem Glasträger aufgebracht sind und für das jeweilige Gen als Sonden dienen.

In dieser Arbeit konnte ein Gen identifiziert werden, dessen Expression sich im Hippocampus der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus signifikant von der im Wildtyp unterschied. In sieben von neun Vergleichen konnte eine niedrigere Expressionsstärke dieses Gens, *Cd99l2*, in den Hippocampi der Knockout-Tiere gegenüber den Wildtyp-Tieren ermittelt werden. Der Faktor des Expressionsunterschiedes betrug dabei im Mittel zwei.

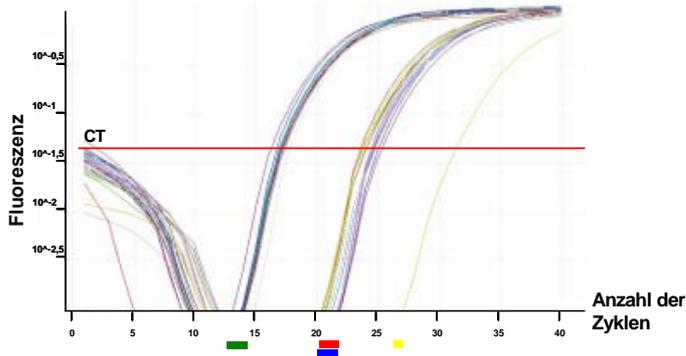
Das *Cd99l2*-Gen ist ein Paralog zum humanen *CD99* und ist ubiquitär exprimiert. Die besonders hohe Expression von *Cd99l2* sowohl in Neuronen als auch in Thymozyten reflektiert eine prominente Rolle des Proteins während der neuronalen Entwicklung und in Signalwegen hämatopoetischer Zellen (Suh et al., 2003).

### **3.2 Untersuchung der Expression des *Cd99l2*-Gens in der Wildtyp- bzw. *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus mittels Real-Time-PCR und RNA-*in-situ*-Hybridisierung**

#### **Real-Time-PCR**

Um die durch die Mikroarray-Experimente erhaltene differentielle Genexpression des *Cd99l2*-Gens mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurden quantitative Real-Time-PCR-Analysen durchgeführt. Mit Hilfe dieses hochsensitiven Verfahrens zur RNA-Quantifizierung kann die Expression von Dutzenden von Genen gleichzeitig und mit großer Präzision analysiert werden.

Als Ausgangsmaterial wurde die in der Mikroarray-Analyse eingesetzte RNA aus dem Hippocampus der Wildtyp- (+/Y<sub>1-3</sub>) bzw. der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Tiere (-/Y<sub>1-3</sub>) verwendet (Kapitel 3.1). Die Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und anschließend mit sequenzspezifischen Primern und dem Zusatz von SYBR-Green im Rotor-Gene-Gerät amplifiziert. Die entstehenden PCR-Produkte wurden über Fluoreszenzmessungen quantifiziert, da der Farbstoff SYBR-Green in doppelsträngige DNA interkaliert und dabei stark fluoresziert. Je größer die Menge der Zielsequenz, die zu Beginn der Amplifikation vorhanden ist, desto eher erfolgt ein Anstieg der Amplifikate in die exponentielle Phase. Die PCR-Amplifikationskurven sind in der Abbildung 15 in einer logarithmischen Darstellung gezeigt.

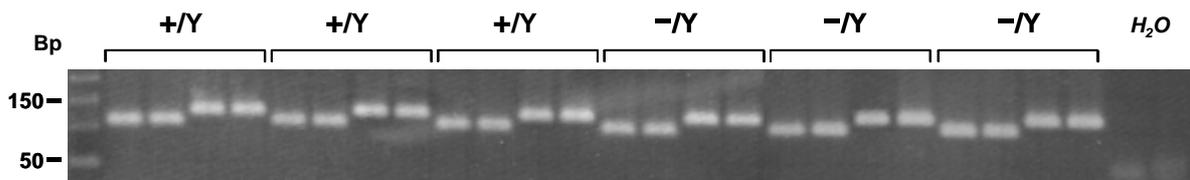


**Abb. 15: Logarithmische Darstellung der Amplifikationskurven von *Cd99l2* und *Gapdh***

Isolierte Gesamt-RNA aus dem Hippocampus der Wildtyp- und der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus wurde revers transkribiert und mit sequenzspezifischen Primern im Rotor-Genegerät amplifiziert. Von jeder Probe wurden je zwei Ansätze parallel untersucht. Die Fluoreszenz der einzelnen Proben ist halblogarithmisch in Abhängigkeit der Zyklenzahl dargestellt.

Je höher die Anzahl an Transkripten der Hippocampus-Zellen, desto früher erreicht die Fluoreszenz der Amplifikate die log-lineare Region. Die Amplifikationskurven von *Cd99l2* der drei Wildtyp-Mäuse (+Y<sub>1-3</sub>) sind zur Verdeutlichung durch einen roten, die der drei *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäuse (-Y<sub>1-3</sub>) durch einen blauen Balken unterhalb der jeweiligen Kurven markiert. Die *Gapdh*-Kurven entsprechender Proben als relativer Bezugspunkt sind durch einen grünen Balken gekennzeichnet. Ein gelber Balken markiert die Negativ-Kontrolle, durch die der Schwellenwert des Hintergrundsignals festgelegt wird. Der gewählte CT-Wert ist durch einen waagerechten roten Strich dargestellt.

Anhand der Kurven ist ersichtlich, in welchem Zyklus der PCR die Fluoreszenz für eine bestimmte Probe zum ersten mal über das Hintergrund-Signal steigt. So definiert sich der „Cycle Treshold“ (CT)-Wert einer Probe. PCR-Ansätze mit einer hohen Kopienzahl als Ausgangsmaterial haben also einen niedrigen CT-Wert. Die gemessenen CT-Werte wurden auf die Expression des Haushaltsgens *Glycerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh)* normalisiert, welches parallel zu jedem Lauf mit-amplifiziert wurde. Durch die als Standard definierte Bezugsgröße des *Gapdh*-Gens wurden die gemessenen CT-Werte in relative Werte umgerechnet. Diese Werte präsentieren ein relatives Maß an der Menge der *Cd99l2*-RNA im Hippocampus der Wildtyp- und der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus. Für das *Cd99l2*-Gen konnte eine spezifische Expression im Hippocampus der beiden Mausstämme nachgewiesen werden. Wie bereits aus der Abbildung 15 zu ersehen ist, lagen die relativen Transkriptmengen jeder Probe jedoch etwa um den gleichen Wert und zeigten somit keinen Unterschied in der Genexpression zwischen Wildtyp- und Knockout-Tier. Durch das Auftragen der PCR-Produkte auf ein Agarosegel wurde ein visueller Vergleich der Bandenintensitäten ermöglicht (Abb. 16). Die Gelanalyse zeigte in jeder Probe eine etwa gleich starke Expression des *Cd99l2*-Gens im Hippocampus sowohl des Wildtyp- als auch des Knockout-Tieres. *Gapdh* war ebenfalls in allen untersuchten Proben gleichermaßen exprimiert.



**Abb. 16: Agarosegel mit PCR-Produkten von *Cd99l2* bzw. *Gapdh* nach Real-Time-PCR**

Die mittels Real-Time-PCR amplifizierten Transkripte von *Cd99l2* (115 Bp) und *Gapdh* (136 Bp) der Wildtyp-Maus (+/Y) bzw. *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus (-/Y) wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Für jede zu untersuchende Probe erfolgte in der Real-Time-PCR ein Doppelansatz. Links neben der Abbildung sind einige Größen eines 50 Bp-Markers angegeben.

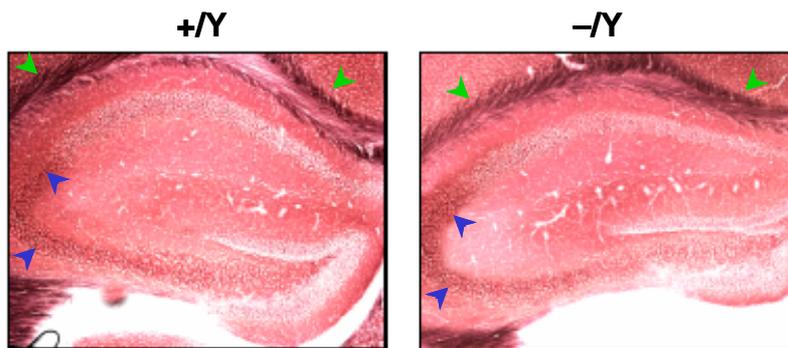
Weitere Real-Time-PCR-Experimente mit unterschiedlichen *Cd99l2*-spezifischen Primerkombinationen ergaben ebenfalls, dass die Expression von *Cd99l2* im Hippocampus von Wildtyp- und *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus übereinstimmt.

Die mittels Mikroarray-Analyse gezeigte differentielle Expression des *Cd99l2*-Gens in der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus konnte durch die Real-Time-PCR somit nicht bestätigt werden.

### **RNA-*in-situ*-Hybridisierung**

Die Expression von *Cd99l2* sollte zusätzlich mit einer gängigen Methode zum direkten Nachweis der RNA untersucht werden. Dazu wurde eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung mittels einer spezifischen *Cd99l2*-Sonde an Hirn-Gewebeschnitten einer 14 Tage alten Wildtyp- und *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus durchgeführt. Dazu wurden zunächst die letzten 500 Bp der Kodierregion des *Cd99l2*-Gens und ein entsprechend großer Bereich der sich anschließenden 3'-untranslatierten Region in den TOPO-TA-Vektor kloniert (pCd99l2-TOPO-TA). Die Transkription einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde mit pCd99l2-TOPO-TA als Matrize sowie weitere experimentelle Schritte zur Durchführung der RNA-*in-situ*-Hybridisierung erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Bartsch aus dem Institut für experimentelle Ophthalmologie in Hamburg.

Die Digoxigenin-markierte Sonde wurde durch einen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert und in einer anschließenden Farb-reaktion nachgewiesen. Die Farb-reaktion basiert auf der Umsetzung eines farblosen Substrates zu einem dunkelvioletten Farbstoff, durch den exprimiertes *Cd99l2* nachgewiesen wurde. Die Abbildung 17 zeigt einen Vergleich der Expression von *Cd99l2* im Hippocampus der Wildtyp-Maus mit der *Cd99l2*-Expression der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus.



**Abb. 17: RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit einer *Cd99l2*-spezifischen Sonde an Hirngewebeschnitten einer Wildtyp-Maus bzw. *alphaPix/Arhgef6*-Knockout-Maus**

Zur Untersuchung der *Cd99l2*-Expression wurde mit einer spezifischen Sonde eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung an Hirn-Paraffinschnitten einer 14 Tage alten Wildtyp-Maus (+/Y) bzw. *alphaPix/Arhgef6*-Knockout-Maus (-/Y) durchgeführt. Es ist jeweils ein Ausschnitt des Hippocampus und des unteren Abschnittes des Balkens (*corpus callosum*) gezeigt. Die *Cd99l2*-Expression wurde mit Hilfe eines enzymgekoppelten Antikörpers gegen Digoxigenin und einer abschließenden Farbreaktion dargestellt. Blaue Pfeilspitzen deuten auf das Hybridisierungssignal in der CA3-Region des Hippocampus, grüne Pfeilspitzen auf das Signal in den querverlaufenden Kommissurenfasern des *Corpus callosum*.

Sowohl im Wildtyp- als auch im Knockout-Tier ist das *Cd99l2*-Gen verstärkt in der CA3-Region des Hippocampus und in den die beiden Gehirnhemisphären verbindenden, querverlaufenden Kommissurenfasern des Balkens (*Corpus callosum*) exprimiert. Einen signifikanten Unterschied im Expressionsniveau von *Cd99l2* konnte zwischen den beiden Tieren nicht festgestellt werden.

Die durch die Mikroarray-Analyse gezeigte erniedrigte Expression des *Cd99l2*-Gens konnte im *alphaPix/Arhgef6*-Knockout-Tier auch durch die RNA-*in-situ*-Hybridisierung nicht bestätigt werden.

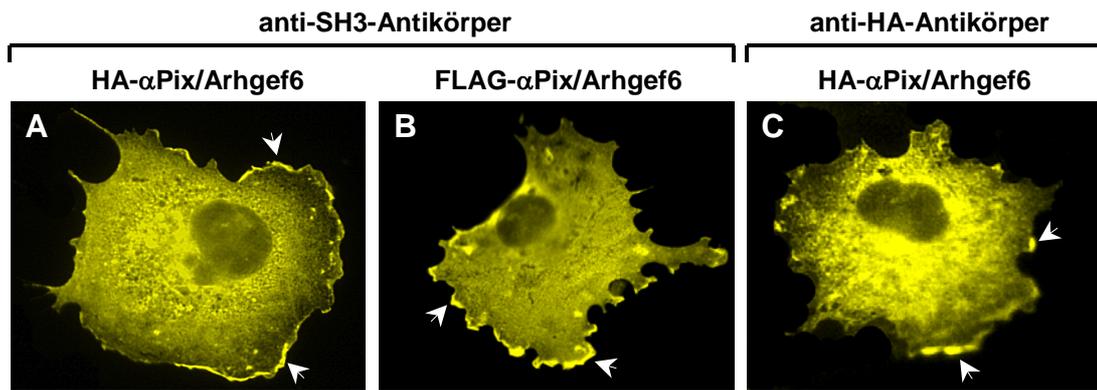
## **4. Analyse der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteinexpression in verschiedenen Geweben der Wildtyp- und $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus**

### **4.1 Untersuchungen zur Expression des $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins mit Hilfe des anti-SH3-Antikörpers**

Durch die Deletion der ersten beiden Exons und damit des Translations-Startcodons von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 sollte keine Synthese des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in der Knockout-Maus mehr stattfinden. Dennoch besteht prinzipiell die Möglichkeit, auf Grund potentiell vorhandener, alternativer Translationsstartpunkte, dass die Proteinexpression nicht vollständig unterdrückt wird. Um den Verlust des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins durch das *gene targeting* nachzuweisen, wurde zunächst ein kommerziell erhältlicher Antikörper verwendet, der gegen die SH3-Domäne von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 gerichtet ist (anti-SH3, Manser et al., 1998). Das zu  $\alpha$ Pix/Arhgef6 homologe Protein  $\beta$ Pix/Arhgef7 und dessen Isoformen besitzen ebenfalls eine SH3-Domäne und werden daher neben  $\alpha$ Pix/Arhgef6 gleichfalls durch den anti-SH3-Antikörper erkannt (Manser et al., 1998).

#### **4.1.1 Immuncytochemische Analysen zur subzellulären Lokalisation von ektopisch exprimiertem $\alpha$ Pix/Arhgef6 in CHO-K1-Zellen**

Um die Spezifität des anti-SH3-Antikörpers beurteilen zu können, wurden Immunfluoreszenzexperimente an mit zwei verschiedenen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expressionsplasmiden transfizierten CHO-K1-Zellen durchgeführt. Nach der transienten Transfektion von CHO-K1-Zellen mit dem Konstrukt pMT2SM-HA-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 bzw. pFLAG-CMV-4-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit dem anti-SH3-Antikörper inkubiert und mit einem Fluorescein-konjugierten sekundären Antikörper am Fluoreszenzmikroskop detektiert (Abb. 18).



**Abb. 18: Darstellung der subzellulären Lokalisation von ektopisch exprimiertem HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 bzw. FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 in transfizierten CHO-K1-Zellen mittels Immunfluoreszenz**

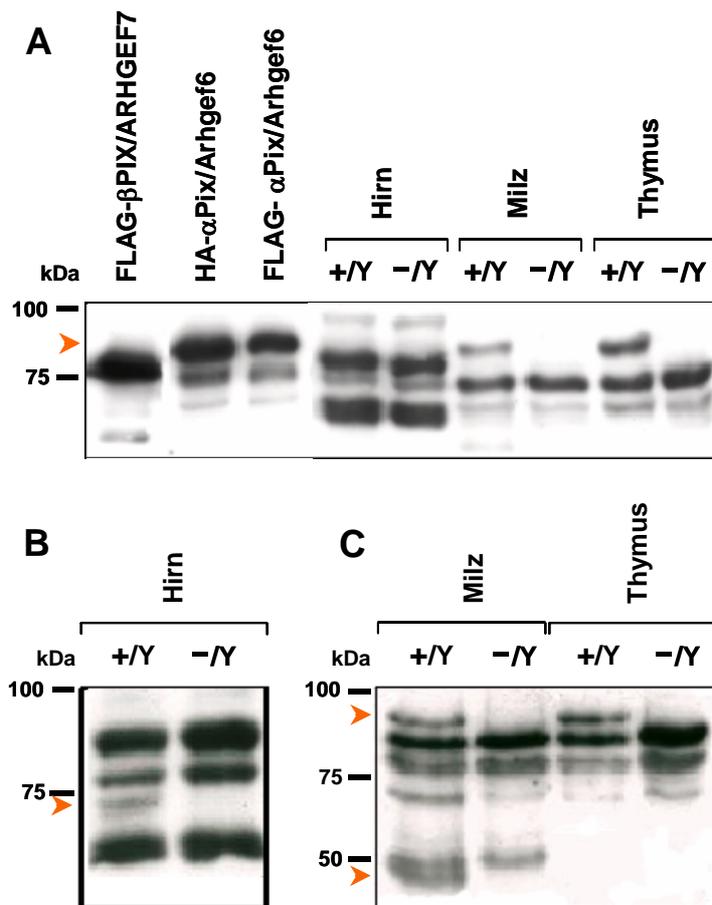
CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 bzw. pFLAG-CMV-4-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 transfiziert und die subzelluläre Lokalisation von HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 bzw. FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Zur Färbung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 diente der primäre anti-SH3-Antikörper und ein sekundärer Alexa-Fluor488-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper. Die Pfeile zeigen auf die Lokalisationsstellen von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (A und B). Dargestellt ist die Lokalisation von HA- bzw. FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Lamellipodien und Membranauffaltungen. Die Zelle in (C) diente als Positivkontrolle. HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 wurde mittels eines primären anti-HA-Antikörpers und eines Alexa-Fluor488-konjugierten anti-Maus-Antikörpers immungefärbt. Auch hier stimmt die Lokalisation von HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 mit dem in (A) bzw. (B) gezeigten Verteilungsmuster überein.

Wie die Abbildung 18 zeigt, lokalisiert überexprimiertes HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 (Abb. 18A) sowie FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 (Abb. 18B) im Cytoplasma und auch sehr konzentriert an der Zellperipherie und speziell in Lamellipodien und Membranauffaltungen. Die Erkennung der beiden Proteine durch den anti-SH3-Antikörper deutet darauf hin, dass dieser das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein selbst und nicht das HA- bzw. FLAG-Epitop detektiert. Dementsprechend zeigten untransfizierte Zellen keine Färbung (Daten nicht gezeigt). Um die Spezifität des anti-SH3-Antikörpers weiter zu untersuchen, wurden die exprimierten  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteine, welche das N-terminale HA- bzw. FLAG-Epitop aufweisen, zusätzlich mit einem Fluorescein-konjugierten anti-HA-Antikörper (Abb. 18C) bzw. einem anti-FLAG-Antikörper (nicht gezeigt) detektiert. Die mit diesen Antikörpern beobachtete Verteilung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 entspricht der mit dem anti-SH3-Antikörper gezeigten Lokalisation des Proteins in der Zelle. Analog durchgeführte Experimente mit COS-7-Zellen resultierten in einer entsprechenden Verteilung des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins (nicht gezeigt).

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Analysen konnte gezeigt werden, dass der anti-SH3-Antikörper spezifisch überexprimiertes murines  $\alpha$ Pix/Arhgef6 erkennt.

#### 4.1.2 Western-Blot-Analysen zum Nachweis der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Defizienz in der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus

Um die Abwesenheit des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in allen untersuchten Geweben der Knockout-Maus mittels Western-Blot-Analysen zu zeigen und gleichzeitig Kenntnisse über die Gewebeverteilung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 zu erlangen, wurden verschiedene Organe sowohl von Wildtyp- als auch  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen gewonnen. Wie bereits erwähnt, erkennt der anti-SH3-Antikörper neben  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ebenfalls das  $\beta$ Pix/Arhgef7-Protein und dessen Isoformen. Um die Erkennung des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins unter mehreren Proteinbanden zu erleichtern, wurden vergleichende Western-Blot-Analysen zwischen Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Proteinlysaten durchgeführt. Nach Auftrennung der erhaltenen Proteinlysate mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-SH3-Antikörper und anschließend mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper immundetektiert (Abb. 19).



**Abb. 19: Nachweis der Proteinexpression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in verschiedenen Geweben der Wildtyp-Maus sowie Nachweis der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Defizienz in der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mittels Western-Blot**

Aus Hirn, Milz und Thymus von Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus wurde Gesamtprotein isoliert, mittels eines 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-SH3-Antikörper detektiert. **(A)** Dargestellt ist die Detektion von „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (~87 kDa) in Milz und Thymus der Wildtyp-Maus (+Y). Als Positivkontrollen wurden mit dem pMT2SM-HA-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6- bzw. pFLAG-CMV-4-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6-Konstrukt transfizierte CHO-K1-Zellen verwendet.

$\beta$ Pix/ ARHGEF7 exprimierendes CHO-K1-Zelllysate diente als weitere Positivkontrolle. **(B)** Gezeigt ist die Detektion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen im Hirn (~72 kDa) sowie **(C)** in der Milz (~45 kDa) der Wildtyp-

Maus. In der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus (-Y) konnte hingegen keines der genannten  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteine nachgewiesen werden. Die Pfeilspitzen zeigen auf die verschiedenen Isoformen. Links sind einige Molekulargewichte in kDa des verwendeten Proteinstandards angegeben.

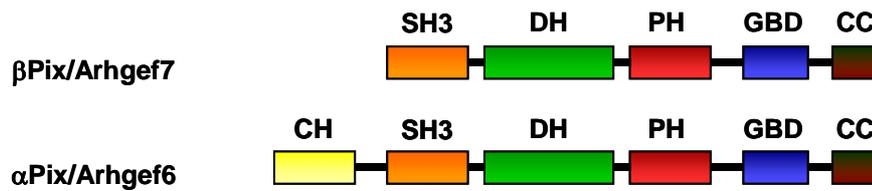
Wie in Abbildung 19A dargestellt ist, detektiert der anti-SH3-Antikörper ekto­pisch überexprimiertes  $\beta$ PIX/ARHGEF7 (~78 kDa) sowie HA- bzw. FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 (~87 kDa), wodurch die Spezifität des Antikörpers bestätigt wird. Eine Expression des endogenen „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins mit einer erwarteten Größe von ~87 kDa konnte in Milz und Thymus von adulten Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde erwartungsgemäß kein  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in diesen Geweben der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäuse detektiert.

Im Proteinlysate des Gesamthirns konnte durch Verwendung des anti-SH3-Antikörpers kein  $\alpha$ Pix/Arhgef6 von ~87 kDa in der Wildtyp-Maus detektiert werden (Abb. 19A). Stattdessen wurde eine  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform von ~72 kDa erkannt, die in dem Hirnlysate der Knockout-Maus fehlt (Abb. 19B). Weitere Proteinbanden, die in allen Homogenaten detektiert wurden, repräsentieren wahrscheinlich verschiedene Isoformen von  $\beta$ Pix/Arhgef7. Zusätzlich wurde eine  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform von etwa 45 kDa in der Milz detektiert, die in  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen nicht nachzuweisen war (Abb. 19C).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass weder „full-length“ noch verschiedene Isoformen von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Geweben von  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen exprimiert werden. Die Abwesenheit des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in den Knockoutlysaten bestätigt, dass die *Targeting*-Strategie zur Generierung der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus in der Tat zu einem vollständigen Verlust des Proteins geführt hat. Zusätzlich konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals verschiedene Isoformen des murinen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins detektiert werden, die bisher nicht bekannt waren. Die hirnspezifische Isoform von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 sollte, wie in Kapitel 5 erläutert, auf cDNA-Ebene charakterisiert werden.

#### **4.2 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen $\alpha$ Pix/Arhgef6 (anti-CH-L)**

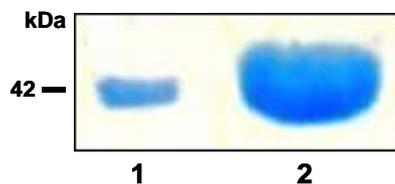
Um die Expression und Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 genauer zu charakterisieren, war die Erzeugung eines Antikörpers, welcher ausschließlich gegen  $\alpha$ Pix/Arhgef6 gerichtet ist, unerlässlich. Um einen spezifisch gegen  $\alpha$ Pix/Arhgef6 gerichteten polyklonalen Antikörper zu generieren, wurde daher die CH-Domäne in Kombination mit der Linkersequenz zwischen der CH- und der SH3-Domäne von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (CH-L) als Antigen für die Antikörperproduktion ausgewählt, da dieser Bereich nicht im  $\beta$ Pix/Arhgef7-Protein vorkommt (Abb. 20).



**Abb. 20: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von βPix/Arhgef7 und αPix/Arhgef6**

Schematische Domänenstruktur von βPix/Arhgef7 (oben) und αPix/Arhgef6 (unten) (CH/□ : calponin homology; SH3/□ : Src homology 3; DH/□ : Dbl homology; PH/□ : pleckstrin homology; GBD/□ : GIT1-binding domain; CC/□ : coiled coil). Der als Antigen verwendete Teil umfasst die CH-Domäne sowie die Linkersequenz zwischen der CH- und der SH3-Domäne.

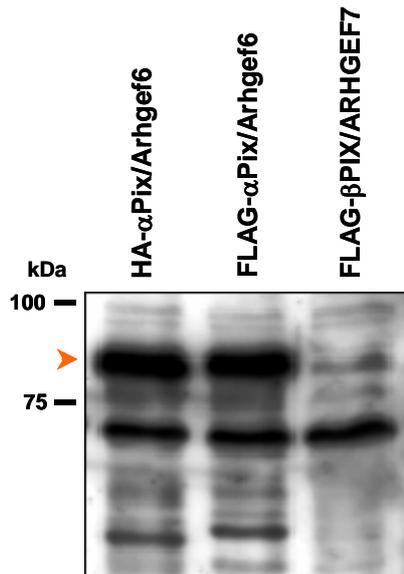
Ein PCR-Produkt, das die für die CH-Linker-Region kodierende DNA-Sequenz aufweist (483 Bp), wurde über die *EcoRI* und *NotI*-Schnittstellen in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-4-T3 kloniert. Dieser Vektor ermöglicht nach IPTG-Induktion in *E.coli* die Expression der CH-Domäne und des Linkers (CH-L) als Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST). Aufgrund der hohen Affinität zwischen Glutathion und der Glutathion-S-Transferase konnte überexprimiertes GST-CH-L-Fusionsprotein aus dem bakteriellen Lysat durch Affinitätschromatographie hochspezifisch und in großer Menge aufgereinigt werden (Abb. 21).



**Abb. 21: Darstellung des affinitätschromatographisch aufgereinigten GST-CH-L-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung**

Das GST-CH-L-Fusionsprotein wurde nach IPTG-Induktion in *E.coli* exprimiert und anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt. Nach Auftrennung der bakteriellen Proteine in einem SDS-PAGE wurden diese mit Coomassie gefärbt. Das gefärbte SDS-Gel zeigt un-aufgereinigtes Fusionsprotein aus dem Überstand lysierter Bakterien nach der IPTG-Induktion (Spur 1) und hochspezifisch aufgereinigtes Fusionsprotein (Spur 2), welches als Antikörper-Synthese verwendet wurde. Links ist das Molekulargewicht des aufgereinigten GST-CH-L-Fusionsproteins angegeben.

Das GST-CH-L-Fusionsprotein weist eine Größe von ca. 42 kDa auf und wurde als Antigen zur Antikörper-Produktion in Kaninchen durch die Firma „Biogenes“ in Berlin in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Die Spezifität und Verwendbarkeit des resultierenden Serums wurde zunächst mittels Western-Blot untersucht. Dazu wurden CHO-K1-Zellen mit dem Konstrukt pMT2SM-HA-DEST-αPix/Arhgef6 bzw. pFLAG-CMV-4-DEST-αPix/Arhgef6 transient transfiziert und die Lysate mittels Western-Blot mit dem anti-αPix/Arhgef6[CH-L]-Serum untersucht (Abb. 22).



**Abb. 22: Charakterisierung des anti- $\alpha$ Pix/Arhgef6[CH-L]-Serums anhand von Proteinlysaten mit ektopisch überexprimiertem HA- bzw. FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 mittels Western-Blot**

Dargestellt ist die Detektion von „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (~87 kDa) (Pfeilspitze) in mit pMT2SM-HA-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6- bzw. pFLAG-CMV-4-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6-Konstrukt transfizierten CHO-K1-Zelllysaten. Als Negativkontrolle diente ein  $\beta$ PIX/ARHGEF7 exprimierendes CHO-K1-Zelllysate. Links sind einige Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards in kDa angegeben.

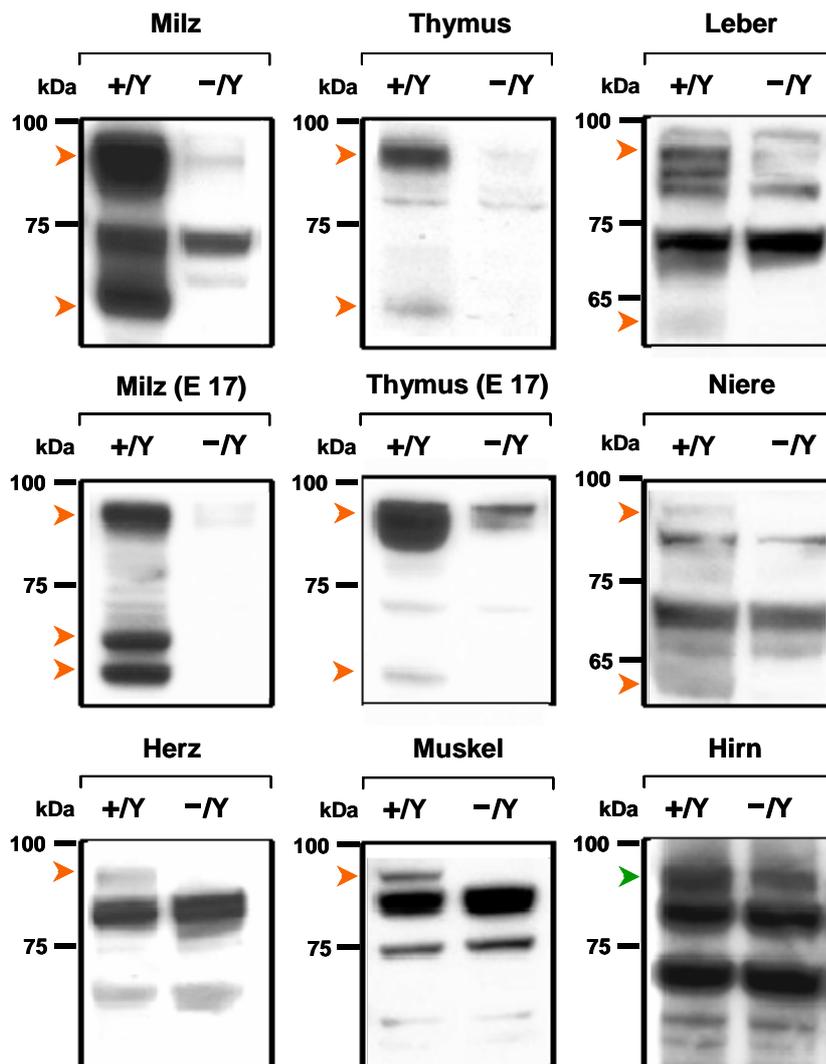
Dabei zeigte sich, dass das Serum in der Lage war, ektopisch exprimiertes  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (~87 kDa) zu erkennen. Ektopisch überexprimiertes FLAG- $\beta$ PIX/ARHGEF7 hingegen wurde durch diesen Antikörper nicht nachgewiesen. Die Detektion weiterer Proteinbanden neben dem „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Unspezifität des Antikörpers zurückzuführen.

#### 4.3 Analyse der gewebsspezifischen Expression von $\alpha$ Pix/Arhgef6 mit Hilfe des anti-CH-L-Antikörpers

Nach mehrfachen Immunisierungen der Kaninchen und affinitätschromatographischen Aufreinigungen durch die Firma „Biogenes“ zeigte sich eine erhöhte Spezifität des anti- $\alpha$ Pix/Arhgef6[CH-L]-Serums. Dieses Serum, im folgenden anti-CH-L-Antikörper genannt, war in der Lage, endogenes  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in verschiedenen Geweben der Wildtyp-Maus immunologisch auf Western-Blot-Ebene zu detektieren. Der polyklonale anti-CH-L-Antikörper wies aber dennoch eine geringe Spezifität auf, so dass in den Geweben der Wildtyp-Tiere mehrere Banden unterschiedlicher Größen detektiert wurden. Daher wurden weiterhin vergleichende Analysen zwischen Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen durchgeführt.

#### 4.3.1 Untersuchung der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression in verschiedenen Gewebelysaten der adulten sowie der embryonalen Wildtyp- und $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mittels Western-Blot

Für Expressionsanalysen von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 wurden Lysate von Geweben einer Wildtyp- und einer Knockout-Maus hergestellt und Western-Blots mit dem anti-CH-L-Antikörper durchgeführt (Abb. 23).



**Abb. 23: Darstellung der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression in verschiedenen Geweben der adulten und der embryonalen Wildtyp- bzw.  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mittels Western-Blot**

Proteinlysate verschiedener Gewebe wurden mittels 4-12% Gradienten-SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit dem anti-CH-L-Antikörper auf die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 hin untersucht. Dargestellt sind Western-Blots verschiedener  $\alpha$ Pix/Arhgef6-exprimierender Gewebe der adulten Wildtyp-Maus sowie Wildtyp-Embryonen. Entsprechende Gewebelysate der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus sind jeweils daneben aufgetragen. Die Pfeilspitzen (rot) weisen auf die detektierten Isoformen des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins. Die grüne Pfeilspitze weist auf diejenige Höhe, auf der „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hirnlysate nachgewiesen werden sollte. Auf der linken Seite der Western-Blots sind einige Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards markiert.

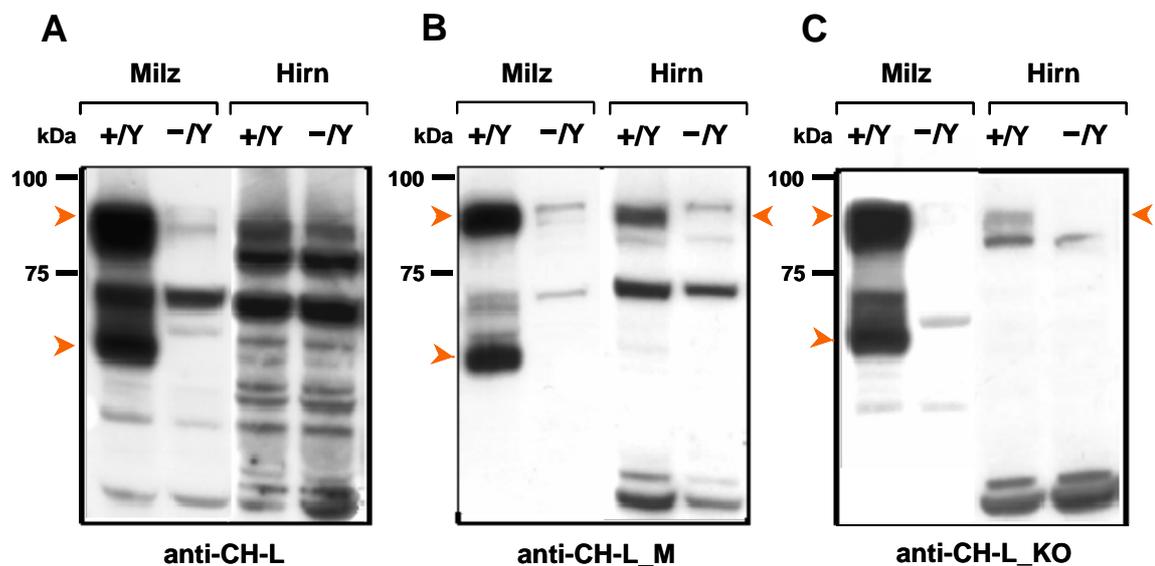
Nach Zellyse der einzelnen Organe, Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Immundetektion mittels des anti-CH-L-Antikörpers konnte eine starke Expression des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins mit einer Größe von  $\sim 87$  kDa in Milz und Thymus sowohl in adulten Wildtyp-Mäusen als auch in 17 Tage alten Wildtyp-Embryonen nachgewiesen werden (Abb. 23). Daneben wurde eine kleinere  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform von etwa 65 kDa in diesen beiden Geweben detektiert. In Wildtyp-Embryonen (E 17) wurde eine weitere Bande von  $\sim 69$  kDa in der Milz beobachtet. In Niere, Leber, Muskel und Herz konnte ebenfalls eine Expression des „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins gezeigt werden, die allerdings etwas schwächer war. Zudem wurde eine weitere  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform mit einer Größe von etwa 61 kDa in Niere und Leber beobachtet. Im Gegensatz dazu waren keine der oben genannten  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteine in den  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen nachweisbar. Zusätzlich wurden Hirnlysate der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus auf die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 hin untersucht. Durch Verwendung des anti-CH-L-Antikörpers konnte im Hirn weder „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ( $\sim 87$  kDa) noch die in Abbildung 19B gezeigte hirnspezifische  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform ( $\sim 72$  kDa) detektiert werden.

Zusammenfassend bestätigt diese Expressionsanalyse die postulierte ubiquitäre Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6. Der Nachweis verschiedenener  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen deutet auf das Vorhandensein von mehreren Spleißvarianten hin, die spezifisch in verschiedenen Geweben exprimiert werden.

#### **4.3.2 Affinitätsaufreinigung des Antikörperserums und Analyse des aufgereinigten anti-CH-L-Antikörpers**

Polyklonale Antikörper weisen häufig unbekannte und unerwünschte Spezifitäten auf, da das Serum auch Antikörper gegen nicht bekannte Antigene enthält und infolgedessen Kreuzreaktionen entstehen. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund des breiten Reaktionsspektrums des polyklonalen anti-CH-L-Antikörpers die Detektion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Gehirn der Wildtyp-Maus im Western-Blot nicht möglich war (Abb. 23). Um Untersuchungen zur spezifischen Expression des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins im Gehirn zu ermöglichen, war es somit erforderlich, den anti-CH-L-Antikörper aufzureinigen. Dazu wurden zwei verschiedene Strategien angewandt, die im folgenden beschrieben werden. Um die spezifisch gegen das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein reagierenden Antikörper von den übrigen im Serum enthaltenen unspezifischen Antikörpern zu trennen, wurde im ersten Verfahren möglichst viel überexprimiertes HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran

transferiert. Zur Identifizierung des Proteins wurde die Membran mit Hilfe einer Ponceau-Färbelösung gefärbt. Nach Ausschneiden der spezifischen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteinbande wurde diese mit dem polyklonalen anti-CH-L-Antikörper inkubiert und anschließend die an diesen Membranstreifen gebundenen,  $\alpha$ Pix/Arhgef6-spezifischen Antikörper eluiert. Der auf diesem Weg aufgereinigte Antikörper wird im folgenden anti-CH-L\_M genannt. Die zweite Strategie basiert auf der Entfernung der im Serum enthaltenen unspezifischen Antikörper durch Verwendung von Hirnschnitten der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Gewebeschnitte mit dem polyklonalen anti-CH-L-Antikörper inkubiert. Der so aufgereinigte Antikörper bekam die Bezeichnung anti-CH-L\_KO. Die Spezifität und Eignung dieser beiden Antikörper wurde in Western-Blot-Analysen getestet. Als Positivkontrolle diente ein Milzlysate der Wildtyp-Maus und ein entsprechendes Milzlysate der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus (Abb. 24).



**Abb. 24: Vergleich der Spezifität der aufgereinigten Antikörper anti-CH-L\_M und anti-CH-L\_KO mit dem polyklonalen anti-CH-L-Antikörper durch Western-Blot-Analysen und Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hirn der Wildtyp-Maus**

Zum Vergleich der Spezifität der verschiedenen aufgereinigten Antikörper und zum Nachweis der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hirn wurden Proteinlysate von Milz und Hirn der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus verwendet. (A) Dargestellt ist die Detektion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der Milz der Wildtyp-Maus mittels des polyklonalen anti-CH-L-Antikörpers (links). Eine Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hirn konnte mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden (rechts). (B) Detektion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 sowohl in der Milz als auch im Hirn der Wildtyp-Maus durch Verwendung des über die PVDF-Membran gereinigten anti-CH-L\_M-Antikörpers. (C) Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in den gleichen Lysaten mittels des über Hirn-Gewebeschnitte einer  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus aufgereinigten anti-CH-L\_KO-Antikörpers. Die roten Pfeilspitzen markieren die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen. Auf der linken Seite der Blots sind die Molekulargewichte des verwendeten Proteinstandards angegeben.

Wie in Abbildung 24B und 24C gezeigt, detektieren beide aufgereinigten Antikörper in der Milz der Wildtyp-Maus sowohl das „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (~87 kDa) als auch die kleinere 65 kDa  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform, welche bereits mit dem anti-CH-L-Antikörper detektiert wurde (Abb. 24A). Die Detektion der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteine in der Milz gelang mit beiden aufgereinigten Antikörpern mit annähernd gleicher Intensität im Vergleich zum polyklonalen anti-CH-L-Antikörper. Somit war davon auszugehen, dass die Aufreinigungsschritte zu keiner Abnahme der Antikörper-Konzentration geführt hatten. Durch Verwendung des anti-CH-L\_M- und des anti-CH-L\_KO-Antikörpers gelang die Detektion von endogenem  $\alpha$ Pix/Arhgef6 erstmals auch im Gesamthirn der Wildtyp-Maus. Im Vergleich dazu war in der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus kein  $\alpha$ Pix/Arhgef6 detektierbar (Abb. 24B und C). Die erhöhte Spezifität der Antikörper zeigte sich in der Abnahme unspezifischer Proteinbanden.

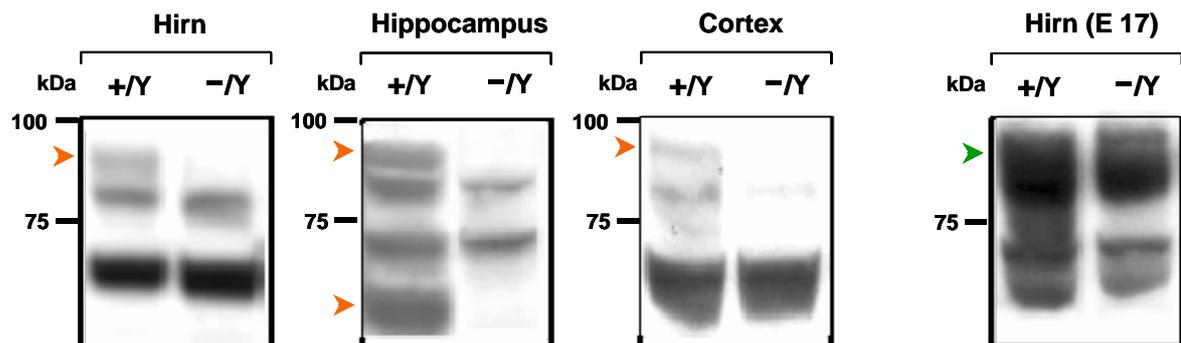
Um den für die Herstellung des aufgereinigten Antikörpers erforderlichen Zeit- und Arbeitsaufwand zu minimieren, wurde für alle weiteren Expressionsanalysen der anti-CH-L\_M-Antikörper verwendet.

#### **4.3.3 Untersuchung der Expression von $\alpha$ Pix/Arhgef6 in verschiedenen Hirnregionen**

Mit Hilfe des anti-CH-L\_M-Antikörpers war es nun möglich, die Proteinexpression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Gesamthirn und in verschiedenen Hirnregionen der Maus zu untersuchen. Dazu wurden zunächst die Hippocampi und der Cortex aus dem Gehirn von Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen isoliert und anschließend lysiert. Nach Western-Blot-Analyse war sowohl im Homogenat des Gesamthirns als auch im Homogenat des Hippocampus und Cortex der Wildtyp-Maus das „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 detektierbar. Zudem konnte eine spezifische Expression einer ~65 kDa  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform im Hippocampus der Wildtyp-Maus gezeigt werden. Der Nachweis von „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen im Hirn von 17 Tage alten Wildtyp-Embryonen gelang mit diesem Antikörper nicht (Abb. 25).

Nach Vergleich der beiden Abbildungen 24B und 25, in denen Western-Blots von Proteinlysaten des Gesamthirns der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus dargestellt sind, können trotz Verwendung des gleichen Antikörpers (anti-CH-L\_M) gewisse Intensitätsunterschiede einzelner Banden beobachtet werden. Überdies ist im Hirnlysat des Knockout-Tieres in Abbildung 24B eine zusätzliche Bande zu erkennen, die im entsprechenden Proteinlysat in Abbildung 25 nicht nachweisbar ist. Diese Tatsachen sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Eigenschaften des polyklona-

len anti-CH-L\_M-Antikörpers zurückzuführen. Das breite Bindungsspektrum polyklonaler Antikörper ist nachteilig, da sie auch Antigene mit ähnlicher Oberfläche binden und so unerwünschte Kreuzreaktionen bewirken können. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass es nach Aufreinigungsprozessen des anti-CH-L\_M-Antikörpers zu leichten pH-Wert-Verschiebungen gekommen ist, die nachfolgend die Bindungseigenschaften des Antikörpers verändert haben.

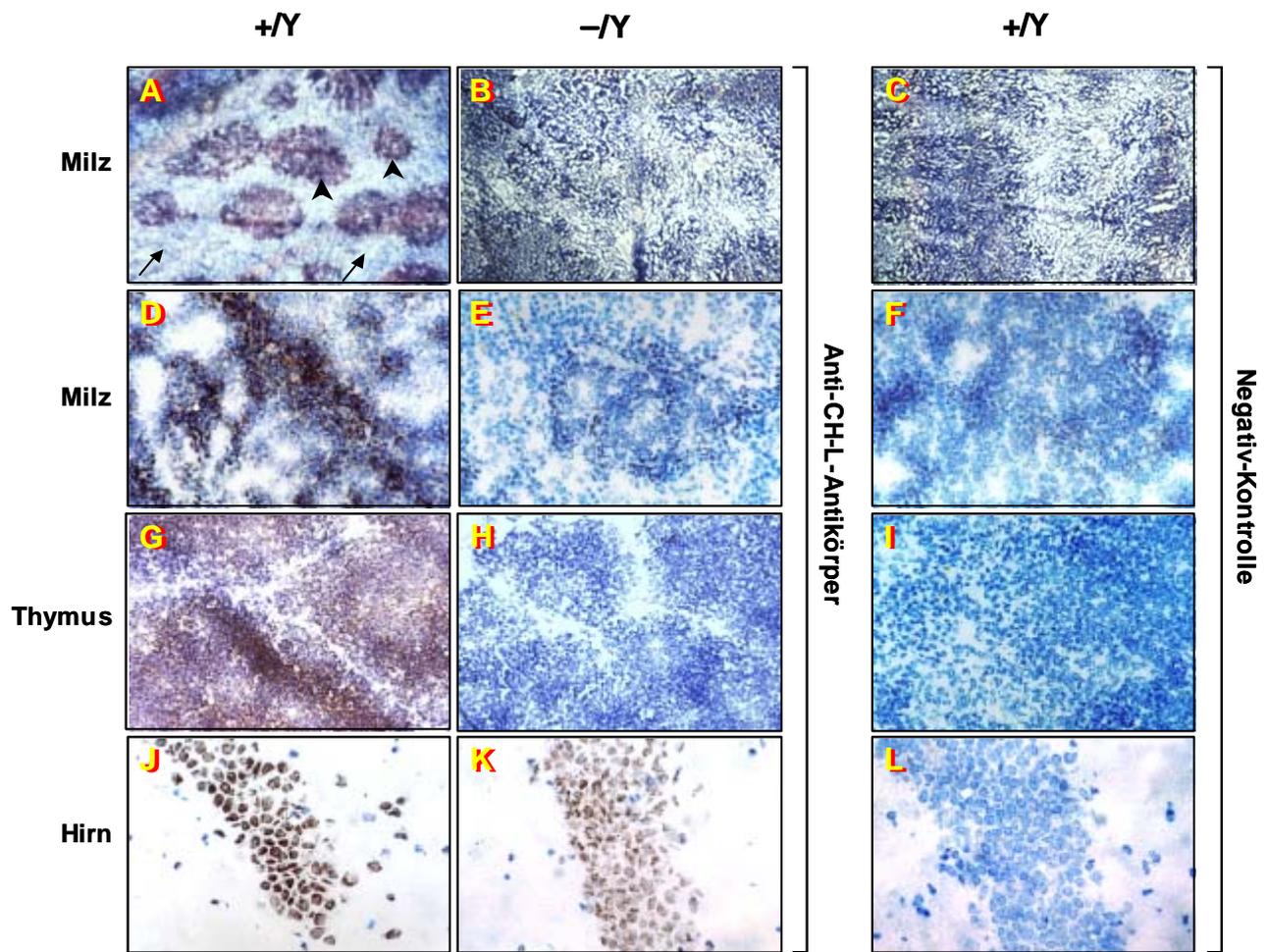


**Abb. 25: Nachweis der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hippocampus und im Cortex mittels Western-Blot**

Dargestellt sind Western-Blots von Proteinlysaten des Gesamthirns, Hippocampus und Cortex der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus. Die Detektion von endogenem  $\alpha$ Pix/Arhgef6 erfolgte mit Hilfe des anti-CH-L\_M-Antikörpers. „Full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (~87 kDa) und eine  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform im Hippocampus (~65 kDa) sind mit Pfeilspitzen (rot) markiert. Diejenige Höhe, auf der „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hirn von Wildtyp-Embryonen (E 17) detektiert werden sollte, ist durch eine grüne Pfeilspitze markiert. Einige Molekulargewichte des Proteinstandards sind am linken Rand der Western-Blots angegeben.

#### 4.3.4 Histochemische Analysen zum Nachweis der zellulären Lokalisation von $\alpha$ Pix/Arhgef6 in verschiedenen Geweben

Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, konnte mittels Western-Blot eine starke  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression in Milz und Thymus gezeigt werden. Geringere Mengen wurden im Gehirn und in Leber, Niere, Muskel sowie im Herzen nachgewiesen. Zur Untersuchung der zellspezifischen Expression des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in diesen Geweben wurden histochemische Färbungen an verschiedenen Gewebeschnitten der adulten Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus durchgeführt. Dafür wurden horizontale Gefrierschnitte des Gesamthirns, Thymus und Herzens sowie der Milz, Leber und Niere angefertigt, mit dem anti-CH-L-Antikörper inkubiert und im Zuge einer Avidin-Biotin-Reaktion mittels Diaminobenzidin braun gefärbt. Zur morphologischen Übersicht wurden die Zellkerne mittels Hämatoxylin blau gefärbt (Abb. 26).



**Abb. 26: Immunhistochemische Analyse der zellulären Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Milz, Thymus und Hirn der Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus**

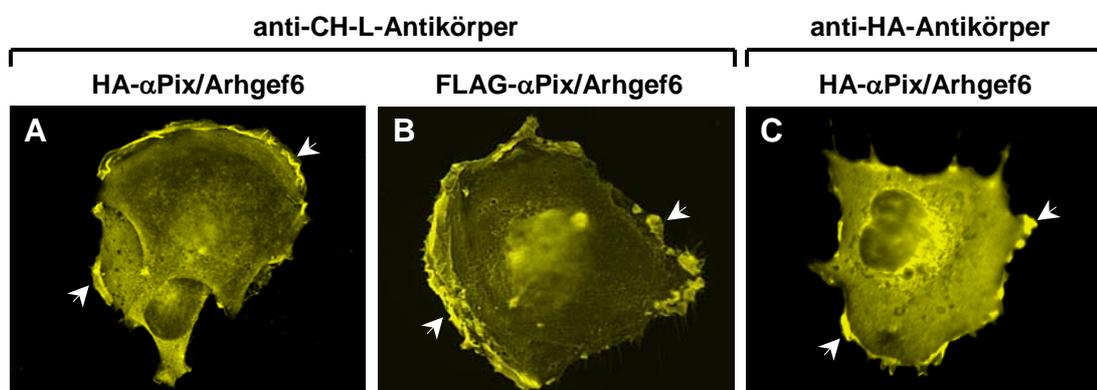
Horizontale Gefrierschnitte (5  $\mu$ m) von Milz (A-F), Thymus (G-I) und Hirn (J-L) der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus wurden auf die zelluläre Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 hin untersucht. Die Schnitte wurden mit dem primären anti-CH-L-Antikörper und einem sekundären anti-Kaninchen-Antikörper mit Hilfe der Avidin-Biotin-Technik und mittels Diaminobenzidin braun gefärbt. Die Zellkerne wurden durch Hämatoxilin blau gefärbt. Als Negativ-Kontrolle wurden entsprechende Schnitte nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert (C,F,I,L). Die histologische Auswertung und Beurteilung der Färbereignisse erfolgten im direkten Vergleich mit einem Durchlichtmikroskop in der 10-fachen (A-C) und 40-fachen Vergrößerung (D-L). Die Färbung in Milz und Thymus der Wildtyp-Maus repräsentiert eine Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in B- und T-Lymphozyten (A, D und G). In (A) ist die weiße Pulpa der Milz mit Pfeilspitzen, die rote Pulpa mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Abbildungen (J-L) zeigen jeweils einen Ausschnitt aus der CA3-Region des Hippocampus.

Die Abbildungen 26A-L zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen einer 10-fachen (A-C) bzw. 40-fachen Vergrößerung (D-L) der Gefrierschnitte. Die Milz ist gekennzeichnet durch die rote und weiße Pulpa, letztere besteht aus periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS, T-Lymphozytenregion) und den Milzknötchen (Malpighische Körperchen, B-Lymphozytenregion). Im Milzgewebe der Wildtyp-Maus war ein starkes Signal in der weißen Pulpa der Milz zu beobachten (Abb. 26A). Bei weiterer Vergrößerung ließen sich positive B- und T-Lymphozyten der weißen Pulpa mit

einer intrazellulären Braunfärbung erkennen (Abb. 26D). Durchgängig negativ stellten sich Zellen der roten Pulpa dar (Abb. 26A). An entsprechenden Schnitten der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus war kein Farbsignal zu beobachten (Abb. 26B und E). Der Thymus ist in Läppchen gegliedert, deren Struktur durch die Differenzierung in Rinde und Mark gegliedert wird. Der Thymus ist gekennzeichnet durch die Einlagerung einer großen Anzahl unterschiedlich differenzierter T-Lymphozyten. Die intensive und verbreitete Braunfärbung im Thymus der Wildtyp-Maus lässt somit eine Anfärbung von T-Lymphozyten vermuten (Abb. 26G). Entsprechende Schnitte der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus waren hingegen nicht gefärbt (Abb. 26H). Als Negativkontrolle dienten Gewebeschnitte der Wildtyp-Maus, welche nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt wurden. Bei diesen Schnitten war ebenfalls keine Färbung zu beobachten (Abb. 26C, F und I). Diese Charakteristika sprechen zusammen für einen spezifischen Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Lymphozyten der Milz und des Thymus. Im Hirn der Wildtyp-Maus gelang es mit dem anti-CH-L-Antikörper nicht, endogenes  $\alpha$ Pix/Arhgef6 immunhistochemisch nachzuweisen. Sowohl an Hirnschnitten der Wildtyp- als auch an entsprechenden Schnitten der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus stellte sich ein charakteristisches Muster mit gleichen Farbsignalen dar, obwohl im Hirngewebe der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus keine Färbung zu erwarten gewesen wäre (Abb. 26J und K). Nach morphologischer Beurteilung zeigten besonders Purkinjezellen des Cerebellums sowie Zellen der Hippocampus-Formation (pyramidale Zellen des *Cornu ammonis* und Körnerzellen des *Gyrus dentatus*) und des Cortex eine intensiv braune Anfärbung, die bei der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus schwächer ausfiel. (Abb. 26J und K und Daten nicht gezeigt). Nur mit dem sekundären Antikörper gefärbte Hirngewebeschnitte der Wildtyp-Maus waren nicht gefärbt (Abb. 26L). Trotz Anwendung verschiedener Fixierungsmethoden gelang es weder mit dem anti-CH-L-Antikörper noch mit den aufgereinigten Antikörpern anti-CH-L\_M und anti-CH-L\_KO, ein spezifisches  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Signal im Hirn der Wildtyp-Maus zu erzeugen. Auch an Schnitten der Leber, Niere und des Herzens war nur ein unspezifisches Signal zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Daher konnten detailliertere Erkenntnisse zur zellspezifischen Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in diesen Geweben mittels histochemischer Analysen nicht gewonnen werden.

#### 4.3.5 Charakterisierung des gegen $\alpha$ Pix/Arhgef6 gerichteten anti-CH-L-Antikörpers mittels Immunfluoreszenz-Analysen

Um die postulierte Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Neuronen weiter zu untersuchen, sollten Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt werden. Daher war es zunächst notwendig, die Fähigkeit des anti-CH-L-Antikörpers, exprimiertes  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein in der Immunfluoreszenz zu detektieren, zu überprüfen. CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 bzw. pFLAG-CMV-4-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 transient transfiziert. Von den Zellen überexprimiertes Protein wurde mit dem anti-CH-L-Antikörper detektiert. Als Positivkontrollen dienten ein Fluorescein-konjugierter anti-HA- bzw. ein anti-FLAG-Antikörper (Abb. 27).



**Abb. 27: Charakterisierung des anti-CH-L-Antikörpers anhand HA- und FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 überexprimierender CHO-K1-Zellen mittels Immunfluoreszenz**

CHO-K1-Zellen wurden mit pMT2SM-HA-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 bzw. pFLAG-CMV-4-DEST- $\alpha$ Pix/Arhgef6 transfiziert. Dargestellt ist die subzelluläre Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie. HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 sowie FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 wurden mit dem primären anti-CH-L-Antikörper und einem sekundären Alexa-Fluor488-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörper sichtbar gemacht. Die Pfeile zeigen auf die subzelluläre Verteilung von HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 (A), es sind zwei übereinander gelagerte Zellen gezeigt) bzw. FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 (B) an den äußersten Membranbereichen. Mit anti-HA als primären Antikörper und mit Alexa-Fluor488-konjugierten anti-Maus als sekundären Antikörper gefärbte Zellen dienten als Positivkontrolle. Diese Zellen zeigen eine vergleichbare subzelluläre Verteilung des HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins (C).

Der anti-CH-L-Antikörper detektierte überexprimiertes HA- $\alpha$ Pix/Arhgef6 sowie FLAG- $\alpha$ Pix/Arhgef6 verstärkt in Lamellipodien-ähnlichen Strukturen und Membranauffaltungen an der Zellperipherie. Gleichzeitig wurde eine Lokalisation um den Zellkern herum und schwächer im Cytoplasma beobachtet (Abb. 27A und B). Aufgrund der Detektion dieser beiden überexprimierten Proteine kann angenommen werden, dass der anti-CH-L-Antikörper das  $\alpha$ Pix/Arhgef6 selbst und nicht das HA- bzw.

FLAG-Epitop erkennt. Die Detektion mit dem anti-HA-Antikörper (Abb. 27C) bzw. anti-FLAG-Antikörper (Daten nicht gezeigt) zeigt eine entsprechende Verteilung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 innerhalb der Zelle.

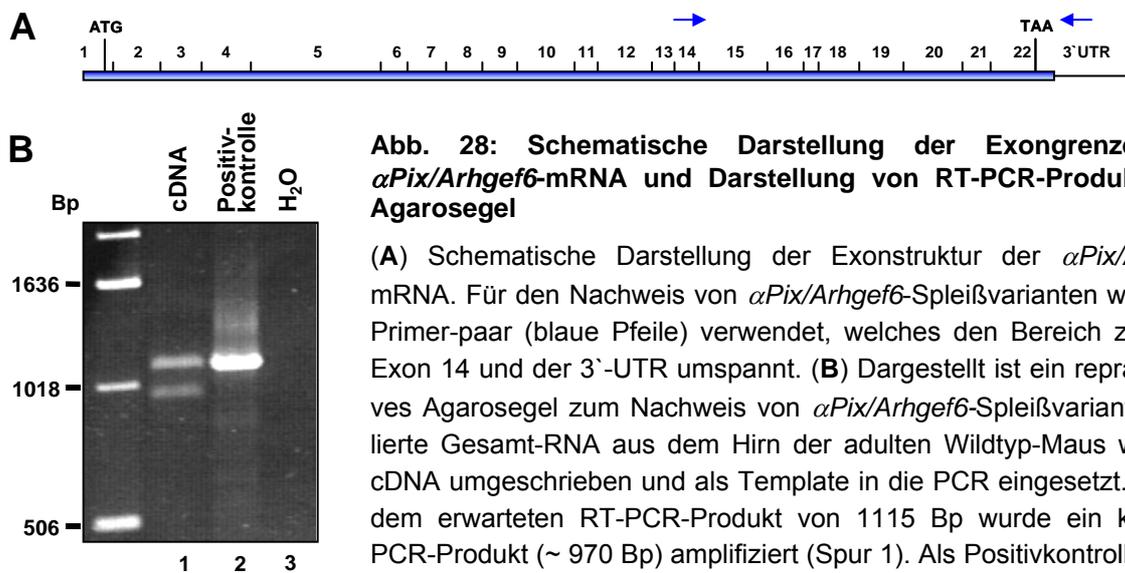
Die anschließend durchgeführte immunocytochemische Analyse von endogenem  $\alpha$ Pix/Arhgef6 an kultivierten Hippocampusneuronen der Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mittels des anti-CH-L-Antikörpers führte zu keinem Ergebnis. Aufgrund einer unspezifischen Färbung konnte in den Neuronen der Wildtyp-Maus kein  $\alpha$ Pix/Arhgef6 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend ist der anti-CH-L-Antikörper in der Lage, überexprimiertes  $\alpha$ Pix/Arhgef6 zu erkennen. Für weiterführende Immunfluoreszenz-Analysen an Zellen zum Nachweis von endogenem  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist dieser Antikörper allerdings nicht verwendbar.

## 5. Identifizierung von neuen $\alpha$ Pix/Arhgef6-Spleißvarianten mittels RT-PCR und Sequenzierung von EST-Klonen

Durch alternatives Spleißen entstehen unterschiedliche Transkripte, die nach Proteinbiosynthese zu verschiedenen Proteinisoformen führen. Wie in Kapitel 4 dieser Arbeit durch Western-Blot-Analysen gezeigt wurde, konnte mittels des anti-SH3-Antikörpers im Hirn der Wildtyp-Maus ein Protein mit einer Größe von ~72 kDa detektiert werden, welches im  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizienten Hirnlysat nicht nachzuweisen war. Neben der Identifizierung weiterer Spleißvarianten sollte für diese mögliche gehirnspezifische  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform nun das dazugehörige alternative Transkript identifiziert werden.

### 5.1 RT-PCR-Analysen an Gesamt-RNA aus dem Hirn der Maus und Sequenzanalyse von murinen EST-Klonen zur Identifizierung von $\alpha$ Pix/Arhgef6-Spleißvarianten

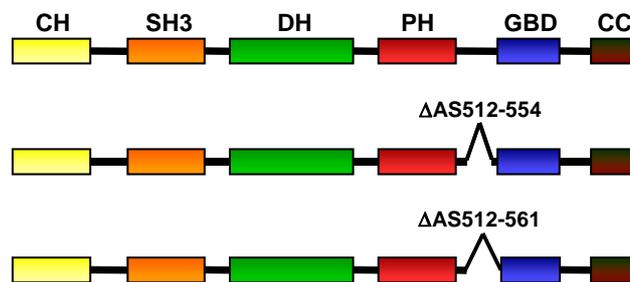
Für die Identifizierung hirnspezifischer Spleißvarianten des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Gens wurde Gesamt-RNA aus dem Hirn der adulten Wildtyp-Maus isoliert und mittels RT-PCR untersucht. Hierfür wurden verschiedene Primerpaare ausgewählt, welche überlappend den vollständigen Leserahmen und einen Bereich der sich anschließenden 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 umspannen. Als Positivkontrolle diente ein Plasmid, das die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Kodierregion und die 3'-UTR enthält (Abb. 28). Nach RT-PCR sollten daher mit dieser Positivkontrolle als Matrize nur Abschnitte der klonierten  $\alpha$ Pix/Arhgef6-cDNA amplifiziert werden, die der Länge der jeweiligen Wildtyp-Sequenz entsprechen. Bei allen verwendeten Primerkombinationen war sowohl mit der Positivkontrolle als auch mit der cDNA als Matrize ein PCR-Produkt in der erwarteten Länge des Wildtyp-Transkriptes nachweisbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 28: Schematische Darstellung der Exongrenzen der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA und Darstellung von RT-PCR-Produkten im Agarosegel**

(A) Schematische Darstellung der Exonstruktur der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA. Für den Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Spleißvarianten wurde ein Primer-paar (blaue Pfeile) verwendet, welches den Bereich zwischen Exon 14 und der 3'-UTR umspannt. (B) Dargestellt ist ein repräsentatives Agarosegel zum Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Spleißvarianten. Iso-lierte Gesamt-RNA aus dem Hirn der adulten Wildtyp-Maus wurde in cDNA umgeschrieben und als Template in die PCR eingesetzt. (Neben dem erwarteten RT-PCR-Produkt von 1115 Bp wurde ein kleineres PCR-Produkt (~ 970 Bp) amplifiziert (Spur 1). Als Positivkontrolle diente ein Plasmid als Matrize, welches die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Kodierregion und die 3'-UTR enthält (Spur 2). H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle verwendet (Spur 3). Links neben dem Gel sind einige Größen des 1 Kb DNA-Markers in Bp angegeben.

Im Falle der Primerkombination, durch die der Bereich zwischen Exon 14 und der 3'-UTR von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 amplifiziert wird (Abb. 28A), konnte auf der cDNA zusätzlich zum erwarteten Amplikon von 1115 Bp ein PCR-Produkt von etwa 970 Bp amplifiziert werden (Abb. 28B). Das PCR-Produkt wurde in den 2.1-TOPO-Vektor kloniert. Nach Minipräparation von Plasmid-DNA und Sequenzanalyse konnten zwei neue Spleißvarianten von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 identifiziert werden. In der ersten Variante fehlte das Exon 16, während bei der zweiten zusätzlich auch Exon 17 fehlte. In beiden Fällen kommt es zu keiner Verschiebung des Leserahmens, sondern zu einer „in frame“-Deletion der entsprechenden Nukleotidsequenz (Abb. 29).



**Abb. 29: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Wildtyp- $\alpha$ Pix/Arhgef6 und von  $\alpha$ Pix/Arhgef6[ $\Delta$ AS512-554] und-[ $\Delta$ AS512-561]**

Schematisch dargestellt ist die Domänenstruktur des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins sowie die der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen, die sich nach Expression der identifizierten Spleißvarianten ergeben würden. Im Vergleich zum Wildtyp- $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein fehlen der  $\alpha$ Pix/Arhgef6[ $\Delta$ AS512-554]-Isoform 42, und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6[ $\Delta$ AS512-561]-Isoform 49 Aminosäuren, die sich jeweils zwischen der PH- und der GBD-Domäne befinden.

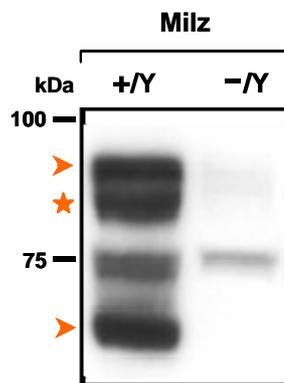
Durch das Herausspleißen des Exons 16 werden 42 Aminosäuren zwischen der PH- und der GBD-Domäne deletiert (Abb. 29, mitte). Die zusätzliche Deletion des Exons 17 führt zu einem Verlust von weiteren 7 Aminosäuren, wodurch es zum Fehlen der ersten drei Aminosäuren des N-terminalen Bereiches der GBD-Domäne kommt (Abb. 29, unten). Diese Isoformen wurden bislang noch nicht in der Literatur beschrieben und werden im Folgenden als  $\alpha Pix/Arhgef6[\Delta AS512-554]$  und  $\alpha Pix/Arhgef6[\Delta AS512-561]$  bezeichnet.

Parallel zu den RT-PCR-Analysen wurden 15 käuflich erworbene EST-Klone, die Teilbereiche muriner hirnspezifischer  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Sequenzen enthalten, auf mögliche Abweichungen innerhalb der klonierten cDNA-Sequenz hin analysiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA der erhaltenden Bakterienklone durch Minipräparation isoliert und in einer Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein des klonierten cDNA-Inserts hin überprüft. Durch direkte Sequenzanalyse des Inserts dieser Klone konnte bei einem Klon die oben beschriebene  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Transkriptvariante identifiziert werden, bei der die Exons 16 und 17 deletiert sind. Damit konnte nochmals unabhängig der Nachweis über die Existenz dieser  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Spleißvariante erbracht werden. Alle weiteren Klone beinhalteten die Wildtyp-Sequenz.

## 5.2 Nachweis der putativen 83 kDa $\alpha Pix/Arhgef6$ -Isoform mittels Western-Blot

Aus der Aminosäuresequenz der beiden identifizierten Spleißformen wurde das jeweilige Molekulargewicht berechnet. Danach hat das  $\alpha Pix/Arhgef6[\Delta AS512-554]$ -Protein ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 83,5 kDa und das des  $\alpha Pix/Arhgef6[\Delta AS512-561]$ -Proteins eines von etwa 83 kDa. Diese Größen korrelieren jedoch nicht mit der Größe der im Western-Blot nachgewiesenen hirnspezifischen 72 kDa  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Isoform (Kapitel 4). Überdies wurde mittels Western-Blot im Hirn der Wildtyp-Maus keine  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Isoform mit einem Molekulargewicht von ~83 kDa detektiert. Aufgrund dieser Daten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die mittels RT-PCR identifizierten Spleißformen im Hirn nicht translatiert werden bzw. die entsprechenden  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Isoformen für eine Detektion in zu geringen Mengen vorliegen. Bemerkenswerterweise konnte in der Milz der Wildtyp-Maus mittels Western-Blot neben der „full-length“  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Proteinbande eine zusätzliche Bande von etwa 83 kDa nachgewiesen werden, die in der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus nicht detektiert wurde (Abb. 30). Dies wurde durch eine starke Auftrennung der Proteine erzielt.

Es liegt nahe zu vermuten, dass das 83 kDa-Protein den beiden Spleißvarianten  $\alpha$ Pix/Arhgef6[ $\Delta$ AS512-554] und  $\alpha$ Pix/Arhgef6 [ $\Delta$ AS512-561] zuzuordnen ist. Eine genaue Zuordnung zu einer bestimmten Isoform ist wegen des geringen Größenunterschiedes zwischen diesen beiden Proteinen nicht möglich.



**Abb. 30: Nachweis der  $\alpha$ Pix/Arhgef6[ $\Delta$ AS512-554] bzw.  $\alpha$ Pix/Arhgef6[ $\Delta$ AS512-561]-Isoform in der Milz der Wildtyp-Maus mittels Western-Blot**

Dargestellt ist ein Western-Blot von Proteinlysaten der Milz der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus. Die Detektion der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen erfolgte mit Hilfe des anti-CH-L-Antikörpers. „Full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 (~ 87 kDa) und die 65 kDa  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die Bande der 83 kDa großen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform ist durch ein rotes Sternchen markiert. Am linken Rand des Western-Blots sind einige Molekulargewichte des Proteinstandards angegeben.

## **6. Analyse der zelltypspezifischen Lokalisation des $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins im Gehirn**

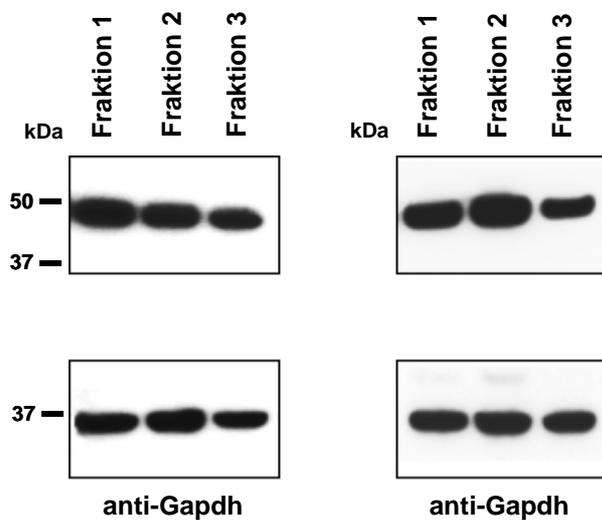
### **6.1 Untersuchung der Expression von $\alpha$ Pix/Arhgef6 in verschiedenen hirnspezifischen Zellpopulationen**

Eine gewebspezifische Expression des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins im Gehirn der adulten Maus konnte mit Hilfe des anti-CH-L-Antikörpers zwar eindeutig im Western-Blot nachgewiesen werden, nicht aber zelltypspezifisch in der Immunhistochemie oder in der Immunfluoreszenz. Deswegen sollten selektiv neuronale bzw. Glia-Zellen aus dem Hippocampus einer adulten Wildtyp- bzw.  *$\alpha$ Pix/Arhgef6*-Knockout-Maus angereichert werden, um daraus ein Proteinlysat herzustellen und dieses mittels Western-Blot im Hinblick auf die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression zu untersuchen. Die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 wurde im Hirn der adulten Wildtyp-Maus nachgewiesen, im Hirn von Wildtyp-Embryonen konnte allerdings kein Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 erbracht werden (Kapitel 4). Daher sollten hippocampale Neurone zunächst aus der adulten Maus isoliert und angereichert werden, obwohl die Isolierung und Anreicherung aus Mausembryonen im Allgemeinen besser gelingt.

#### **6.1.1 Anreicherung adulter hippocampaler Neuronen der Maus mittels Dichtegradientenzentrifugation**

In einem ersten Verfahren sollten Gliazellen und Neuronen mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert werden. Bei dieser Technik werden Zellen unterschiedlicher Dichte und Gewichts unter dem Einfluss starker Zentrifugalkräfte separiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich beispielsweise intakte adulte Hippocampuszellen aus der Ratte isolieren und anschließend kultivieren (Brewer 1997). Das von Brewer beschriebene, für die Dichtegradientenzentrifugation notwendige Lösen intakter Zellen aus dem Gewebeverband musste im Rahmen dieser Arbeit zunächst optimiert werden, da eine Vereinzelung intakter Zellen aus dem Hippocampus der Maus mit dieser Methode nicht erzielt wurde. Die vereinzelt erhaltenen Mauszellen wurden auf den von Brewer beschriebenen diskontinuierlichen Dichtegradienten gegeben. Dieser besteht aus vier verschiedenen Trennschichten, die wiederum jeweils aus einer viskosen Trennlösung (Optiprep<sup>TM</sup>) bestehen. Nach Abbruch der Zentrifugation zu einem geeigneten Zeitpunkt befinden sich die einzelnen Zellpopulationen in ihrer jeweiligen Dichtezone und lassen sich an einer definierten Stelle des Zentrifugenglases entnehmen.

Zunächst wurde der von Brewer beschriebene Dichtegradient für Rattenneurone (Gradient 1) eingesetzt. Danach sollten in Fraktion 1 hauptsächlich Oligodendrozyten, in den Fraktionen 2 und 3 insbesondere Neuronen und in der das Pellet bildenden Fraktion 4 Zellen höchster Dichte (Mikroglia-Zellen) angereichert sein. Astrozyten lassen sich durch dieses Verfahren kaum anreichern und sind nur zu einem äußerst geringen Anteil in allen Fraktionen vorhanden (Brewer 1997). Aus den einzelnen entnommenen Zellfraktionen wurden für die Expressionsanalyse von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 mittels Western-Blot Proteinlysate hergestellt. Zunächst wurden die einzelnen Zellfraktionen mit Hilfe zelltypspezifischer Antikörper auf das Vorhandensein von Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten überprüft (Abb. 31).



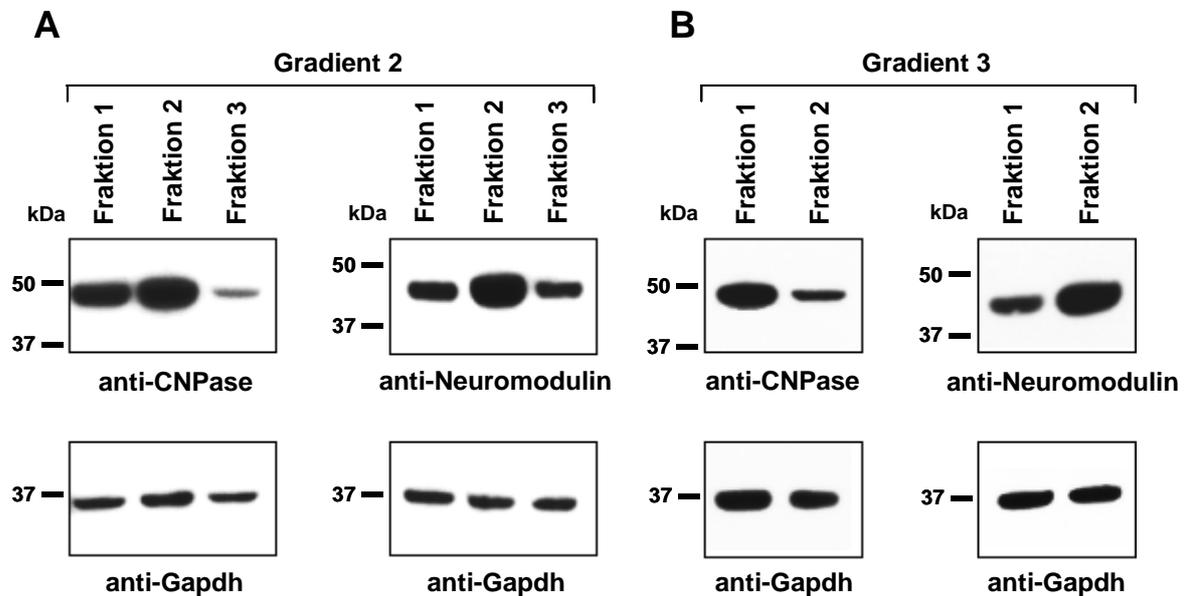
**Abb. 31: Western-Blot-Analysen zum Nachweis der spezifischen Anreicherung hippocampaler Gliazellen und Neuronen der Maus über Dichtezentrifugation mittels des Gradienten 1**

Aus dem Hippocampus einer Wildtyp-Maus wurden intakte Zellen isoliert und über den mehrschichtigen Dichtegradienten 1 (35%, 25%, 20%, 15%) in die Fraktionen 1, 2 und 3 getrennt. Der Nachweis von Oligodendrozyten erfolgte im Western-Blot mit dem Oligodendrozyten-spezifischen anti-CNPase Antikörper. Das Vorhandensein von Neuronen wurde mit dem anti-Neuromodulin-Antikörper untersucht. Als Ladekontrolle diente ein anti-Gapdh-Antikörper. Auf der linken Seite der Western-Blots sind einige Molekulargewichte in kDa angegeben.

Durch Verwendung des neuronenspezifischen anti-Neuromodulin-Antikörpers wurde der Gehalt an Neuronen kontrolliert. Oligodendrozyten wurden mit dem anti-CNPase-Antikörper nachgewiesen. Die Kontrolle zur Auftragung gleicher Proteinmengen erfolgte über die Bestimmung der Proteinexpression von Gapdh. In den Fraktionen 1, 2 und 3 wurde Gapdh mit Hilfe eines anti-Gapdh-Antikörpers in etwa gleicher Menge nachgewiesen. Durch Verwendung des Dichtegradienten 1 konnte keine Anreicherung einzelner Zellpopulationen erreicht werden. Nicht nur in Fraktion 1, sondern auch in den Fraktionen 2 und 3 konnten nahezu gleiche Mengen sowohl von Oligodendrozyten als auch von Neuronen nachgewiesen werden.

Infolgedessen war es erforderlich, einen für Mauszellen optimal angepassten Dichtegradienten zu etablieren. Um eine Anreicherung von Oligodendrozyten auf die Fraktion 1 zu beschränken und in den Fraktionen 2 und 3 weitestgehend zu vermeiden, wurde die Konzentration der einzelnen Trennschichten sukzessive und

unterschiedlich erhöht. Die verschiedenen Dichtegradienten wurden auf ihre Eignung zur Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen getestet. Zwei optimierte Dichtegradienten (Gradient 2 und 3), durch die eine partielle Auftrennung der Zelltypen in die entsprechenden Fraktionen erreicht werden konnte, sollen hier kurz vorgestellt werden (Abb. 32).



**Abb. 32: Darstellung der spezifischen Anreicherung von hippocampalen Gliazellen und Neuronen der Maus über Dichtezentrifugation mittels des Gradienten 2 bzw. 3**

Hippocampale Zellen einer Wildtyp-Maus wurden isoliert und mittels des mehrschichtigen Dichtegradienten 2 (40%, 35%, 30%, 20%) (A) bzw. des Dichtegradienten 3 (50%, 45%, 40%, 30%) (B) in die Zellfraktionen 1 bis 3 unterteilt. Der Gehalt von Oligodendrozyten und Neuronen wurde im Western-Blot mit den primären Antikörpern anti-CNPase und anti-Neuromodulin untersucht. Die Überprüfung des Gehaltes von Gapdh erfolgte mittels eines anti-Gapdh-Antikörpers. Links sind einige Protein-Molekulargewichte in kDa angegeben.

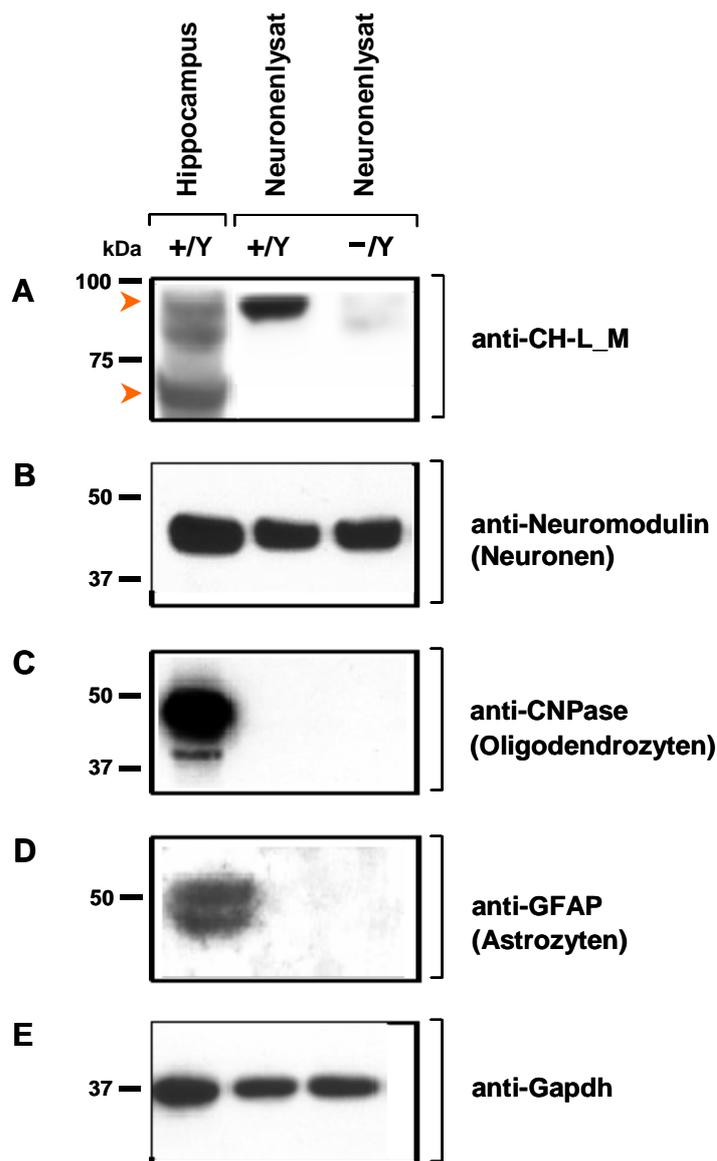
Durch Verwendung des Gradienten 2 konnte in den einzelnen Zellfraktionen eine deutliche Abnahme in der Menge von Oligodendrozyten in der Fraktion 3 gezeigt werden (Abb. 32A). Neuronen wurden hauptsächlich in der Fraktion 2 und in einer geringeren Menge in den Fraktionen 1 und 3 nachgewiesen. Gapdh wurde in allen Proteinlysaten in etwa gleicher Menge detektiert. Eine noch stärkere Anreicherung von Neuronen in den entsprechenden Zellfraktionen konnte mit Hilfe des Gradienten 3 erzielt werden (Abb. 32B). Es wurde eine erhöhte Menge an Oligodendrozyten in der Fraktion 1 nachgewiesen, während solche Zellen in Fraktion 2 in einer geringeren Menge vorlagen. Im Gegensatz dazu wurde eine hohe Menge an Neuronen in Fraktion 2 und eine vergleichsweise geringe Menge in Fraktion 1 detektiert. Die Menge an Gapdh war in den Fraktionen in etwa gleich (Abb. 32A und B). Wie bereits erwähnt, lassen sich Astrozyten durch dieses Verfahren kaum

anreichern und waren bei allen getesteten Dichtegradienten nur zu einem äußerst geringen Anteil in allen Fraktionen vorhanden (Daten nicht gezeigt).

Da eine optimale Auftrennung von murinen hippocampalen Neuronen und Gliazellen trotz Austestung verschiedener Optiprep-Dichtegradienten nicht erzielt werden konnte, wurden die Zellfraktionen nicht für eine Expressionsanalyse von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 genutzt.

### **6.1.2 Anreicherung embryonaler primärer hippocampaler Neuronen der Maus durch zelltypspezifische Kultivierung und Analyse der zellulären Lokalisation von $\alpha$ Pix/Arhgef6**

Die Aufreinigung von Gliazellen und Neuronen über Dichtegradientenzentrifugation war nur bedingt effizient. Für ein zweites Anreicherungsverfahren wurden embryonale Zellen der Wildtyp- bzw. der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus eingesetzt. Bei der in dieser Arbeit etablierten Methode wurden dazu hippocampale Zellen (E 16) aus den genannten Mausembryonen isoliert und für 24 Stunden kultiviert. Gliazellen wurden durch die Zugabe des Spindelapparatgiftes Cytosin- $\beta$ -D-Arabinofuranosid (AraC) gezielt abgetötet, so dass es infolgedessen zu einer Anreicherung von Neuronen in der Kultur kam. Nach weiteren 18 Stunden wurde aus dem Homogenat der Zellen Proteinlysate hergestellt und dieses mittels Western-Blot und Immundetektion auf den Gehalt verschiedener Zelltypen und hinsichtlich der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 untersucht (Abb. 33).



**Abb. 33: Darstellung der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in kultivierten primären hippocampalen Neuronen der Wildtyp-Maus mittels Western-Blot**

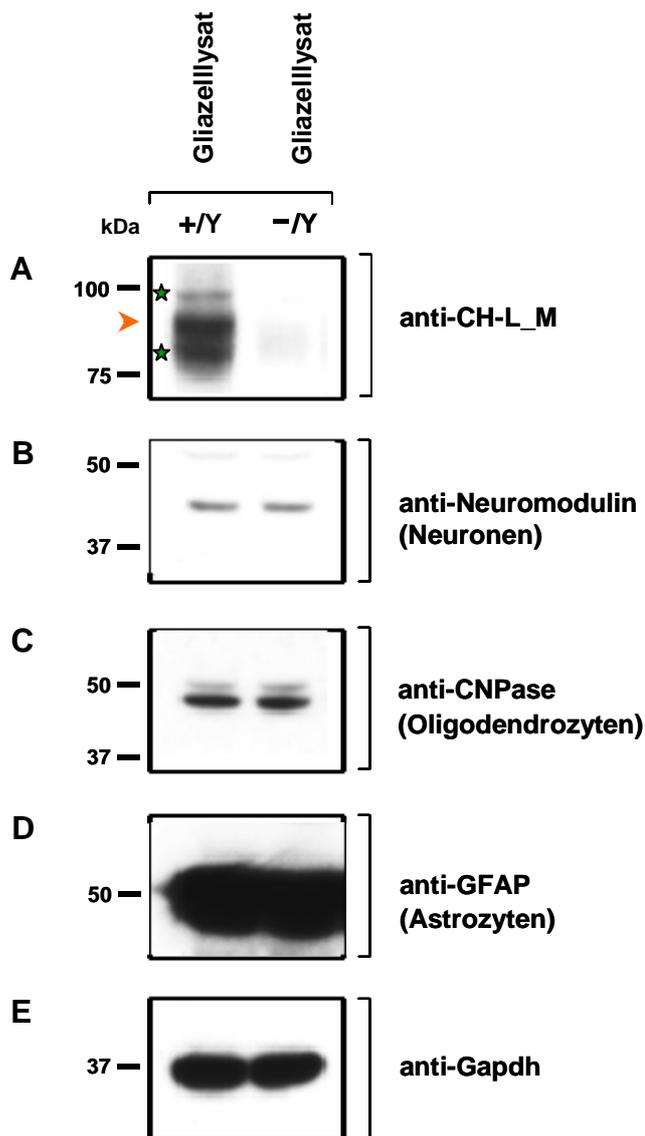
Zur Herstellung von Neuronenlysaten wurden Neuronen aus dem Hippocampus der embryonalen Wildtyp-Maus (+/Y) bzw.  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus (-/Y) kultiviert und zur Abtötung der Gliazellen nach 24 h mit AraC versetzt. Die Zellen wurden nach weiteren 18 h lysiert und im Hinblick auf das Vorkommen der verschiedenen Zellpopulationen und die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Western-Blot analysiert. Totales Hippocampuslysat diente als Positiv-Kontrolle. (A) Der Blot zeigt die Detektion von „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 und einer  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform (~65 kDa) mit dem anti-CH-L\_M-Antikörper (Pfeilspitzen). (B) Neuronen wurden mit dem anti-Neuromodulin-Antikörper identifiziert. (C) Oligodendrozyten und (D) Astrozyten konnten mit dem anti-CNPase-Antikörper bzw. dem anti-GFAP-Antikörper in diesem Lysat nicht nachgewiesen werden. (E) Als Marker für gleiche Proteinmengen wurde der anti-Gapdh-Antikörper verwendet. Einige Protein-Molekulargewichte sind links neben dem Blot in kDa angegeben.

Sowohl im Homogenat des Gesamt-Hippocampus (Positivkontrolle) als auch in den Lysaten der kultivierten Zellen von Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen konnten mit Hilfe des anti-Neuromodulin-Antikörpers Neuronen nachgewiesen werden (Abb. 33B). Um die Abwesenheit von Gliazellen und damit die Reinheit der Neuronenlysate zu bestätigen, wurden Gliazellspezifische Antikörper verwendet. Durch Verwendung des anti-CNPase- bzw. des anti-GFAP-Antikörpers konnten weder Oligodendrozyten noch Astrozyten detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden im Homogenat des Hippocampus Oligodendrozyten und Astrozyten nachgewiesen (Abb. 33C und D). Gapdh wurde in allen Proteinlysaten in nahezu gleicher Menge detektiert (Abb. 33E). Mit dieser Methode gelang somit eine selektive Anreicherung von embryonalen hippocampalen Neuronen der Maus. Für die

Detektion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in diesen neuronalen Lysaten wurde der anti-CH-L\_M-Antikörper verwendet. Wie schon in Kapitel 4.3.3 gezeigt, konnte im Hippocampus neben dem „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein (~87 kDa) eine kleinere 65 kDa  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform detektiert werden. Ebenso wurde im neuronalen Zelllysate der Wildtyp-Maus das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein (~87 kDa) stark angereichert nachgewiesen (Abb. 33A). Weitere  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen wurden nicht beobachtet. Im entsprechenden  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizientem Neuronenlysate wurde hingegen das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein nicht detektiert (Abb. 33A). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in hippocampalen Neuronen der Wildtyp-Maus exprimiert ist.

### **6.1.3 Kultivierung von Astrozyten zur Analyse der zellulären Lokalisation von $\alpha$ Pix/Arhgef6**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Gehirn auf Neuronen beschränkt oder ob  $\alpha$ Pix/Arhgef6 möglicherweise auch von Gliazellen exprimiert wird. Dazu wurden Cortex-Zellen aus dem Gehirn embryonaler Wildtyp- bzw.  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäuse gewonnen und zur Anreicherung von Astrozyten kultiviert. Den häufigsten Gliatyp im Hippocampus stellen die Astrozyten dar, die leicht anhand ihrer sternförmigen Zellform zu erkennen sind und sich über die Expression des intermediären Filamentproteins GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) definieren. Da Astrozyten für die Konditionierung des Mediums sorgen, fördern sie in den Kulturen zunächst das Wachstum von Neuronen. Bei einer Kultur in minimalem Gliazell-Medium sterben jedoch nach drei bis vier Wochen die Neuronen weitestgehend ab und auch Oligodendrozyten sind nur noch in geringer Menge nachweisbar. Daher wurden die angelegten Kulturen nach vier Wochen lysiert und die Lysate mittels Western-Blot und Immundetektion hinsichtlich der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 untersucht (Abb. 34).



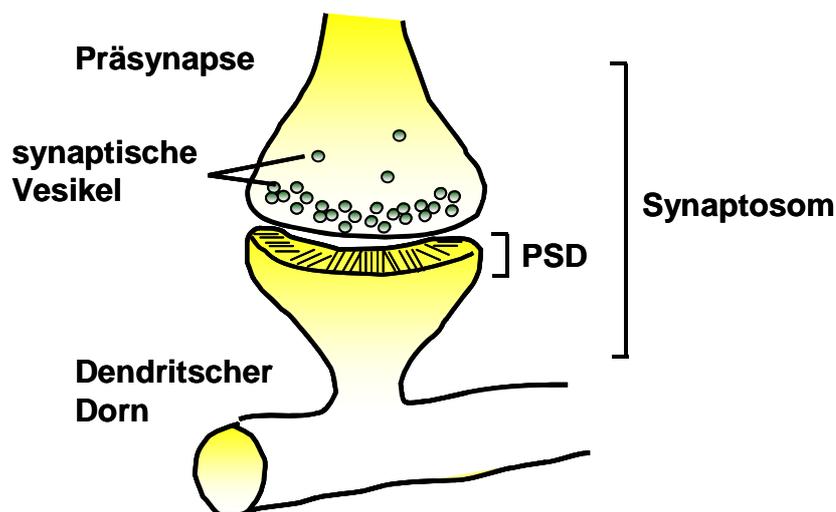
**Abb. 34: Darstellung der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Astrozyten-angereicherter Proteinlysate kultivierter Cortexzellen der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus mittels Western-Blot**

Es wurden Cortex-Zellen aus dem Gehirn embryonaler Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäuse gewonnen. Zur Anreicherung von Gliazellen wurden die Cortex-Zellen drei bis vier Wochen kultiviert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden auf das Vorhandensein verschiedener Zelltypen und hinsichtlich der Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Western-Blot analysiert. (A) Die Immundetektion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 erfolgte mit dem anti-CH-L\_M-Antikörper (rote Pfeilspitze). Die Detektion weiterer Proteinbanden (grüne Sternchen) sind auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen. (B) Der Gehalt an Neuronen wurde mit dem anti-Neuromodulin-Antikörper untersucht. (C) Oligodendrozyten wurden mit einem anti-CNPase-Antikörper, (D) Astrozyten mit einem anti-GFAP-Antikörper nachgewiesen. (E) Ein anti-Gapdh-Antikörper diente zur Detektion von Gapdh. Es sind einige Protein-Molekulargewichte links neben dem Blot in kDa angegeben.

In den Proteinlysaten konnten Astrozyten stark angereichert nachgewiesen werden (Abb. 34D). Im Gegensatz dazu wurde lediglich eine geringe Menge an Oligodendrozyten detektiert (Abb. 34C). Wie in Abbildung 34B gezeigt, waren in den Proteinlysaten Neuronen nur in einer äußerst geringen und damit vernachlässigbaren Menge vorhanden. Gapdh wurde in allen Proteinlysaten in etwa gleicher Menge detektiert (Abb. 34E). Mit Hilfe des anti-CH-L\_M-Antikörpers konnte  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Astrozyten-angereicherten Proteinlysate der Wildtyp-Maus nachgewiesen werden. Dagegen wurde im entsprechenden Proteinlysate der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein nicht detektiert (Abb. 34A).

## 6.2 Analyse der Verteilung von $\alpha$ Pix/Arhgef6 in synaptischen Membranfraktionen des Gehirns der Wildtyp- und $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus

Der Befund, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in primären hippocampalen Neuronen embryonaler Wildtyp-Mäuse exprimiert wird, ließ die Frage aufkommen, ob das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein auch in dendritischen Dornen lokalisiert ist. Für die Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene subzelluläre Fraktionen der Synapse biochemisch hergestellt. Dazu wurden aus dem löslichen Überstand des Gesamtproteinextraktes aus dem Gehirn von Wildtyp- und  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen mit Hilfe eines Sucrose-Dichtegradienten die Synaptosomen präpariert. Diese setzen sich aus dem präsynaptischen Endkopf (*bouton*) und dem postsynaptischen Dorn (*spine*) zusammen (Abb. 35).

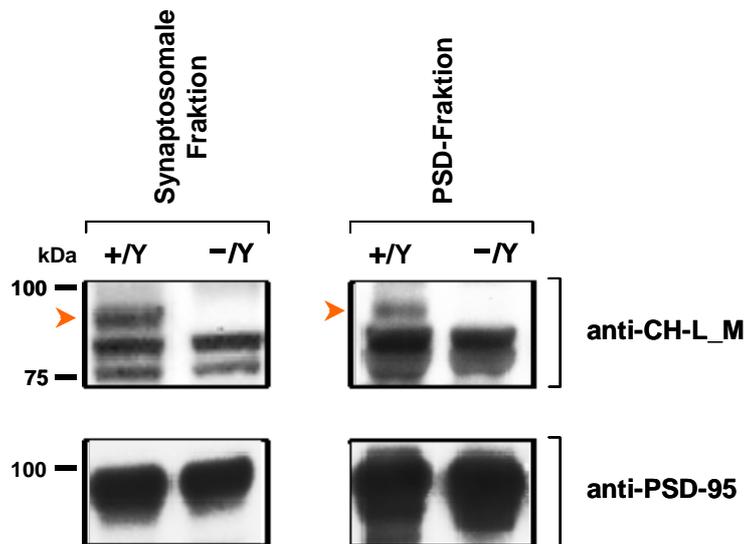


**Abb. 35: Schematische Darstellung einer chemischen Synapse**

In der Präsynapse befinden sich die synaptischen Vesikel, die den Neurotransmitter beinhalten und ihn zur aktiven Zone in der Präsynapse transportieren. Die Postsynapse enthält die Rezeptoren für den Neurotransmitter. Diese Rezeptoren, die in der postsynaptischen Membran verankert sind, bilden zusammen mit einem Netz von Proteinen die postsynaptische Dichte (PSD). Der präsynaptische Endkopf und der dendritische Dorn bilden zusammen das Synaptosom.

Durch erneute Zentrifugationsschritte wurden aus den Synaptosomen die synaptischen Verbindungsstellen (*synaptic junctions*) gewonnen, welche die prä- und postsynaptischen Membranen sowie membranverankerte Proteingerüste umfassen. Anschließend konnte die postsynaptische Dichte (PSD) durch Zugabe von Triton-X-100 isoliert werden, da sie für dieses Detergenz unlöslich ist. Die einzelnen Fraktionen wurden im Western-Blot auf ihre Zusammensetzung hin analysiert, wobei

das ausschließlich postsynaptisch exprimierte PSD-95-Protein als Indikator für die Reinheit der Präparation diente (Abb. 36).



**Abb. 36: Darstellung der subzellulären Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 mittels Western-Blot-Analyse an aufgereinigten synaptischen Fraktionen der Wildtyp- und der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus**

Subzelluläre Kompartimente synaptischer Regionen wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mittels eines Sucrose-Gradienten aufgereinigt. Pro Fraktion wurde 10  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen. PSD-95

wurde mit einem anti-PSD-95-Antikörper detektiert. Dargestellt ist die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6, detektiert mit dem anti-CH-L\_M-Antikörper, in der PSD- sowie in der synaptosomalen Fraktion (roter Pfeil). Links sind einige Protein-Molekulargewichte in kDa angegeben.

Wie zu erwarten, ergab die Detektion von PSD-95 in der aufgereinigten PSD-Fraktion der Wildtyp- und der Knockout-Maus das stärkste Signal (Abb. 36 unten rechts). Im Vergleich dazu wurde PSD-95 in der synaptosomalen Fraktion beider Genotypen mit einer schwächeren Intensität detektiert (Abb. 36 unten links). Mit Hilfe des anti-CH-L\_M-Antikörpers konnte  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in beiden Fraktionen der Wildtyp-Maus nachgewiesen werden, dagegen war in den entsprechenden Fraktionen der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus kein  $\alpha$ Pix/Arhgef6 detektierbar (Abb. 36 oben). Um einen Vergleich des Expressionslevels von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 zu ermöglichen, wurden gleiche Mengen beider Fraktionen aufgetragen: In der synaptosomalen Fraktion war  $\alpha$ Pix/Arhgef6 etwa um den Faktor 2 abundanter als in der PSD-Fraktion (Abb. 36).

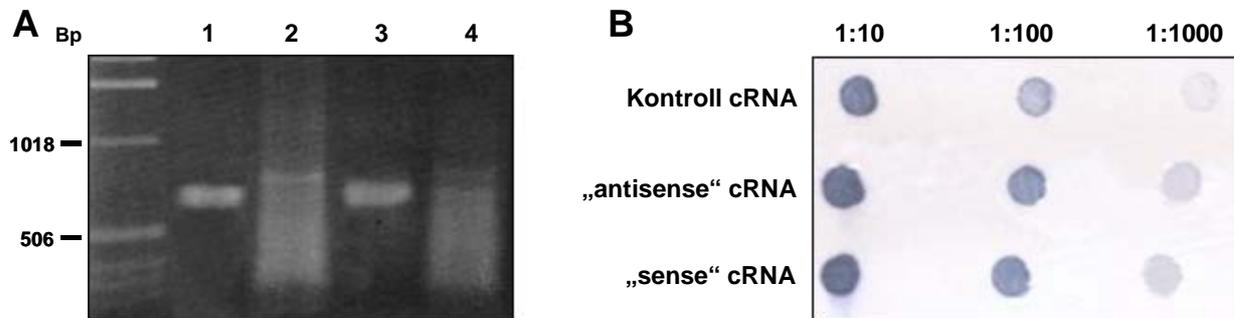
## 7. RNA-*in-situ*-Hybridisierung zur Bestimmung der subzellulären Verteilung der $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA in embryonalen hippocampalen Neuronen

Mit Hilfe der in Kapitel 6 beschriebenen neuronenspezifischen Anreicherungs-methode und den anschließenden Western-Blot-Analysen konnte ein Nachweis einer neuronalen Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 erbracht werden. Um die Expression der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA in diesen Zellen zu bestätigen, wurden RNA-*in-situ*-Hybridisierungsexperimente an hippocampalen primären Neuronen aus einem Wildtyp-Mausembryo durchgeführt. RNA-*in-situ*-Hybridisierungen ermöglichen es, die von einem Gen exprimierten Transkripte in Zellen oder Gewebeschnitten nachzuweisen, so dass Aussagen über eine zellspezifische Transkription ausgewählter Sequenzen gemacht werden können. Als Sonden für die RNA-*in-situ*-Hybridisierungsversuche werden in der Regel Digoxigenin-markierte, einzelsträngige cRNA-Moleküle verwendet, die komplementär zur mRNA-Sequenz des zu analysierenden Transkriptes sind. Werden diese auf die Zellen aufgebracht, binden sie dort an die komplementäre mRNA unter Ausbildung von doppelsträngigen cRNA/mRNA-Hybridmolekülen, die mittels eines immunologischen Nachweissystems detektiert werden können.

### 7.1 Herstellung einer $\alpha$ Pix/Arhgef6-spezifischen Digoxigenin-markierten cRNA-Sonde

Für eine spezifische Detektion des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Transkriptes wurde eine Sonde generiert, die neben den letzten 113 Bp der 5'-untranslatierten Region auch aus dem Teil der Kodierregion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 besteht, der die CH-Domäne und die sich anschließende Linker-Region bis zur SH3-Domäne umfasst. Zunächst wurde der entsprechende cDNA-Sequenzbereich von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in den pBluescript-SK-Vektor kloniert. Unter Verwendung des erhaltenen pBluescript-SK-5'UTR\_CH-L-Konstruktes als Template war es möglich, die für die *in-situ*-Hybridisierung notwendigen „antisense“ und „sense“-Sonden zu generieren. Die Herstellung der Sonden erfolgte mittels *in vitro*-Transkription in Gegenwart von Digoxigenin-markiertem dUTP. Die „antisense“-Sonde, die zur in der Zelle vorkommenden mRNA komplementär ist, hybridisiert mit den  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Transkripten und ermöglicht somit über die Detektion der entstandenen cRNA/mRNA-Hybride die Identifizierung der transkriptbildenden Zelle. Die „sense“-Sonde wird als Negativkontrolle verwendet, da sie identisch zur mRNA-Sequenz ist und deshalb im *in-situ*-Experiment keine Hybridisierungssignale ergeben sollte. Vor dem Einsatz der Sonden wurden diese zunächst bezüglich ihrer Qualität

sowie auf ihre Größe hin überprüft. Zu diesem Zweck wurden Aliquots aus den *in vitro*-Ansätzen der unfragmentierten bzw. der durch Hydrolyse fragmentierten „antisense“- und „sense“-Sonde in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert (Abb. 37A). Ein anschließender immunologischer Nachweis dieser Sonden diente zur Probenquantifizierung (Abb. 37B).



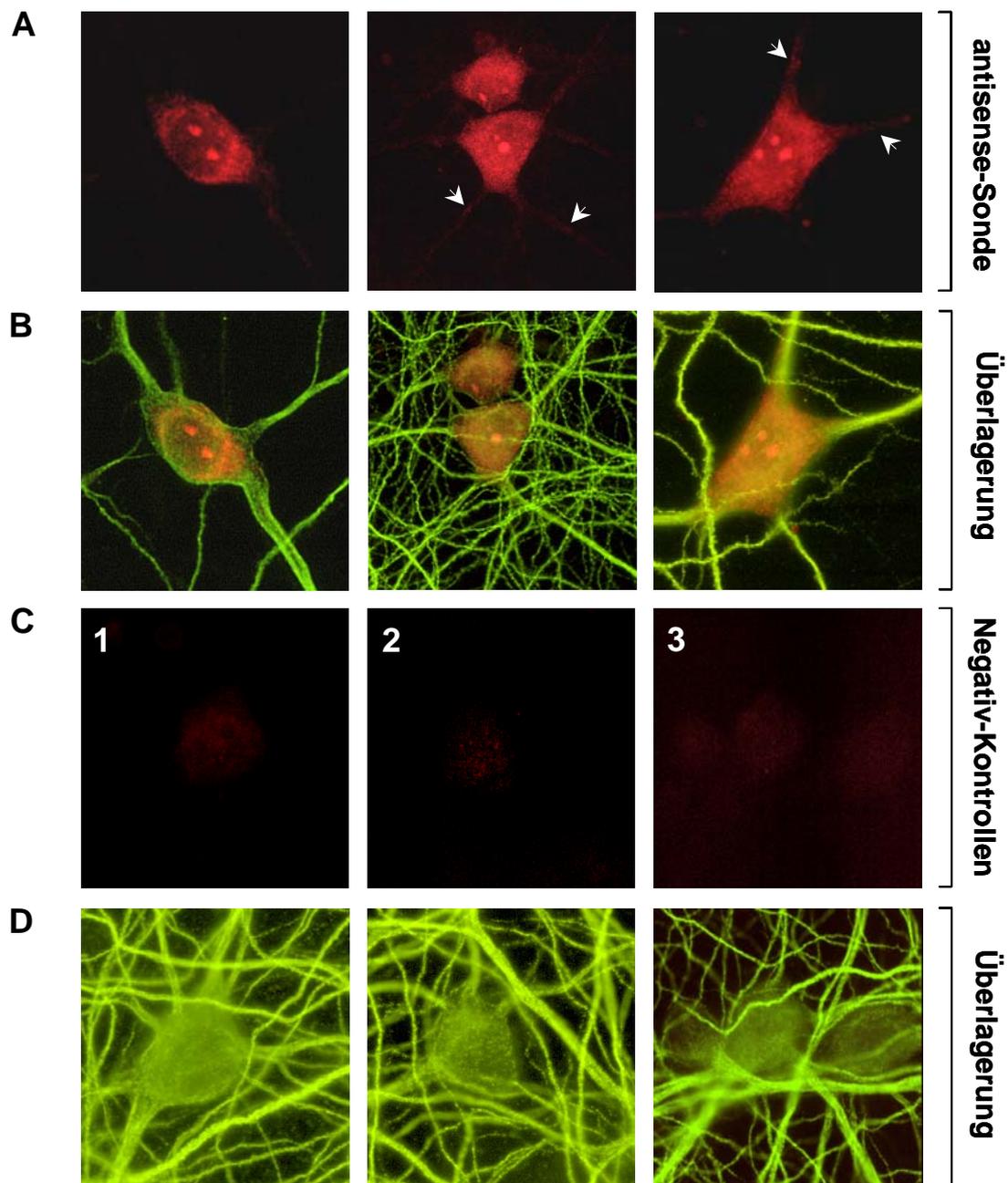
**Abb. 37: Agarosegelanalyse sowie immunologische Detektion der *in vitro* generierten Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden**

(A) Es wurden jeweils 2  $\mu$ l des *in vitro*-Ansatzes der unfragmentierten „antisense“- (Spur 1) und „sense“-Sonde (Spur 3) bzw. 5  $\mu$ l der durch Hydrolyse fragmentierten Sonden (Spur 2 und 4) mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Eine 1 Kb-Leiter wurde als Größenstandard links außen aufgetragen; einige Größen sind in Bp angegeben. (B) Darstellung der Quantifizierung der *in vitro* generierten  $\alpha$ Pix/Arhgef6-spezifischen „antisense“- und „sense“-Sonde. Aliquots der einzelnen cRNA-Sondenverdünnungen der hydrolysierten *in vitro*-Transkriptionsansätze wurden auf Nitrocellulose aufgetropft. Eine positive Kontroll-cRNA diente als relativer Vergleich. Der immunologische Nachweis der cRNA-Sonden erfolgte mit einem enzymgekoppelten Antikörper gegen Digoxigenin und einer abschließenden Farbreaktion.

Die in Abbildung 37A dargestellte Gelanalyse zeigt die 597 Bp großen unfragmentierten cRNA-Sonden sowie die als leichten Schmier zu erkennenden fragmentierten „antisense“- und „sense“-Sonden. Zur Probenquantifizierung sowie zum Nachweis des eingebauten Digoxigenin-Moleküls wurden von den *in vitro*-Ansätzen beider Sonden Verdünnungen hergestellt und Aliquots punktförmig auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht (Abb. 37B). Als Positivkontrolle diente eine bereits getestete cRNA mit bekannter Konzentration. Die Digoxigenin-markierten cRNA-Moleküle wurden mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper detektiert. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte über die Enzymreaktion der an den Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase. Nach Zugabe einer farblosen Substratlösung erfolgte der Nachweis über die Bildung eines dunkelvioletten Präzipitates. Anschließend wurde die Signalintensität der einzelnen Spots visuell miteinander verglichen. Der Vergleich mit der Kontroll-cRNA zeigte, dass Digoxigenin-markierte  $\alpha$ Pix/Arhgef6-„antisense“- und „sense“-cRNA in ausreichender Menge synthetisiert worden war.

## 7.2 RNA-*in-situ*-Hybridisierung an hippocampalen Neuronen von Wildtyp-Embryonen

Für die *in-situ*-Hybridisierung wurden hippocampale Neuronen embryonaler Wildtyp-Mäuse (E 18) isoliert und nach 12 bis 14 Tagen Primärkultur fixiert. Gliazellen wurden während der Kultivierung durch Zugabe von AraC gezielt eliminiert. Die für die *in-situ*-Hybridisierung geeignete Konzentration der „antisense“- und „sense“-Sonde wurde im Vorfeld durch *in-situ*-Hybridisierung-Experimente mit verschiedenen Verdünnungsreihen der Sonden bestimmt. Die cRNA/mRNA-Hybride wurden immunocytochemisch mit einem primären Cy3-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper und zur Signalverstärkung mit einem Cy3-gekoppelten sekundären anti-Maus-Antikörper nachgewiesen (rotfluoreszierend). Zur Identifizierung von Neuronen und Beurteilung ihrer Morphologie wurden die Dendriten mit einem gegen das Mikrotubulin gerichteten primären anti-MAP2-Antikörper und einem Alexa-Fluor 488-konjugierten Zweit-Antikörper gefärbt (grünfluoreszierend). Die Abbildung 38 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von hippocampalen Neuronen der embryonalen Wildtyp-Maus nach Hybridisierung mit der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-spezifischen „antisense“-Sonde und der als Negativ-Kontrolle verwendeten „sense“-Sonde. Als weitere Negativ-Kontrollen dienten Neuronen, die nur mit dem primären anti-Digoxigenin-Antikörper bzw. nur mit dem sekundären anti-Maus-Antikörper, nicht aber mit der cRNA-Sonde inkubiert wurden.



**Abb. 38: RNA-*in-situ*-Hybridisierung an kultivierten primären hippocampalen Neuronen embryonaler Wildtyp-Mäuse zur Analyse der subzellulären Verteilung der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -mRNA**

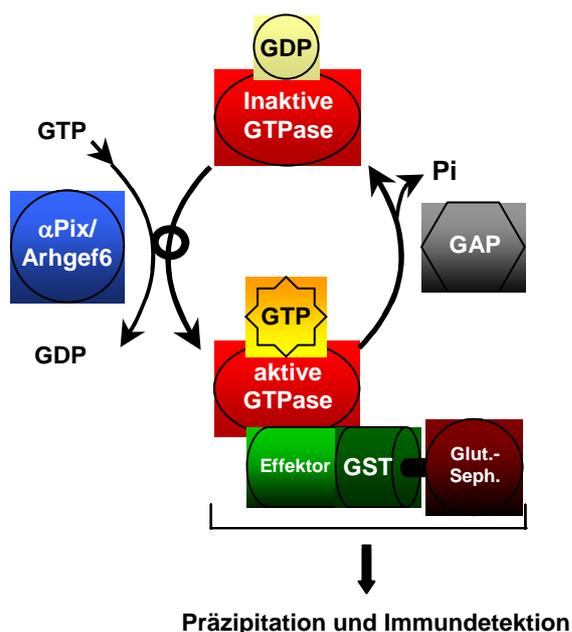
Neuronen wurden aus dem Hippocampus von 18 Tage alten Wildtyp-Embryonen isoliert und 12-14 Tage in Primärkultur gehalten. An diesen Neuronen wurde eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -„antisense“- bzw. der „sense“-Sonde durchgeführt. Die subzelluläre Verteilung der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -mRNA wurde mittels eines primären Cy3-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörpers und eines sekundären Cy3-gekoppelten anti-Maus-Antikörpers dargestellt (rot). Neuronen wurden mittels eines primären anti-MAP2- und eines sekundären Alexa-Fluor488-konjugierten anti-Kaninchen-Antikörpers visualisiert (grün). (A) Darstellung der subzellulären Verteilung der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -mRNA. Pfeilspitzen deuten auf das Hybridisierungssignal im proximalen Bereich der Dendriten. (C1) Als Negativ-Kontrolle diente die „sense“-Sonde. Als weitere Negativ-Kontrollen wurden Neuronen verwendet, auf die lediglich ein primärer Cy3-gekoppelter anti-Digoxigenin- (C2) bzw. ein sekundärer Cy3-gekoppelter anti-Maus-Antikörper (C3) gegeben wurde. (B) Gezeigt ist die Übereinanderlagerung der MAP2-Färbung mit dem  $\alpha Pix/Arhgef6$ -spezifischen „antisense“-Signal sowie (D) die der Hybridisierungssignale der drei Negativ-Kontrollen.

Nach zweiwöchiger Kultivierung hatte sich zwischen den Zellkörpern durch die polare Differenzierung der Neuronen ein komplexes Netzwerk neuronaler Fortsätze ausgebildet. Das Perikaryon des Neurons wies ein fein verteiltes Hybridisierungssignal auf, wobei die Färbung um den Kern herum etwas verstärkt war (Abb. 38A). Der Zellkern selbst war nicht oder nur relativ schwach gefärbt. Neben der leicht diffusen Verteilung wurden auch sehr feine, punktförmige Strukturen innerhalb des Somas beobachtet. Innerhalb des Zellkerns wiesen große punktförmige Strukturen ein äußerst starkes Hybridisierungssignal auf und stachen durch die erhöhte Farbtintensität hervor. Die positiv gefärbten Ausläufer der Zelle zeigten ein punktförmiges Muster im proximalen Bereich der Dendriten. Hier war das Signal aber generell deutlich schwächer als das im Perikaryon und nahm in Richtung des distalen Bereiches der Dendriten weiterhin ab (Abb. 38A). Ohne Signal blieben die Hybridisierungen mit den „sense“-Proben unter jeweils identischen Bedingungen (Abb. 38C1). In Zellen, die ohne cRNA-Sonde und nur mit dem anti-Digoxygenin (Abb. 38C2) bzw. mit dem sekundären anti-Maus-Antikörper (Abb. 38C3) inkubiert wurden, konnte gleichfalls kein Signal beobachtet werden.

Durch das Ausbleiben des „sense“-Signals und möglicher Hintergrundsignale ist davon auszugehen, dass die *αPix/Arhgef6*-„antisense“-Sonde sehr spezifisch hybridisierte. Folglich konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass *αPix/Arhgef6* in hippocampalen Neuronen der Wildtyp-Maus transkribiert wird.

## 8. Analyse der Aktivität von Rac1 und Cdc42 in der Wildtyp- und der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout Maus mittels Rac/Cdc42-Pull-Down-Experimenten

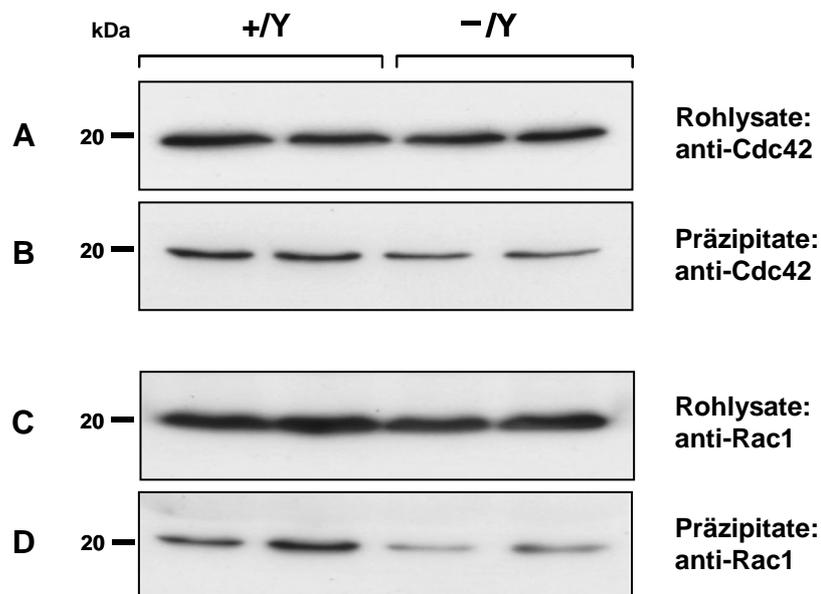
In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 als GEF sowohl Cdc42 als auch Rac1 aktivieren kann (Koh et al., 2001; Manser et al., 1998; Bagrodia et al., 1998; Feng et al., 2002; Li et al., 2003; Yoshii et al., 1999; Feng et al., 2004; Baird et al., 2005). Da diese Untersuchungen *in vitro* durchgeführt worden waren, kann bis heute keine Aussage über die *in vivo* GEF-Aktivität von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 gemacht werden. In dieser Arbeit sollte deswegen untersucht werden, ob in bestimmten Organen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizienter Mäuse eine veränderte Menge an aktivem, GTP-gebundenem Cdc42 und/oder Rac1 nachzuweisen ist. Um die Aktivierung von Cdc42 und Rac1 messen zu können, wurden Cdc42/Rac1-Pull-Down-Experimente mit Proteinlysaten des Gehirns beider Genotypen durchgeführt. Dieses Verfahren basiert auf dem Umstand, dass die im Homogenat vorhandenen aktiven, GTP-gebundenen GTPasen mit einem Effektorprotein interagieren. Somit lassen sich spezifisch GTPasen in aktiviertem Zustand durch die Zugabe eines aufgereinigten, mit Glutathion-S-Transferase (GST)-fusionierten Effektorproteins mit Glutathion-Sepharose präzipitieren und nachfolgend im Präzipitat mittels Western-Blot und Immundetektion nachweisen (Abb. 39). Die Cdc42/Rac1-Pull-Down-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Georg Rosenberger aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Kutsche durchgeführt.



**Abb. 39: Schematische Darstellung des Prinzips der GTPase-Pull-Down-Experimente**

$\alpha$ Pix/Arhgef6 (blauer Kreis) stimuliert den Austausch von GDP (Guanosin-5`-diphosphat) nach GTP (Guanosin-5`-triphosphat) und aktiviert GTPasen wie Cdc42 und Rac1 (roter ovaler Kreis). GTPase-aktivierende Proteine (GAP; graues Sechseck) überführen die GTPasen in die inaktive Form. Wird den Proteinlysaten ein mit GST-fusioniertes Effektorprotein (grüne Säule) zugegeben, binden daran nur GTP-gebundene GTPasen. Nach der Präzipitation mit Glutathion-Sepharose (brauner Kreis), SDS-Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot-Analyse kann die Menge aktiver GTPasen im Lysat ermittelt werden.

Für die Ermittlung der Mengen an aktivem Cdc42 und Rac1 im Gehirn wurden Proteinlysate vom Gesamthirn sowie von einzelnen Hirnregionen wie Hippocampus, Cerebellum und Cortex der adulten Wildtyp- und der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus hergestellt. Die Lysate wurden mit dem aus *E.coli* aufgereinigten Effektor-Fusionsprotein GST-PAK[PBD] („p21 activated kinase [p21-rho-binding domain]“) inkubiert und über den GST-Anteil mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Da PAK[PBD] nur mit GTP-gebundenem, aktivem, nicht aber mit GDP-gebundenem, inaktivem Cdc42 oder Rac1 interagiert, kommt es zur spezifischen Kopräzipitation von aktiviertem Cdc42 bzw. Rac1. Sowohl die Rohlysate als auch die Präzipitate wurden mittels Western-Blot und Immundetektion mit einem anti-Cdc42- bzw. anti-Rac1-Antikörper auf das Vorhandensein von Cdc42 und Rac1 untersucht. Die Menge an GTP-gebundener Cdc42- bzw. Rac1-GTPase im Gesamthirn der Wildtyp- und der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus wurden miteinander verglichen (Abb. 40).



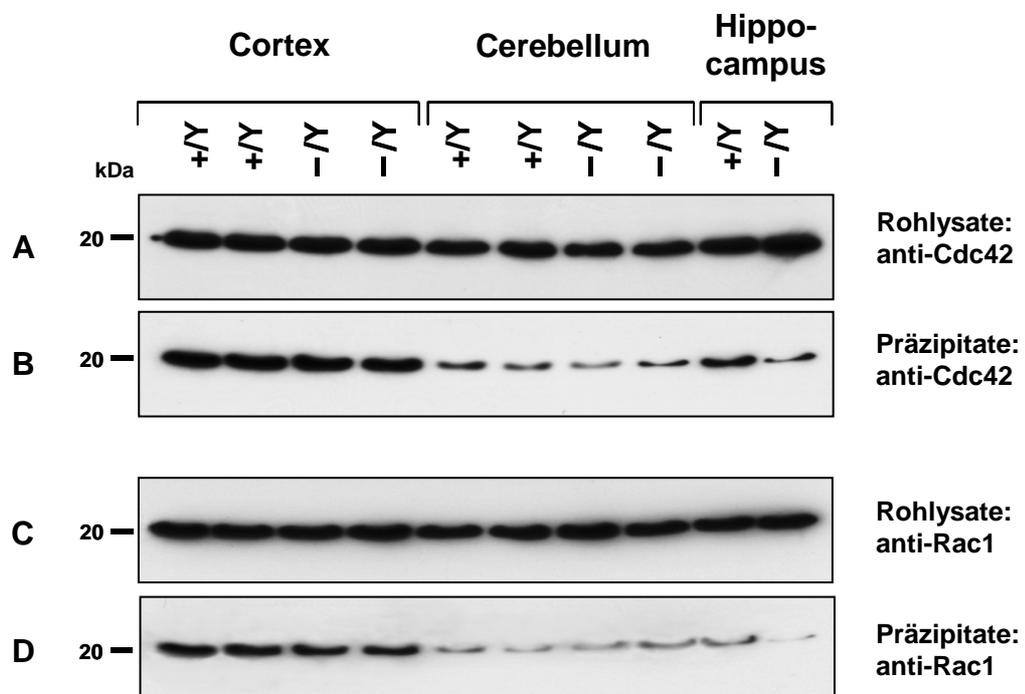
**Abb. 40: Darstellung der Menge an Gesamt-Cdc42 und -Rac1 bzw. an aktivem Cdc42 und Rac1 in Proteinlysaten von Gesamthirn der Wildtyp- und  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse mittels Western-Blot**

Es wurden Proteine aus dem Gesamthirn von jeweils zwei Wildtyp-Mäusen (+/Y) und zwei  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen (-/Y) isoliert. Die Detektion von Cdc42 erfolgte mit einem anti-Cdc42-, die von Rac1 mit einem anti-Rac1-Antikörper. Die Blots in (A) und (C) zeigen die Expression von aktivem und inaktivem Cdc42 bzw. Rac1 in den Rohlysaten. In Blot (B) ist die Menge an aktiviertem, GTP-gebundenem Cdc42 und in (D) die von aktiviertem, GTP-gebundenem Rac1 in den Präzipitaten nach einem Pull-Down-Experiment mit dem GST-PAK[PBD]-Fusionsprotein dargestellt. Links von den Blots ist jeweils ein Molekulargewicht des verwendeten Proteinstandards angegeben.

In den Rohlysaten wurde Cdc42 bzw. Rac1 in annähernd gleicher Menge nachgewiesen (Abb. 40A und C). Da der Antikörper sowohl GDP- als auch GTP-gebun-

denes Cdc42 und Rac1 erkennt, lassen sich in den Rohlysaten beide GTPase-Formen nachweisen. In den Präzipitaten, welche nur jeweils die aktiven GTPasen enthalten, wurde bei gleicher Gesamtproteinmenge im Hirnlysat der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus eine geringere Menge sowohl an aktiviertem, GTP-gebundenem Cdc42 (Abb. 40B) als auch an aktiviertem, GTP-gebundenem Rac1 (Abb. 40D) als in der Wildtyp-Maus detektiert.

Für detailliertere Untersuchungen bezüglich des Aktivitätszustandes dieser GTPasen wurden Cdc42/Rac1-Pull-Down-Experimente mit Proteinlysaten des Cortex, Cerebellums sowie des Hippocampus der Wildtyp- und der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus durchgeführt. Mittels Western-Blot wurden die Rohlysate und die Präzipitate auf das Vorhandensein von Cdc42 und Rac1 überprüft (Abb. 41).

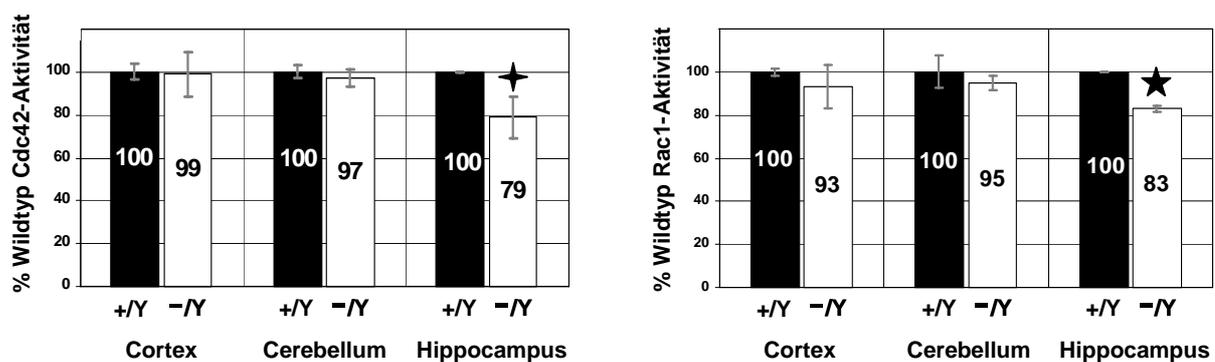


**Abb. 41: Darstellung der Menge an Gesamt-Cdc42 und -Rac1 bzw. an aktivem Cdc42 und Rac1 in Proteinlysaten von Cortex, Cerebellum sowie Hippocampus von Wildtyp- und *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäusen mittels Western-Blot**

Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot aus drei unabhängigen Versuchen. Gesamtprotein wurde aus Cortex, Cerebellum und Hippocampus von jeweils zwei Wildtyp-Mäusen (+/Y) und zwei *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäusen (-/Y) isoliert. Die Proteinlysate der zwei Hippocampi der beiden Wildtyp- bzw. Knockout-Tiere wurden gepoolt. Cdc42 wurde mit einem anti-Cdc42-Antikörper detektiert. Der Nachweis von Rac1 erfolgte mit einem anti-Rac1-Antikörper. Die Blots in (A) und (C) stellen jeweils die Expression von aktivem und inaktivem Cdc42 bzw. Rac1 in den Rohlysaten von Cortex, Cerebellum und Hippocampi der beiden Genotypen dar. Die jeweilige Menge an aktiviertem, GTP-gebundenem Cdc42 und Rac1 in den Präzipitaten nach Pull-Down-Experiment mit einem GST-PAK[PBD]-Fusionsprotein ist in den Blots in (B) bzw. (D) gezeigt. Links von den Blots ist ein molekulares Gewicht eines Proteinstandards angegeben.

GDP- und GTP-gebundenes Cdc42 und Rac1 wurde in allen Rohlysaten in etwa gleicher Menge nachgewiesen (Abb. 41A und C). Nach Präzipitation der aktiven, GTP-gebundenen Formen von Rac1 und Cdc42 wurde vor allem im Hippocampus eine Abnahme dieser bei  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt (Abb. 41B und D). In den Präzipitaten von Cortex und Cerebellum wurde kein signifikanter Unterschied in der Menge der aktivierten GTPasen zwischen der Wildtyp- und der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus beobachtet.

Zur quantitativen Bestimmung des Anteils an aktiviertem, GTP-gebundenem Cdc42- und Rac1-Protein in der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus wurden die Signale auf den Western-Blots densitometrisch mittels des Programms „ImageJ“ gemessen. Die Abbildung 42 zeigt die statistische Auswertung der aus den densitometrischen Messungen erhaltenen Werte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. 42: Darstellung der relativen Mengen an aktiviertem Cdc42 und Rac1 in der Wildtyp- und der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus nach densitometrischen Messungen**

Je drei unabhängige Cdc42- bzw. Rac1-Pull-Down-Experimente mit Proteinlysaten aus Hippocampus, Cerebellum und Cortex von jeweils zwei Wildtyp-Mäusen (+/Y) und zwei  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen (-/Y) wurden durchgeführt. Die Proteinlysate der zwei Hippocampi der beiden Wildtyp- bzw. Knockout-Tiere wurden gepoolt. Die Chemolumineszenz-Signale der in Abbildung 41 gezeigten Western-Blots sowie von Western-Blots aus zwei weiteren unabhängigen Experimenten wurden eingescannt und densitometrisch gemessen. Die Menge an aktivem Cdc42 und Rac1 wurde jeweils zur Gesamtmenge von Cdc42 und Rac1 normalisiert. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte der unabhängigen Experimente mit Standardabweichung, wobei die Mittelwerte aus der Wildtyp-Menge als 100% angenommen wurden. Im Hippocampus der Knockout-Tiere wurde eine Absenkung auf 79% (✦  $p < 0,05$ ) an aktivem Cdc42 sowie auf 83% (★  $p < 0,001$ ) an aktivem Rac1 ermittelt. Die Mengen an aktivem Cdc42 und Rac1 im Cortex und Cerebellum der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus unterschieden sich nicht signifikant von der Wildtyp-Maus (alle p-Werte  $> 0,05$ ).

Zunächst wurde die Menge des aktiven Cdc42- bzw. Rac1-Proteins in den Präzipitaten zur in den Rohlysaten befindlichen Gesamtmenge von Cdc42 und Rac1 im jeweiligen Genotyp normalisiert und dann die Mittelwerte aus der Wildtyp-Menge als 100% angenommen. Im Hippocampus der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus wurde im

Vergleich zur Wildtyp-Maus nur 79% ( $p < 0,05$ ) an aktiviertem Cdc42-Protein nachgewiesen, während sich die Menge an aktiviertem Cdc42 im Cortex und Cerebellum nicht signifikant von der in der Wildtyp-Maus unterschied (Abb. 42). Mittels densitometrischer Messung wurde im Hippocampus der  *$\alpha$ Pix/Arhgef6*-Knockout-Maus 83% ( $p < 0,001$ ) an aktiviertem, GTP-gebundenem Rac1 im Vergleich zur Wildtyp-Maus bestimmt (Abb. 42). Allerdings unterschied sich die Menge an aktivem Rac1 im Cortex und Cerebellum des Knockout-Tieres nicht signifikant von der des Wildtyp-Tieres. Zusammenfassend ließ sich in Übereinstimmung zu den in Abbildung 41 gezeigten Western-Blot-Analysen densitometrisch eine signifikante Abnahme an aktiviertem Cdc42 und Rac1 im Hippocampus der  *$\alpha$ Pix/Arhgef6*-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus nachweisen.

## V. Diskussion

### 1. Die $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus zeigt keinen offensichtlich auffälligen Phänotyp

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus hergestellt, die ein Modell für eine Form der X-chromosomalen geistigen Behinderung beim Menschen darstellt. In dieser Arbeit konnte der Verlust des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins im Knockout-Tier und somit die erfolgreiche Erzeugung der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizienten Maus bestätigt werden. Der Verlust von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der Maus führt nicht zu embryonaler Letalität. Die Tiere zeigen desweiteren keine größeren morphologischen Auffälligkeiten, und auch ihr Verhalten während der Käfighaltung erscheint normal. Ferner wurden auf lichtmikroskopischer Ebene keine größeren morphologischen Veränderungen bezüglich der Anzahl und Verteilung von Neuronen und Gliazellen im Gehirn erkannt.

Es ist bekannt, dass die Anzahl der Rho GEF-Proteine in höheren Eukaryonten die Anzahl ihrer Substrate, den GTPasen, um das dreifache übersteigt (Schmidt und Hall 2002). Somit sind mehrere GEFs in der Lage, dieselbe GTPase zu aktivieren und damit die Funktion eines anderen GEFs zu übernehmen. So ist z.B. der Rho GEF Vav2 eng verwandt mit Vav1. Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle in der B-Zell-Entwicklung während der humoralen Antwort und zeigen eine teilweise überlappende Funktion (Schuebel et al. 1996). Durch Studien an Vav-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass Vav2 in der Lage ist, die Funktion von Vav1 zu übernehmen (Doody et al. 2001; Tedford et al. 2001). Es ist somit denkbar, dass die Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 von anderen GEFs, wie beispielsweise dem ebenfalls ubiquitär exprimierten  $\beta$ Pix/Arhgef7 (Manser et al. 1998), zumindest teilweise übernommen werden kann, und dies der Grund dafür ist, dass bei der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus kein augenscheinlich schwerer Phänotyp zu beobachten ist.

### 2. Die mit Hilfe der Mikroarray-Technik identifizierte differentielle Expression des *Cd99l2*-Gens konnte durch unabhängige Methoden nicht bestätigt werden

Um die Auswirkung der partiellen Gendeletion in der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus auf Ebene der Genexpression zu untersuchen, sollten mit Hilfe der Mikroarray-Technik differentiell exprimierte Gene im Hippocampus der Knockout-Maus identifi-

ziert werden. Der Vergleich der erhaltenen Mikroarray-Daten zwischen Wildtyp- und  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus ergab ein differentiell exprimiertes Gen, nämlich *Cd99l2*, dessen Genprodukt mit der neuronalen Entwicklung sowie mit einer Rolle bei der Immunantwort in Zusammenhang gebracht wird (Suh et al. 2003). Zusammengefasst ergab der Vergleich der drei Knockout-Tiere mit den drei Wildtyp-Tieren eine etwa um den Faktor zwei geringere Expression des *Cd99l2*-Gens im Knockout-Tier, wobei aber zwischen den einzelnen Knockout- bzw. Wildtyp-Tieren leichte Schwankungen zu beobachten waren. Obwohl ein Expressionsunterschied um den Faktor zwei zwar allgemein als signifikant gilt, ist ein solcher Expressionsunterschied dennoch vergleichsweise gering (D. Koczan und T. Schimmang, persönliche Mitteilung). Daher stellte sich die Frage, ob sich dieser Expressionsunterschied durch unabhängige Methoden reproduzieren ließ. Generell ist es aufgrund möglicher falsch positiver Ergebnisse in der Mikroarray-Technologie stets erforderlich, die erzielten Ergebnisse mit konventionellen Methoden zu überprüfen. Die Real-Time-PCR ist heute eine der gängigsten Referenzmethoden zur Bestätigung von Mikroarray-Daten, da durch sie schnell und gleichzeitig präzise winzigste cDNA-Mengen vervielfältigt und quantifiziert werden können. Eine zweite, allgemein angewandte Referenzmethode ist die Technik der RNA-*in-situ*-Hybridisierung, die den Nachweis spezifischer RNA am Gewebeschnitt erlaubt. Sie hat im Unterschied zur Real-Time-PCR-Technik den Vorteil, dass eine positive Reaktion in Bezug zur Morphologie gesetzt werden kann. Die RNA-*in-situ*-Hybridisierung ist jedoch ein weitaus weniger sensitives Verfahren als die Real-Time-PCR. Für den Nachweis mit Hilfe der RNA-*in-situ*-Hybridisierung ist eine wesentlich größere Menge an mRNA erforderlich. Aufgrund der verschiedenen Vorteile dieser beiden Methoden wurden sie in dieser Arbeit als Kontrollexperimente verwendet. Eine verminderte Expression des *Cd99l2*-Gens im Hippocampus der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus konnte jedoch weder durch die Real-Time-PCR noch durch die RNA-*in-situ*-Hybridisierung bestätigt werden. Aufgrund der Verlässlichkeit und enormen Sensitivität der Real-Time-PCR-Methode hätte durch diese der etwa zweifache Expressionsunterschied bestätigt werden müssen. Daher kann die verminderte Expression von *Cd99l2* im Hippocampus des Knockout-Tieres mit großer Wahrscheinlichkeit als ein falsch positives Ergebnis der Mikroarray-Technologie gewertet werden. Alternativ hätten immunhistochemische Untersuchungen zur Verifizierung von Mikroarray-Daten verwendet werden können. So konnten Yokota und Mitarbeiter (2006) einen durch die Mikroarray-Analyse ermittelten dreifachen Genexpressionsunterschied zwischen zwei verschiedenen Gewebeproben immunhistochemisch auf Proteinebene bestätigen.

Die Mikroarray-Analyse ergab über das *Cd99l2*-Gen hinaus keine weiteren Genexpressionsunterschiede im Hippocampus der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus eine kaum veränderte Genaktivität, zumindestens im Hippocampus, aufweist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Genen existieren, die entsprechenden Gene allerdings nur sehr schwach exprimiert werden und dementsprechend im unteren Bereich oder sogar unterhalb der Nachweisgrenze für die Mikroarray-Methode liegen. Eine weitere Ursache könnte in der Verschiedenartigkeit der für die Mikroarray-Analysen verwendeten Hippocampuszellen liegen. Generell ist es schwierig, aufgrund der besonders ausgeprägten Heterogenität des Gehirns genügend große, homogene Gewebereiche zu finden, aus denen eine hinreichende Menge an RNA isoliert werden kann (Shoemaker und Linsley 2002; Mirnics und Pevsner, 2004; Arlotta et al., 2005; Dougherty und Geschwind, 2005; Coppola und Geschwind, 2006). Der Hippocampus setzt sich aus vielen verschiedenen Zellpopulationen zusammen. Dies bedeutet, dass lediglich „gemischte“ RNA isoliert wird, und dadurch der spezifische Nachweis von möglichen differentiell exprimierten Genen innerhalb eines speziellen hippocampalen Zelltyps mit Hilfe der Mikroarray-Technik kaum möglich ist.

Aufgrund der Tatsache, dass die Mikroarray-Analyse einige Schwankungen zwischen den gemessenen und berechneten Werten von *Cd99l2* im Hippocampus der *αPix/Arhgef6*-Knockout- und Wildtyp-Maus ergab, können theoretisch auch Fehler bei der Durchführung der Technik aufgetreten sein. Es ist bekannt, dass die Mikroarray-Technik potentielle Fehlerquellen aufweist, die unter anderem bei der Probenvorbereitung, der Herstellung der Arrays, der Hybridisierung und bei Waschschrritten oder beim Scannen des Arrays auftreten können (Nguyen et al. 2002; Stekel 2003). Möglicherweise spielen mehrere Faktoren für die mangelhafte Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Hippocampus der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus eine Rolle. Es kann aber vermutet werden, dass die Heterogenität der hippocampalen Zellen entscheidend zu diesem Befund beigetragen hat. Es wurden bereits einige technische Vorgehensweisen beschrieben, durch die eine erhöhte Proben spezifität erreicht werden kann (Coppola und Geschwind 2006). Beispielsweise führte die Durchführung einer Mikrodissektion von Subregionen der Amygdala, Teil des limbischen Systems, im Mikroarray-Experiment zur Identifizierung von Amygdala-spezifischen Genen (Zirlinger und Anderson 2003). Dementsprechend könnten bestimmte hippocampale Zellen durch eine zelltypspezifische Kultivierung angereichert

und zur Präparation einer überwiegend homogenen RNA eingesetzt werden, um damit eine erneute Mikroarray-Analyse durchzuführen.

### **3. $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist in verschiedenen Geweben der Maus nachweisbar**

Das humane  $\alpha$ PIX/ARHGEF6-Gen wurde bereits von Manser und Mitarbeitern als ubiquitär exprimiert beschrieben (Manser et al. 1998). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte von Kutsche und Gal (2001) für das murine  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Gen ebenfalls eine ubiquitäre Expression nachgewiesen werden, wobei das entsprechende Transkript in der Milz stark und vergleichsweise schwach im Hirn der adulten Maus und in Mausembryonen sehr früher Entwicklungsstadien detektiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein in Milz und Thymus sowohl adulter als auch embryonaler Wildtyp-Mäuse eine starke Expression nachgewiesen werden. In der adulten Wildtyp-Maus ist das Protein zusätzlich vergleichsweise schwach in Muskel, Herz, Leber und Niere exprimiert. Die Arbeit von Kohn und Mitarbeitern (2004) zeigte außerdem eine Expression des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Gens im Hoden, die Arbeit von Kutsche und Gal (2001) eine in Hoden und Lunge. In dieser Arbeit gelang der Nachweis des „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in diesen Geweben jedoch nicht. Möglicherweise war eine Detektion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Hoden und Lunge mittels Western-Blot aufgrund einer zu schwachen Expression des Gens in diesen Geweben und einer zu hohen Unspezifität des anti-CH-L-Antikörpers nicht möglich.  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist somit ein ubiquitär exprimierter Rac1- und Cdc42-spezifischer Austauschfaktor, der während der Embryonalentwicklung und in der adulten Maus in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert wird.

Im Gegensatz zur  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus führt der Verlust der multifunktionalen GEFs Trio und SOS1 in Mäusen zu embryonaler Letalität (Wang et al. 1997; Qian et al. 2000; O'Brien et al. 2000). Es wird angenommen, dass dieser Phänotyp nicht nur durch den Verlust der GEF-Aktivität dieser beiden Austauschfaktoren hervorgerufen wird, sondern durch den Verlust weiterer Funktionen dieser Proteine, die darüber hinaus gehen (Rossman et al. 2005). Das Ausbleiben eines schweren embryonalen Phänotyps bei einer  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Defizienz in Mäusen könnte darauf hinweisen, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 neben der GEF-Aktivität keine zusätzlichen Module mit essentiellen Funktionen besitzt.

In anderen GEF-defizienten Mäusen, in denen die jeweiligen GEF-Proteine eine gewebespezifische Expression zeigen, konnten zwar im Allgemeinen eine normale

Entwicklung beobachtet werden, dennoch wurden bei ihnen in detaillierten Analysen Auffälligkeiten beobachtet, die sich auf bestimmte Gewebe beschränken (Schmidt und Hall 2002; Rossman et al. 2005). Solche gewebespezifischen Defekte wurden beispielsweise in Mäusen beobachtet, die defizient für Vav1, Dbl, Bcr, Abr, Lsc oder Tiam1 sind (Rossman et al. 2005). Der Rho GEF Vav1 ist beispielsweise ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Vav1-Knockout-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine Auffälligkeiten in der allgemeinen Organentwicklung. Allerdings ist die Entwicklung und Funktion der T-Zellen stark beeinträchtigt (Turner et al. 1997). Ein ähnlicher gewebespezifischer Defekt könnte auch in  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäusen vorliegen, da durch Western-Blot-Analysen eine besonders abundante Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Milz und Thymus gezeigt werden konnte.

### 3.1 $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist in T- und B-Lymphozyten nachweisbar

In Übereinstimmung zur beobachteten Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Milz und Thymus wurde immunhistochemisch eine Lokalisation des Proteins in T- und B-Lymphozyten dargestellt. Dieser Befund lässt eine Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Signalwegen hämatopoetischer Zellen vermuten. Bisher ist über die Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Lymphozyten nur wenig bekannt.

T- und B-Zellen spielen bei der erworbenen Immunantwort eine tragende Rolle. Dabei vermitteln die B-Zellen durch die Sezernierung von Antikörpern die humorale Immunantwort. Die zellvermittelte Immunantwort basiert auf den T-Zellen, die mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) die von „Major Histocompatibility“-Komplexen (MHC) präsentierten Peptidantigene einer antigenpräsentierenden Zelle erkennen, d.h. binden und darauf reagieren. Die spezifische Erkennung eines Antigens durch den TCR löst eine Kaskade diverser intrazellulärer Signalereignisse aus, die beispielsweise zur Aktivierung von Rho GTPasen und zu Umstrukturierungen des Aktinzytoskelets und damit zu T-Zell-Proliferation, Differenzierung oder Aktivierung von Effektorzellen führen (van Leeuwen und Samelson 1999). Für die Signaltransduktion des aktivierten T-Zell-Rezeptors ist eine Assoziation mit dem Corezeptor CD4 bzw. CD8 erforderlich, die beide an der TCR/Antigen-Wechselwirkung durch Bindung an die MHC-Moleküle beteiligt sind und zur Antigen-Erkennung und Aktivierung der T-Zellen beitragen. Die T-Zellen werden in zwei Hauptklassen unterteilt, die cytotoxischen T-Zellen ( $T_C$ ) oder CD8-Zellen, die ihre infizierten Zielzellen direkt töten, und die T-Helferzellen ( $T_H$ ) oder CD4-Zellen, deren Funktion in der Verstärkung der Aktivität anderer Leukozyten liegt. Die T-Helferzellen wiederum differenzieren zu  $T_{H1}$ - und

T<sub>H2</sub>-Zellen, welche anhand ihrer sezernierten Interleukine unterschieden werden. Während T<sub>H1</sub>-Zellen cytotoxische T-Zellen und Makrophagen unterstützen, stimulieren T<sub>H2</sub>-Zellen die B-Zellen zur Proliferation und Produktion von Antikörpern.

In einigen Studien konnte bereits die Bedeutung der PIX-Proteine ( $\alpha$ PIX/ARHGEF6 und  $\beta$ PIX/ARHGEF7) für das Immunsystem demonstriert werden. Es ist bereits bekannt, dass PAK1 durch die Antigen-Stimulation des TCR in einem Rac1-abhängigen Signalweg aktiviert wird. In diesem Zusammenhang konnte GIT1 und PIX eine wichtige Rolle bei der TCR-vermittelten Aktivierung von PAK1 zugeordnet werden. GIT1 rekrutiert PAK1 und PIX zum TCR-Komplex. Dort führt die Interaktion von PIX mit PAK1 zusammen mit Rac1 und Cdc42 zu einer Aktivierung von PAK1 (Ku et al. 2001).

In neueren Studien wurde die Bedeutung des GIT1-PIX-PAK1-Komplexes für die Rekrutierung von PAK1 zu der so genannten „immunologischen Synapse“ und für die Aktivierung von PAK1 gezeigt (Phee et al. 2005). Die Bildung der immunologischen Synapse, eine Formation einer stabilen Interaktion zwischen dem TCR und dem MHC/Peptid-Komplex (Monks et al. 1997, 1998; Dustin und Shaw 1999), ist von der Reorganisation des Aktinzytoskeletts abhängig und wird durch Integrine unterstützt (Grakoui et al. 1999).

SDF-1 $\alpha$  ist ein Chemokin und zur Aktivierung mehrerer Signalwege befähigt. Für die Migration und somit Lokalisation von Leukozyten ist SDF-1 $\alpha$  von entscheidender Bedeutung (Moser und Loetscher 2001). PIX reguliert zusammen mit PAK in einem SDF-1 $\alpha$ -abhängigen Signalweg die Migration von T-Zellen zu ihren Zielorten (Vollinsky et al. 2006). In ähnlicher Weise spielt Vav1 bei der SDF-1 $\alpha$ -induzierten Signalweiterleitung ebenfalls eine entscheidende Rolle (Vicente-Manzanares et al. 2005).

Die Gruppe von Prof. Dr. K. D. Fischer aus Ulm konnte bei  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizienten Mäusen einen gewebespezifischen Phänotyp beobachten. Die Anzahl von CD4- und CD8-Zellen in Milz und Lymphknoten der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus ist im Vergleich zur Wildtyp-Maus reduziert und die Aktivierung von T- und B-Zellen ist beeinträchtigt (Missy et al. eingereicht). Die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus weist eine signifikant reduzierte Menge an IgM- und eine leichte Reduktion an IgG1- und IgG3-Antikörpern auf, was auf eine reduzierte Immunantwort hindeutet. In diesen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass in der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus die TCR-abhängige PAK-Aktivierung reduziert und die Bildung einer immunologischen Synapse wahrscheinlich beeinträchtigt ist. Die reduzierte Menge an T<sub>H1</sub>-produzierenden Chemokinen und eine eingeschränkte T<sub>H1</sub>-Immunantwort führten zu der Annahme,

dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 an der Differenzierung von naiven T-Zellen nach T<sub>H1</sub>-Zellen maßgeblich beteiligt ist (Missy et al. eingereicht).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression in T- bzw. B-Lymphozyten der Maus korreliert daher sehr gut mit den kürzlich beschriebenen funktionellen Daten von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hinblick auf die Lymphozyten-Funktion.

Ähnliche Funktionen wurden bereits für andere GEFs gezeigt. Das murine Lsc beispielsweise, ein Homolog zum humanen p115RhoGEF, ist in Knochenmark und Thymus sowie in den Lymphknoten und in der Milz stark exprimiert (Aasheim et al. 1997; Glaven et al. 1996). Lsc ist in T- und B-Zellen besonders während der Lymphozyten-Entwicklung abundant nachweisbar (Girkontaite et al. 2001). Lsc-defiziente Mäuse zeigen einen Phänotyp, der dem der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Mäuse sehr ähnlich ist, nämlich eine signifikante Reduktion in der Anzahl von T-Zellen in der Milz und eine stark herabgesetzte Produktion von IgM-, IgG1- und IgG3-Antikörpern. Diese Daten reflektieren eine wichtige Rolle für Lsc in der T-Zell-vermittelten humoralen Immunantwort (Girkontaite et al. 2001).

Für den Rac1/Cdc42-spezifischen GEF Vav1 wurde ebenso gezeigt, dass dieser ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und an der Differenzierung von Lymphozyten sowie an deren Funktion beteiligt ist (Crespo et al. 1997; Reif und Cantrell 1998; Cantrell 1998). Vav1-defiziente Mäuse sind lebensfähig, zeigen jedoch eine schwere Beeinträchtigung bei der Entwicklung von T-Zellen sowie im Vav1 bzw. Rac1-vermittelten Signalweg stromabwärts des T-Zell-Rezeptors (Fischer et al. 1995, 1998; Zhang et al. 1995). Die positive und negative Selektion von Thymozyten in diesen Mäusen ist beeinträchtigt und führt zu einer drastischen Reduktion reifer T-Zellen (Turner et al. 1997; Fischer et al. 1998).

Zusammenfassend sind neben  $\alpha$ Pix/Arhgef6 auch andere GEF-Proteine an der Differenzierung sowie Funktion von Lymphozyten, insbesondere von T-Zellen, und somit an der Ausbildung einer korrekten Immunantwort maßgeblich beteiligt. Für eine funktionierende Immunreaktion ist beispielsweise die Migration von T-Zellen oder die Ausbildung eines Kontaktes zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle von entscheidender Bedeutung. Diese Vorgänge beruhen auf der Flexibilität des Aktinzytoskeletts und erfordern die GEF-regulierte Aktivität der Rho GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA.

### 3.2 Von $\alpha$ Pix/Arhgef6 existieren verschiedene gewebespezifische Isoformen

Obwohl schon einige Isoformen des zum murinen  $\alpha$ Pix/Arhgef6 homologen  $\beta$ Pix/Arhgef7-Proteins beschrieben wurden, waren bisher noch keine Isoformen von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 bekannt. Während der Expressionsanalysen mittels Western-Blot konnten neben dem „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein weitere Proteine unterschiedlicher Größe in verschiedenen Geweben der adulten Wildtyp-Maus sowie ein Protein in Wildtyp-Embryonen nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass keins dieser Proteine in den entsprechenden  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizienten Geweben nachzuweisen war, kann angenommen werden, dass es sich hierbei um  $\alpha$ Pix/Arhgef6-spezifische Isoformen handelt. Ein gewebespezifischer Proteinabbau des „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins ist allerdings auch nicht ganz auszuschließen. Die 83 kDa Isoform in der Milz der adulten Maus konnte auf cDNA-Ebene bestätigt werden, während der Nachweis für die anderen fünf Isoformen auf cDNA-Ebene bisher nicht gelang. Da der Nachweis der 83 kDa  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform in der Milz nur unter spezifischen Bedingungen erbracht werden konnte, ist die Existenz dieser Isoform in anderen Geweben möglich, konnte aber vermutlich aufgrund der hohen Unspezifität des Antikörpers nicht nachgewiesen werden. Da der 83 kDa großen Isoform unter anderem ein Anteil der GBD-Domäne fehlt, könnte somit die Funktion dieser Isoform, insbesondere der GBD-Domäne, im Vergleich zum „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 verändert sein.

Neben  $\alpha$ Pix/Arhgef6 sind andere GEFs bekannt, von denen verschiedene, in unterschiedlichen Geweben exprimierte Isoformen existieren. Bis heute sind von  $\beta$ Pix/Arhgef7 fünf verschiedene Isoformen bekannt (Kim et al. 2000; Kim und Park 2001; Koh et al. 2001; Rhee et al. 2004). Während  $\beta$ Pix-a ubiquitär und  $\beta$ Pix-b,  $\beta$ Pix-c und  $\beta$ Pix-d verstärkt in Hirn und Hoden exprimiert sind, ist  $\beta$ Pix-b<sub>L</sub> nur im Hirn früher Entwicklungsstadien nachweisbar. Die Transkripte von  $\beta$ Pix-b,  $\beta$ Pix-c und  $\beta$ Pix-d konnten spezifisch in neuronalen Zellpopulationen verschiedener Hirnregionen nachgewiesen werden (Kim et al. 2000; Kim und Park 2001).

Die beiden GEF-Proteine Trio und Kalirin üben ihre Funktionen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Nervensystems aus. Kürzlich wurden neue Isoformen von Trio identifiziert, die jeweils unterschiedliche funktionelle Domänen besitzen. Im Gegensatz zur ubiquitär exprimierten Haupt-Trio-Isoform konnten die neuen spezifisch im Hirn nachgewiesen werden (McPherson et al. 2005; Portales-Casamar et al. 2006). Die Isoformen von Kalirin sind ebenfalls hauptsächlich im Hirn exprimiert (McPherson et al. 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesenen  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen deuten auf die Existenz mehrerer Spleißvarianten hin, die in unterschiedlichen Geweben der adulten Maus und während der Embryonalentwicklung spezifisch exprimiert werden. Ob die bisher nicht auf cDNA-Ebene bestätigten Isoformen unterschiedliche funktionelle Domänen enthalten und wie sie sich funktionell vom  $\alpha$ Pix/Arhgef6 „full-length“ Protein unterscheiden, bleibt zu untersuchen.

#### **4. $\alpha$ Pix/Arhgef6 wird in verschiedenen Zelltypen des Gehirns exprimiert**

##### **4.1 $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist in Neuronen nachweisbar**

Übereinstimmend mit der Annahme, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 eine Funktion in Hinblick auf die neuronale Entwicklung ausübt, konnte in dieser Arbeit zunächst durch Western-Blot-Analysen der Nachweis einer Expression des „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins im Hirn der adulten Maus erbracht werden. Obwohl, wie bereits erwähnt, die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA im Gesamthirn und in spezifischen Hirnregionen von Maus-embryonen nachgewiesen wurde (Kutsche und Gal 2001; Kohn et al. 2004), konnte das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein im Hirn von Mausembryonen nicht detektiert werden. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Konzentration des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins im Gesamthirn des Embryos für eine Detektion mit Hilfe der Western-Blot-Methode zu gering ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen erbrachten einen Nachweis von „full-length“  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hippocampus und im Cortex sowie einer kleineren 65 kDa  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoform im Hippocampus der adulten Maus. Die Expression dieser beiden  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Isoformen im Hirn könnte auf eine Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 während der neuronalen Morphogenese hinweisen. Die Expression der 65 kDa Isoform konnte allerdings auch in verschiedenen nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen werden, weshalb eine ausschließlich hirsnspezifische Funktion dieses kleineren  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins eher unwahrscheinlich ist. Um die postulierte Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 immunzytochemisch in Neuronen nachweisen zu können, wurde in dieser Arbeit zunächst die Spezifität des anti-CH-L-Antikörpers an  $\alpha$ Pix/Arhgef6 überexprimierenden CHO-Zellen getestet. Ektopisch exprimiertes  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist in diesen Zellen diffus im Zytoplasma verteilt und damit verstärkt an der Zellmembran in Lamellipodien. Eine damit übereinstimmende Lokalisation wurde bereits für überexprimiertes humanes  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 gezeigt (Rosenberger et al. 2003).

Der anti-CH-L-Antikörper erkennt endogenes  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Western-Blot sowie überexprimiertes  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Zellen. Im Gegensatz dazu war dieser Antikörper jedoch nicht in der Lage, endogenes  $\alpha$ Pix/Arhgef6 immunzytochemisch in murinen Neuronen zu detektieren. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die endogene  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Konzentration in diesen Zellen unter der Nachweisgrenze liegt. Um eine neuronale Expression von endogenem  $\alpha$ Pix/Arhgef6 nachzuweisen, wurde daher zunächst eine selektive Anreicherung hippocampaler Zellen der adulten Maus mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, jedoch nur bis zu einem gewissen Grad erreicht. Demzufolge kann angenommen werden, dass der für adulte Hippocampusneuronen der Ratte etablierte Dichtegradient (Brewer 1997) für Mauszellen nicht geeignet ist. Infolgedessen wurden daher primäre embryonale hippocampale Neuronen durch eine zelltypspezifische Kultivierung angereichert, und das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein konnte im Proteinlysat dieser Neuronen-angereicherten Fraktion nachgewiesen werden. Mit diesem Experiment wurde erstmalig eine neuronale Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 demonstriert.

In Übereinstimmung damit wurde im Rahmen dieser Arbeit die neuronale  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression auf mRNA-Ebene mit Hilfe von nicht-radioaktiven RNA-*in-situ*-Hybridisierungsexperimenten an kultivierten embryonalen Hippocampusneuronen bestätigt. Das spezifische Hybridisierungssignal wurde im Perikaryon des Neurons und im proximalen Bereich der Dendriten beobachtet. Das dendritische Vorkommen der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA könnte auf einen spezifischen Transportmechanismus oder eine lokale Translation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in den Dendriten oder möglicherweise auch an den Synapsen hindeuten. Eine dendritische Lokalisation und Translation von mRNAs stellt eine Möglichkeit dar, wie Neuronen die räumlich und zeitlich begrenzte Proteinexpression gewährleisten. Aktivitätsabhängige langfristige Veränderungen der Effizienz von Synapsen sowie Lernvorgänge sind häufig von einer lokalen Proteinsynthese in den Dendriten abhängig (Kang und Schuman 1996; Miller et al. 2002). Dieser Prozess wird unter anderem durch das RNA-bindende FMR-Protein („fragile X mental retardation protein“) reguliert, welches in einer aktivitätsabhängigen Weise Translationsvorgänge in der Nähe von Synapsen steuert (Weiler und Greenough 1999; Jin und Warren 2003; Zalfa et al. 2003). Beim Menschen führt der Verlust von FMRP zum Fragilen X-Syndrom, einer syndromalen Form der X-chromosomalen mentalen Retardierung, die mit einer signifikanten Veränderung in der Morphologie dendritischer Dornen sowohl des Menschen als auch der Maus einhergeht (Comery et al. 1997; Irwin et al. 2001).

Das dendritische Vorkommen des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Hybridisierungssignals könnte allerdings ebenso aus einer Diffusion der Hybridisierungssonde in den proximalen Bereich der Dendriten resultieren. Dies konnte schon in verschiedenen anderen Experimenten beobachtet werden (PD Dr. Stefan Kindler, Institut für Humangenetik, persönliche Mitteilung).

Allein aus diesen Daten kann nicht sicher bestimmt werden, ob neben einer zytosolischen Proteinsynthese von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 auch ein Transport in die Dendriten sowie eine dendritische Translation der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA stattfindet, oder ob  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ein ausschließlich im Soma synthetisiertes Protein ist, welches unter Umständen nachfolgend in die Dendriten transportiert wird. Für eine Klärung dieser Frage bedarf es weiterer Experimente im Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-mRNA in Neuronen.

Der Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Neuronen lässt eine Funktion des Proteins bei der neuronalen Morphogenese vermuten. Über die neurobiologische Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist aber bis heute nur wenig bekannt. Von dem *Drosophila*-Homolog dPix weiß man bereits, dass es an der Regulation von postsynaptischen Strukturen beteiligt ist und dPix sowie dPak eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielen (Parnas et al. 2001).

Für  $\beta$ PIX/ARHEGF7 und PAK wurde eine neuronale Lokalisation gezeigt (Allen et al. 1998; Zhang et al. 2003; Meng et al. 2005). Durch frühere Studien konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von PAK1 zur Zellmembran zum Auswachsen von Neuriten in PC12-Zellen führt. Durch die Interaktion von PAK mit  $\beta$ PIX/ARHEGF7 übernimmt PAK einerseits eine Funktion als Effektor und andererseits als Aktivator von Rac1. Dies führt zur Stimulation des Neuritenwachstums von PC12-Zellen (Daniels et al. 1998; Obermeier et al. 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass  $\beta$ PIX/ARHEGF7 ein wichtiger Regulator für die subzelluläre Verteilung von GIT1 ist und  $\beta$ PIX/ARHEGF7 dadurch die Zellmotilität sowie das Neuritenwachstum kontrolliert (Za et al. 2006).

Es ist bekannt, dass andere GEFs auch in die neuronale Morphogenese involviert sind. Tiam1 ist beispielsweise ein Rac1-spezifischer GEF und im sich entwickelnden Hirn hoch exprimiert (Habets et al. 1994). Ektopisch exprimiertes Tiam1 induziert in Neuroblastomzellen die Rac-abhängige Zellausbreitung sowie die Bildung von Neuriten (Leeuwen et al. 1997) und ist an der Differenzierung von Neuriten in Axone und Dendriten in der frühen Phase der Morphogenese beteiligt (Kunda et al, 2001).

Dem Rho GEF Trio, insbesondere seinen neuronenspezifischen Isoformen, konnte eine Rolle bei der Neuriten-Induktion und während der Axonbildung und -wegfindung zugeteilt werden (Bateman et al. 2000; Portales-Casamar et al. 2006).

Der multifunktionale und duale Rho GEF Kalirin sowie dessen Isoformen Kalirin-9 und Kalirin-12 sind im Gegensatz zu Trio ausschließlich im Nervensystem exprimiert und wichtig für die korrekte Ausbildung von Dendriten und Axonen (Penzes et al. 2001; May et al. 2002).

Die Überexpression des RhoA-spezifischen GEFs p190RhoGEF in neuronalen Zellen führt zur Zellabrundung und hemmt das Wachstum von Neuriten (van Horck et al. 2001).

In diesem Zusammenhang ist es lohnenswert, auch Expressionsdaten von solchen Genprodukten zu diskutieren, in deren Genen Mutationen zu XLMR führen.

Der Cdc42-spezifische GEF Collybistin wird beispielsweise ausschließlich von postmitotischen Neuronen exprimiert und spielt bei der Differenzierung von Neuronen, insbesondere bei der Bildung von inhibitorischen Synapsen, eine entscheidende Rolle (Kneussel et al. 2001).

Pak3 ist im embryonalen und adulten Hirn exprimiert und lokalisiert sowohl im Soma als auch in den Dendriten und im Axon neokortikaler und hippocampaler Neurone (Allen et al. 1998; Meng et al. 2005).

Das Rho GAP-Protein Ophn1 ist ubiquitär exprimiert und am stärksten sowohl im embryonalen als auch im adulten Hirn nachzuweisen. Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Ophn1 in Neuronen ergab einen Nachweis des Proteins im Zellso-ma und in den Dendriten sowie an den Spitzen von sich bildenden Axonen (Fauchereau et al. 2003; Govek et al. 2004).

Wie im Kapitel 4.3 beschrieben wird, ist Ophn1 für morphogenetische Prozesse dendritischer Dornen von großer Bedeutung. Aufgrund dieser Erkenntnisse und der nachgewiesenen Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in primären hippocampalen Neuronen kann vermutet werden, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 ebenfalls eine wichtige Rolle während der neuronalen Morphogenese spielt.

#### **4.2 Das $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein ist auch in nicht-neuronalen Zellen des Gehirns, den Astrozyten, nachweisbar**

Um die Frage zu beantworten, ob sich die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression im Gehirn auf Neuronen beschränkt, wurden Astrozyten durch eine zelltypspezifische Kultivierung angereichert, woraufhin  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in diesen mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte.

Eine Studie von Yokota und Mitarbeiter (2006) gibt bereits Hinweise auf eine mögliche Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Astrozyten. Sowohl die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Genexpression als auch die Menge an  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein ist in Astrogliomen, dem am häufigsten vorkommenden Hirntumor bei erwachsenen Menschen, im Vergleich zu gesundem Hirngewebe signifikant erhöht (Yokota et al. 2006). Somit ist denkbar, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 einen möglichen Einfluss auf die Proliferation von Astrozyten ausübt.

Die Expression von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in beiden Zelltypen, Neuronen und Astrozyten, lässt die Frage über den die mentale Retardierung verursachenden primären Defekt aufkommen, denn beide Zelltypen sind an der Hirnentwicklung maßgeblich beteiligt. Der Kontakt zwischen Astrozyten und Neuronen ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion beider Zelltypen notwendig. Verschiedene Studien haben die Vermutung verstärkt, dass Astrozyten bei der Bildung, Funktion und Stabilität von Synapsen sowie bei der Ausbildung der synaptischen Plastizität eine entscheidende Rolle spielen (Ullian et al. 2004; Gage und McAllister 2005; Slezak et al. 2006). Die Kultivierung reiner Neurone ohne Astrozyten resultiert beispielsweise in einer geringeren Dichte von Neuronen und in einer stark reduzierten Anzahl von Synapsen, was mit einer verringerten synaptischen Aktivität einhergeht. Bei Neuronen-Astrozyten Co-Kulturen hingegen kommt es durch die Interaktion beider Zelltypen zu einer vermehrten Bildung von Synapsen und einem drastischen Anstieg synaptischer Aktivität (Yang et al. 2003; Hama et al. 2004). Weiterhin wird angenommen, dass sich Astrozyten an der Regulierung der Morphogenese von dendritischen Dornen beteiligen (Murai et al. 2003).

Wie bei allen Zellen richtet sich auch die Morphologie der Astrozyten nach ihrer Funktion. Astrozyten sind polare und bewegliche Zellen, die wie andere Zelltypen auch zur Ausbildung von Lamellipodien und Membranauffaltungen sowie fokalen Adhäsionen und Stressfasern befähigt sind. Durch *in-vitro* Experimente an cerebellären Astrozyten konnte gezeigt werden, dass sie durch die Ausbildung eines motilen Endes und mit Hilfe von Filopodien den Kontakt zu Neuronen herstellen. Die vom Zellkörper radiär ziehenden Fortsätze zweigen sich peripher weiter auf und bilden schließlich Lamellipodien und Membranauffaltungen, mit denen die Astrozyten Neurone umschneiden. Dies führt zu einer stabilen Verbindung von Astrozyten und Neuronen (Mason et al. 1988; Kalman et al. 1999). Es wird angenommen, dass die Rho GTPasen Cdc42, Rac1 und RhoA eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und der Zellpolarisierung von Astrozyten spielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die

ektopische Expression von dominant-negativem Rac1 in Astrozyten zur Zellabrundung führt (Kalman et al. 1999; Etienne-Manneville 2006).

Für das XLMR-Protein OPHN1 wurde ebenfalls eine Expression in Astrozyten nachgewiesen. Durch den Nachweis einer Kolo-kalisation von OPHN1 mit kortikalem F-Aktin und Stressfasern in Gliazellen wird eine Funktion von OPHN1 als Regulator des Aktinzytoskeletts während morphogenetischer Prozesse von Astrozyten angenommen (Fauchereau et al. 2003).

Der gleichzeitige Verlust der beiden Rac1-spezifischen GAP-Proteine Abr und Bcr, die von Astrozyten exprimiert werden, führt in der Maus zu einer beeinträchtigten Astrozyten-Funktion und zu Störungen während der Gehirnentwicklung (Kaartinen et al. 2001).

Es ist somit denkbar, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 eine Funktion als Austauschfaktor für Cdc42 und Rac1 während der Migration und Ausbildung komplexer Zellformen von Astrozyten übernimmt. Dabei könnte  $\alpha$ Pix/Arhgef6 bei der Kontaktsuche und -aufnahme von Astrozyten mit Neuronen und damit bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Synapsen und dendritischen Dornen eine wichtige Rolle spielen.

Astrozyten sind an der interzellulären Kommunikation im ZNS maßgeblich beteiligt. Daher ist vorstellbar, dass das fein aufeinander abgestimmte Kommunikationssystem empfindlich gestört wird, falls durch den Verlust von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Astrozyten die Signalvermittlung an der Synapse ausfällt oder beeinträchtigt wird.

#### **4.3 $\alpha$ Pix/Arhgef6 ist wahrscheinlich ein Protein der postsynaptischen Dichte**

Um weitere Anhaltspunkte zum besseren Verständnis der Rolle von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in Bezug auf neuronale Entwicklungsstörungen zu gewinnen, war von großem Interesse zu untersuchen, ob  $\alpha$ Pix/Arhgef6 auch in dendritischen Dornen, genauer in der postsynaptischen Dichte, vorkommt. Mittels biochemischer Anreicherung synaptischer Strukturen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Western-Blot-Analysen das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein sowohl in der synaptosomalen Fraktion als auch in der PSD-Fraktion nachgewiesen. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der synaptosomalen Fraktion etwa doppelt so stark abundant war wie in der PSD-Fraktion. Diese Daten lassen auf eine postsynaptische und auch eine präsynaptische Lokalisation von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 schließen.

Es ist schon seit einiger Zeit bekannt, dass die Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 als potentielle Regulatoren der Morphologie dendritischer Dornen fungieren und dabei unterschiedliche Effekte ausüben. Die ektopische Expression von RhoA in

murinen hippocampalen Neuronen führt zu einer reduzierten Dichte und Länge dendritischer Dornen, weshalb RhoA wahrscheinlich eine Funktion als negativer Regulator in diesen Prozessen zukommt (Nakayama et al. 2000; Yuste und Bonhoeffer 2004; Tashiro und Yuste 2004). Überexprimiertes Rac1 hingegen resultiert in einer Erhöhung der Anzahl dendritischer Dornen von Purkinjezellen und hippocampalen Neuronen der Maus (Luo et al. 1996; Nakayama et al. 2000; Tashiro et al. 2000). Die Rolle von Cdc42 ist für die Morphogenese der dendritischen Dornen weniger klar definiert (Tashiro et al. 2000). Scott und Mitarbeiter (2003) konnten aber zeigen, dass der Verlust der Cdc42-Funktion in *Drosophila*-Neuronen zu einer reduzierten Dichte Dornen-ähnlicher Strukturen führt. Daher wird vermutet, dass nur in bestimmten Neuronentypen die Aktivität von Cdc42 für die Bildung von dendritischen Dornen wichtig ist.

In Übereinstimmung dazu konnte auch für einige Rho GEFs eine Proteinexpression in dendritischen Dornen nachgewiesen und einige Effekte auf die Morphogenese der Dornen demonstriert werden. So kolokalisiert der Rac-spezifische GEF Kalirin-7 mit dem Gerüstprotein PSD-95 in der postsynaptischen Dichte dendritischer Dornen (Penzes et al. 2001). Die Überexpression von Kalirin-7 in corticalen Neuronen führt übereinstimmend mit dem Rac1-Phänotyp zu einer Erhöhung von Anzahl und Größe dendritischer Dornen, während eine reduzierte Kalirin-7-Expression in einer verminderten Dichte der Dornen resultiert (Ma et al. 2003). Kalirin-7 wird durch die Aktivierung des EphB2-Rezeptors zur Synapse transloziert. Dort aktiviert Kalirin-7 Rac1, welches sich seinerseits durch die Regulierung des Aktinzytoskeletts an der korrekten Entwicklung dendritischer Dornen beteiligt (Penzes et al. 2003). Kalirin-7 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Regulierung der lokalen Rac1-Aktivität an der postsynaptischen Membran.

Für  $\beta$ PIX/ARHGEF7 konnte eine Interaktion mit dem postsynaptischen Gerüstprotein Shank nachgewiesen werden (Park et al. 2003). Eine Funktion für Shank in der Morphogenese dendritischer Dornen wurde bereits demonstriert (Sala et al. 2001). Die Überexpression von Shank führt zu einer Akkumulation von  $\beta$ PIX/ARHGEF7 und PAK in den dendritischen Dornen. Zur Ausübung ihrer Funktion werden  $\beta$ PIX/ARHGEF7 und PAK offenbar von Shank zu den Dornen rekrutiert (Park et al. 2003).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass  $\beta$ PIX/ARHGEF7 von GIT1 an die Synapsen rekrutiert wird (Zhang et al. 2003). GIT1, ein Interaktionspartner von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 und  $\beta$ PIX/ARHGEF7, spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Morphogenese von dendritischen Dornen und bei der Bildung von Synapsen

(Zhang et al. 2003). Die Überexpression einer  $\beta$ PIX/ARHGEF7-Mutante, die kein GIT1 mehr bindet, führt in hippocampalen Rattenneuronen zu multiplen dendritischen Fortsätzen und zu einer reduzierten Dichte dendritischer Dornen und Synapsen. Nach Überexpression eines  $\beta$ PIX/ARHGEF7-Mutantenproteins, das keine Guanin-nukleotid-Austauschaktivität mehr zeigt, kommt es zu einer deutlichen Abnahme von dendritischen Fortsätzen und dendritischen Dornen sowie Synapsen. Die korrekte Lokalisation von  $\beta$ PIX/ARHGEF7 ist also eine wichtige Voraussetzung für die lokale Aktivierung von Rac in den dendritischen Dornen (Zhang et al. 2005). Es wird daher vermutet, dass ein Signalkomplex, bestehend aus GIT1,  $\beta$ PIX/ARHGEF7, Rac und PAK eine wichtige Rolle bei der Regulation der Morphologie von dendritischer Dornen und Synapsen spielt (Zhang et al. 2005).

Die hohe Homologie zwischen  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 und  $\beta$ PIX/ARHGEF7, die Assoziation von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 und GIT1 und der in dieser Arbeit gezeigte Nachweis des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in der postsynaptischen Dichte lassen eine Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 bei der Bildung von Synapsen und dendritischen Dornen vermuten. Möglicherweise wird dazu  $\alpha$ Pix/Arhgef6 von Git1 zur Synapse rekrutiert. Ob  $\alpha$ Pix/Arhgef6 dabei wichtige Restrukturierungen innerhalb der PSD bewirkt, die zu einer korrekten Ausbildung dendritischer Dornen beitragen, bleibt an dieser Stelle spekulativ. Möglich wäre auch, dass  $\alpha$ Pix/Arhgef6 als ein Adaptorprotein in der PSD fungiert.

Die Aufklärung der neurobiologischen Ursachen der mentalen Retardierung steht heute noch am Anfang. Es gibt jedoch berechtigte Hinweise dafür, dass die geistige Behinderung u.a. aus einer Beeinträchtigung der Differenzierung von Neuronen und der Bildung funktioneller Synapsen sowie aus einer unreifen Form von dendritischen Dornen resultiert (Kaufmann und Moser 2000; Ramakers 2002; Govek et al. 2005; Newey et al. 2005). Durch Untersuchungen an Kindern mit einer unspezifischen mentalen Retardierung wurde bereits in den 70er Jahren gezeigt, dass bei ihnen die Anzahl, Länge und der Verzweigungsgrad der Dendriten reduziert ist. Bei diesen Patienten konnten überaus lange und dünne dendritischen Dornen beobachtet werden, die mit einer unreifen Form von Dornen vergleichbar sind (Purpura 1974; Huttenlocher 1974). So ist denkbar, dass die morphologische Veränderung der Dendriten und dendritischen Dornen zur Beeinträchtigung der neuronalen Konnektivität und folglich der kognitiven Leistungen bei diesen Individuen geführt hat (Ramakers 2002; Newey et al. 2005; Govek et al. 2005).

Anhand verschiedener Maus- und Zellkulturmodelle konnte bereits gezeigt werden, welche Funktionen die von XLMR-Genen kodierten Proteine, die zudem noch in den

Rho GTPase-Zyklus involviert sind, im Hinblick auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Morphologie dendritischer Dornen haben. Die Analyse von corticalen Neuronen aus transgenen Mäusen, die dominant-negatives PAK3 exprimieren, ergab vergrößerte Synapsen sowie eine reduzierte Anzahl dendritischer Dornen, die zudem verkürzt waren (Hayashi et al. 2004). Die ektopische Expression von verschiedenen PAK3-Konstrukten, die entweder zu einer verminderten PAK3-Expression führten oder einen dominant-negativen Effekt ausübten, resultierte in einer Zunahme von dünnen, verlängerten Dornen und Filopodien-ähnlichen Strukturen an hippocampalen Neuronen, die nicht mehr zu synaptischen Kontakten ausreiften. Die Anzahl stummeliger und pilzförmiger (reifer) Dornen war in diesen Zellen reduziert (Boda et al. 2004). Im Gegensatz dazu scheint sich der Verlust von Pak3 in der entsprechenden Knockout-Maus nicht auf neuronale und synaptische Strukturen auszuwirken (Meng et al. 2005). Aufgrund der durch *in-vivo* und *in-vitro* Experimente erhaltenen nicht konsistenten Daten kann dem PAK3-Protein zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutige Rolle bei der Morphogenese und der Aufrechterhaltung der Morphologie dendritischer Dornen beigemessen werden.

Durch die Arbeit von Govek und Mitarbeitern (2004) konnte für das Ophn1-Protein ebenfalls eine bedeutende Rolle für die Morphogenese dendritischer Dornen nachgewiesen werden. Eine stark herabgesetzte Ophn1-Expression in hippocampalen Neuronen resultierte in einer signifikanten Reduktion der Länge von dendritischen Dornen (Govek et al. 2004).

Mit dem Nachweis von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der PSD könnte dieses auch ein Schlüsselprotein für die normale Entwicklung dendritischer Dornen sein.

Die Identifizierung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 als Bestandteil von präsynaptischen Strukturen könnte außerdem auf eine mögliche Rolle bei der Transmitterausschüttung hinweisen. Der Verlust von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 könnte daher zu beeinträchtigten Signalprozessen an der Präsynapse führen.  $\alpha$ GDI beispielsweise ist ein GDP-Dissoziations-Inhibitor für die GTPase Rab3a, welche mit Rho GTPasen eng verwandt und bei der Ausschüttung von Neurotransmittern beteiligt ist. Mutationen im *GDI1*-Gen führen zu X-chromosomaler Retardierung, was eventuell durch Störungen in der Signalweiterleitung durch Transmitter erklärt werden kann (D'Adamo et al. 1998).

Um Hinweise auf die Bedeutung von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 für die neuronale Morphogenese zu erhalten, wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Ger Ramakers (Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam, Niederlande) Mikrostrukturanalysen des Gehirns  $\alpha$ Pix/Arhgef6-defizienter Mäuse durchgeführt. Diese ergaben,

dass die *αPix/Arhgef6*-Knockout-Tiere im Hippocampus verlängerte apikale und basale Dendriten von Pyramidenzellen aufweisen, die zudem vermehrt verzweigt waren. Darüber hinaus ist die Dichte von pilzförmigen, ausgereiften dendritischen Dornen an den apikalen Dendriten signifikant erhöht (Elly van Galen und Ger Ramakers, unveröffentlichte Daten).

In den meisten Zellen besteht ein Zusammenhang zwischen Anzahl und Ausdehnung der Dendriten und der Anzahl der synaptischen Kontakte, die die Zellen von anderen Neuronen empfängt. Die Morphologie der Dendriten bestimmt dabei, auf welche Weise eine Zelle auf vielfältige Reize reagieren kann. Bereits Purpura (1974) machte die Beobachtung, dass Veränderungen im Verzweigungsgrad der Dendriten im cerebellären Cortex geistig behinderter Menschen vorhanden sind. Das dendritische Verzweigungsmuster bzw. die Ausrichtung von Dendriten ist entscheidend an der Verarbeitung synaptischer Signale beteiligt, indem sie die Effizienz der Ausbreitung postsynaptischer Ströme entlang der Dendritenmembran bis hin zum Axonhügel bestimmt (Whitford et al. 2002). Obwohl ein kausaler Zusammenhang zwischen der Orientierung von Dendriten (Dendritengeometrie) und der Synaptogenese noch nicht eindeutig bewiesen wurde, könnte vermutet werden, dass eine Verlängerung und eine vermehrte Verzweigung der apikalen und basalen Dendriten von Pyramidenzellen zu einer veränderten Signalverarbeitung in der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus führt. Im Gegensatz zu *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäusen wurden bei *Dbl*-defizienten Mäusen signifikant verkürzte basale und apikale Dendriten corticaler Neurone beobachtet, weshalb für *Dbl* eine Funktion bei der Regulierung der Dendritenelongation angenommen wird (Hirsch et al. 2002). Das *Dbl*-Protein ist ein Austauschfaktor sowohl für *RhoA* als auch für *Cdc42*. Die beobachtete reduzierte Dendritenlänge lässt vermuten, dass *Dbl in vivo* eine stärkere Austauschaktivität gegenüber *Cdc42* besitzt (Hirsch et al. 2002).

Während der Anpassung des Gehirns auf Umwelteinflüsse werden neue synaptische Verbindungen aufgebaut, bestehende verstärkt und nichtfunktionelle bzw. stark vernachlässigte Verbindungen zurückgebildet und eliminiert („synaptic pruning“). Dadurch kann Neues erlernt und Altes vergessen werden. Durch mehrere Studien wurde gezeigt, dass während dieser erfahrungsabhängigen Plastizität im Gehirn die Bildung neuer dendritischer Dornen und eine Zurückbildung ungebrauchter Dornen stattfindet (Geinisman et al. 2001; Goldin et al. 2001; Yuste und Bonhoeffer 2001). Somit wäre es denkbar, dass die stark erhöhte Dichte dendritischer Dornen in den *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäusen auf eine Beeinträchtigung der Selektion oder des „prunings“ von synaptischen Kontakten zurückzuführen ist. In Übereinstimmung dazu

wurde in *Fmr1*-Knockout-Mäusen ebenfalls eine erhöhte Dichte dendritischer Dornen nachgewiesen und dieser Phänotyp in gleicher Weise diskutiert (Comery et al. 1997). Die Tatsache, dass in der  $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Knockout-Maus die Form der dendritischen Dornen im Vergleich zur Wildtyp-Maus nicht verändert ist, macht eine Funktion von  $\alpha$ *Pix/Arhgef6* in der Morphogenese dendritischer Dornen eher unwahrscheinlich. Die erhöhte Anzahl reifer Dornen im Knockout-Tier lässt vielmehr vermuten, dass der Verlust von  $\alpha$ *Pix/Arhgef6* einen sekundären Effekt hat. In diesem Falle könnte spekuliert werden, dass zunächst die normale Anzahl dendritischer Dornen ausgebildet wird, im Zuge der erfahrungsabhängigen Plastizität jedoch die Eliminierung von ungebrauchten Dornen beeinträchtigt ist. Infolgedessen verbleibt eine erhöhte Anzahl von möglicherweise funktionsuntüchtigen dendritischen Dornen, was zu einer gestörten Informationsverarbeitung führen könnte.

## **5. Im Hippocampus der $\alpha$ *Pix/Arhgef6*-Knockout-Maus wurde eine verminderte Menge an aktivem Rac1 und Cdc42 nachgewiesen**

$\alpha$ PIX/ARHGEF6 wurde bereits als ein Rac1 und Cdc42-spezifischer GEF beschrieben (Manser et al. 1998; Bagrodia et al. 1998; Feng et al. 2002; Feng et al. 2004; Baird et al. 2005). Die GEF-Aktivität wurde aber bisher lediglich durch *in-vitro*-Verfahren bestimmt; der Nachweis einer *in vivo* GEF-Aktivität von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 existierte bis zu dieser Arbeit nicht. Die *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 eine sehr geringe GEF-Aktivität aufweist, die durch weitere Proteine als Kofaktoren stimuliert wird. Eine Koexpression von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 und der PI3-Kinase führte zur Aktivierung von Rac1 (Yoshii et al. 1999). Zudem wird die Austauschaktivität von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 durch eine Interaktion mit Cbl stimuliert (Feng et al. 2002). Es wird vermutet, dass  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 mit PAK interagiert und an die Zellmembran rekrutiert wird, um dort als Austauschfaktor für Cdc42 oder Rac fungieren zu können (Daniels et al. 1999; Feng et al. 2002; Li et al. 2003).

Kürzlich wurden zwei Mechanismen postuliert, durch die die GEF-Aktivität von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 reguliert werden soll.  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 kommt normalerweise als Dimer vor, und unter diesen Umständen aktiviert  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 spezifisch Rac1. Die Dissoziation des Dimers führt zu  $\alpha$ PIX/ARHGEF6-Monomeren, die in der Lage sind, sowohl Rac1 als auch Cdc42 zu aktivieren (Feng et al. 2004). Darüber hinaus besitzt  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 die Fähigkeit, mit aktivem, GTP-gebundenem Rac1 bzw. Cdc42 zu interagieren. Die Bindung von aktiviertem Cdc42 an ein  $\alpha$ PIX/ARHGEF6-

Dimer führt zur Stimulation dessen Rac1-spezifischer GEF-Aktivität. Daher wird für  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 eine duale Funktion angenommen. Einerseits fungiert  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 als ein stromabwärts liegendes Effektorprotein für aktiviertes Cdc42, andererseits wirkt  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 als ein stromaufwärts liegender Austauschfaktor für Rac1 (Baird et al. 2005).

Diese Daten demonstrieren eine spezifische Cdc42/Rac1-Austauschaktivität von  $\alpha$ PIX/ARHGEF6 *in-vitro*. Somit war es in dieser Arbeit von besonderem Interesse zu untersuchen, ob sich der Verlust des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in bestimmten Organen der Knockout-Maus auf den Aktivitätszustand von Cdc42 und Rac1 auswirkt. Es konnte eine deutliche Reduktion in der Menge dieser beiden aktivierten GTPasen im Gesamthirn der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus gefunden werden. Weiterführende Analysen haben gezeigt, dass aktiviertes Rac1 und Cdc42 vor allem im Hippocampus der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus reduziert war, wohingegen im Cortex und Cerebellum kein bedeutender Unterschied in der Menge an aktivem Rac1 und Cdc42 zwischen Knockout- und Wildtyp-Tier beobachtet wurde. Im Hippocampus des Knockout-Tieres wurde im Vergleich zur Wildtyp-Maus nur 79% an aktiviertem Cdc42 bzw. 83% an aktiviertem Rac1 nachgewiesen. Mit diesen Daten wurde erstmals der Nachweis einer *in vivo* GEF-Aktivität für das  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Protein erbracht. Da im Cortex und Cerebellum keine verminderte Menge der beiden aktivierten GTPasen beobachtet werden konnte, resultiert die reduzierte Menge von aktiviertem Rac1 und Cdc42 im Gesamthirn wahrscheinlich aus der deutlichen Abnahme der beiden GTP-gebundenen GTPasen im Hippocampus. Demnach scheint die GEF-Aktivität von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Hirn der adulten Maus örtlich begrenzt und/oder im Hippocampus erhöht zu sein, was eine wichtige Funktion von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in diesem Gewebe reflektieren könnte. Da allerdings im Western-Blot auch eine  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Expression im Cortex nachgewiesen werden konnte, ist eine GEF-Aktivität des Proteins in diesem Gewebe nicht auszuschließen. Es ist daher möglich, dass die Austauschaktivität von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 im Cortex für einen Nachweis mit der durchgeführten Methode zu gering ist. Der unveränderte Aktivitätszustand von Rac1 und Cdc42 in Cerebellum der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus korreliert mit dem fehlenden Nachweis des  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins in diesem Gewebe.

Eine verminderte Aktivität von Rac1 und Cdc42 konnte ebenfalls in Lis1-defizienten Neuronen beobachtet werden. Lis1 wurde als ein Dynein-assoziiertes Protein identifiziert und ist über die Aktivitätsregulierung von Rac1 und Cdc42 an der Migration von Neuronen beteiligt (Hirotsune et al. 1998; Faulkner et al. 2000). Mutationen in

*LIS1* führen aufgrund eines neuronalen Migrationsdefektes zu einer schweren Entwicklungsstörung des Neocortex (Lissenzephalie) (Reiner et al. 1993). *Lis1*-defiziente Neuronen weisen weniger F-Aktin und eine gestörte Migration auf. Die Länge und die Anzahl von Filopodien sind außerdem reduziert. Korrelierend mit diesen Daten konnte in *Lis1*-defizienten Neuronen eine stark verminderte Menge an aktivem, GTP-gebundenem Rac1 und Cdc42 nachgewiesen werden (Kholmanskikh et al. 2003). Es wird angenommen, dass die reduzierte Menge dieser beiden aktiven GTPasen zu einer veränderten Polymerisierung von Aktinfilamenten und somit zu verkürzten bzw. zahlenmäßig verringerten Filopodien führt (Kholmanskikh et al. 2003). Möglicherweise sind diese nun nicht mehr in der Lage, die Umgebung korrekt abzutasten und die Neuronen im sich entwickelnden Embryo an ihren richtigen Zielort zu bringen.

Die verminderte Menge an aktivem Cdc42 und Rac1 in der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus könnte daher ebenfalls in einer veränderten Reorganisation des Aktinzytoskeletts resultieren, was wiederum zu strukturellen Veränderungen von Dendriten führen könnte. Wie bereits erwähnt, konnte durch die Arbeit von Dr. Ger Ramakers beobachtet werden, dass die apikalen und basalen Dendriten im Hippocampus der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus verlängert und verstärkt verzweigt waren.

Es konnte bereits mehrfach im *in-vitro* Zellsystem gezeigt werden, dass die Überexpression von dominant-negativem oder konstitutiv-aktivem Rac1, Cdc42 bzw. RhoA zu unterschiedlichen Phänotypen in Neuronen führt und die Rho GTPasen dabei antagonistisch wirken. Beispielsweise resultiert die Überexpression von dominant-negativem Rac1 in einer signifikant verkürzten Länge und verminderten Verzweigung von Dendriten, während die Überexpression von konstitutiv-aktivem Rac1 verlängerte Dendriten und eine Zunahme der Dendritenverzweigung zur Folge hat (Threadgill et al. 1997; Hayashi et al. 2002; Li et al. 2000). Die Überexpression von dominant-negativem bzw. konstitutiv-aktivem Cdc42 resultiert in ähnlichen Phänotypen, wobei die Effekte weniger stark ausgeprägt sind als bei Rac1. Die Überexpression von konstitutiv-aktivem RhoA verursacht dagegen verkürzte, die von dominant-negativem RhoA signifikant verlängerte Dendriten (Nakayama et al. 2000; Lee et al. 2000; Li et al. 2000; Ahnert-Hilger et al. 2004). Rac1 und Cdc42 wirken sich demnach auf das Dendritenwachstum und die Dendritenverzweigung positiv aus, während RhoA als ein negativer Regulator fungiert.

Diesen Daten zufolge hätte eine reduzierte Menge an aktivem Rac1 und Cdc42 im Hippocampus der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Maus eigentlich zu einer Verkürzung der Dendriten und zu einer verminderten Verzweigung der Dendriten führen sollen.

Der entgegen diesen Erwartungen beobachtete Effekt könnte jedoch damit erklärt werden, dass im Gegensatz zu den oben genannten Studien hier eine GTPase nicht vollständig ausgeschaltet wird, sondern lediglich eine verminderte Aktivierung vorliegt. Die Menge an Rac1 und Cdc42 im Hippocampus des Knockout-Tieres ist signifikant reduziert, um etwa 20%, so dass es vermutlich zu einer Verschiebung der Mengenverhältnisse von aktivem Rac1, Cdc42 und RhoA kommt. Zum heutigen Zeitpunkt wird vermutet, dass nicht nur die Aktivierung einer einzelnen GTPase, sondern auch eine ausgewogene Balance zwischen den Aktivitäten von Rac1, Cdc42 und RhoA für die Morphologie von Dendriten von entscheidender Bedeutung ist (Govek et al. 2005; Newey et al. 2005). Rac1 und RhoA zeigen in neuronalen Zellen wechselseitige Beziehungen, die als „Crosstalk“ bezeichnet wird (Lee et al. 2005). Li und Mitarbeiter (2002) konnten zeigen, dass aktives RhoA die Rac1-Aktivität reduziert, während aktives Rac1 die Aktivität von RhoA im Froschhirn erhöht. Dies reflektiert die Existenz einer regulatorischen Rückkopplung unter den GTPasen, durch die die morphologischen Veränderungen von Dendriten streng kontrolliert werden. Es wird angenommen, dass die RhoA-Aktivität unter physiologischen Bedingungen während der Dendritenausbildung gering ist, während Rac1 in seiner aktiven Form vorliegt und somit Dendritenwachstum und -verzweigung fördert. Ist eine Limitierung des dendritischen Wachstums erforderlich, wird die Inhibition von RhoA aufgehoben, und es kommt zu einer lokalen Aktivität von RhoA (Van Aelst und Cline 2004).

Diese Daten weisen daraufhin, dass die kontrollierte Aktivierung und Deaktivierung von RhoA und Rac1 bei der Dendritenbildung von entscheidender Bedeutung ist. Es könnte daher vermutet werden, dass die reduzierte Menge von Rac1 und Cdc42 im Hippocampus der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus in einer Veränderung des Verhältnisses zwischen aktivem Rac1 bzw. Cdc42 und RhoA resultiert. Dies könnte in die Wechselwirkungen zwischen Rac1 und RhoA eingreifen, wodurch die Balance zwischen den beiden aktiven Formen dieser GTPasen gestört ist. Infolgedessen könnte beispielsweise die Aktivierung von RhoA durch aktives Rac1 beeinträchtigt sein, was sekundär zu einer Verlängerung von Dendriten geführt hat.

## **6. Die $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Maus zeigt eine verminderte LTP sowie spezifische Verhaltensauffälligkeiten und dient somit als Modell für eine Form der XLMR**

Mutationen im  $\alpha PIX/ARHGEF6$ -Gen führen beim Menschen zu einer X-chromosomalen unspezifischen geistigen Behinderung. Aus diesem Grund wurden die  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr.

Hans-Peter Lipp an der ETH in Zürich verschiedenen verhaltensbiologischen Tests unterzogen, um mögliche Defizite kognitiver Fähigkeiten und andere Verhaltensauffälligkeiten bei der Knockout-Maus aufzudecken.

Im „object exploration“-Test wurde das Verhalten der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäuse gegenüber eines für sie neuen Objektes in einer bekannten Umgebung untersucht.

Es wurde beobachtet, dass die Knockout-Tiere einen stärkeren Drang aufwiesen, um das neue Objekt zu erkunden und sich in dessen Nähe länger aufhielten als Wildtyp-Mäuse. Die Exploration bzw. das Erkundungsverhalten ist ein natürliches Verhalten von Mäusen, das dem Sammeln von Informationen dient. Durch Exploration lernt das Tier, seine Umgebung richtig einzuschätzen, um dann entsprechend auf die Umwelt reagieren zu können. Das Erkundungsverhalten ist deshalb eine Form des Lernens (Renner und Rosenzweig 1987). Ein äußerst aktives Explorationsverhalten kann als Merkmal verminderter Angst gewertet werden, da Erkundungsverhalten an sich für das Tier ein gewisses Risiko darstellt (Townsend 1997). Diesen Daten zufolge zeigen die *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäuse einen erhöhten Explorationsdrang und damit ein gestörtes emotionales Verhalten. Durch die Beeinträchtigung einer solchen Verhaltenskontrolle könnten die Knockout-Tiere Gefahrensituationen unterschätzen.

Zur Analyse kognitiver Leistungen der *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäuse wurde u.a. auch der *Morris Water Maze*-Test angewandt. Dieser Test wurde für Ratten und Mäuse entwickelt, um ihr räumliches „Referenzgedächtnis“ zu testen, von dem angenommen wird, dass es mit dem deklarativen Gedächtnis (bewusstes Gedächtnis für Fakten und Ereignisse) von Menschen vergleichbar ist. Dabei muss die Maus in der „acquisition phase“ (erste Lernperiode) eine im Wasser verdeckte Plattform finden. In der „reversal phase“, in der die Plattform neu positioniert wird, haben die Mäuse die Aufgabe, die Plattform wieder zu finden. Die Lösung dieser Aufgabe hängt sehr stark von der Fähigkeit der Tiere ab, eine „kognitive Landkarte“ der Umgebung zu erstellen, indem sie sich an Gegenständen im Raum orientieren (Parker und Walley 1988). Die Beteiligung des Hippocampus am räumlichen Gedächtnis wurde von vielen Autoren unterstrichen (Morris et al. 1982, 1990; D`Hooge und De Deyn 2001).

Bei den *αPix/Arhgef6*-Knockout-Tieren wurden erste Auffälligkeiten in der späten Phase der „acquisition phase“ beobachtet, in der die Tiere ein verändertes Suchverhalten und damit Probleme in ihrer Orientierung aufwiesen. In der darauf folgenden „reversal phase“ zeigten die Tiere eine eingeschränkte Fähigkeit zum „Umlernen“, da die Tiere die neu positionierte Plattform überwiegend an der ursprünglichen Position suchten. Bis heute wurden einige Mausmodelle mit Funktionsstörungen im Hippocampus beschrieben, die im Vergleich zu *αPix/Arhgef6*-Knockout-Mäusen ähnliche

Verhaltensmuster zeigen. Beispielsweise wurde bei Mäusen durch die Zugabe einer toxischen Substanz eine Schädigung des Hippocampus und der damit verbundenen kortikalen Regionen herbeigeführt. Diese Mäuse wiesen im *Morris Water Maze*-Test Lern- und Erinnerungsdefizite auf (Fang und Liu 2006). In drei weiteren Arbeiten wurden Lerndefizite hippocampuschädigter Mäuse im *Morris Water Maze*-Test beschrieben (Logue et al. 1997; Deacon et al. 2002; Deacon und Rawlins 2002). Bei Menschen mit Hippocampusschädigung wurde eine Beeinträchtigung der räumlichen Orientierung festgestellt, besonders, wenn die Umgebung vor der Verletzung noch nicht bekannt war (Teng und Squire 1999).

Die Analyse des Schwimmverhaltens der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse könnte darauf hindeuten, dass die Mäuse in der Ausbildung eines präzisen räumlichen Gedächtnisses beeinträchtigt sind, was vermutlich auf einem selektiven Defizit in der Integration räumlicher Informationen beruht. Diese Defizite der Knockout-Maus scheinen demnach mit der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Defizienz im Hippocampus zu korrelieren und könnten auch mit der verminderten Aktivität von Rac1 und Cdc42 im Hippocampus zusammenhängen.

Bemerkenswert ist, dass Mäuse, in denen einzelne XLMR-Gene ausgeschaltet wurden, andere Verhaltensauffälligkeiten aufweisen. *Pak3*-Knockout-Mäuse zeigen im *Morris Water Maze*-Test keine Auffälligkeiten. Im Gegensatz dazu sind diese Mäuse deutlich weniger in der Lage, eine bereits gelernte Abneigung gegenüber einer bestimmten Geschmacksrichtung wiederholt zu zeigen (Meng et al. 2005). *GDI1*-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Aggressivität, ein verändertes Sozialverhalten und vermutlich ein beeinträchtigtes Kurzzeitgedächtnis (D'Adamo et al. 2002). Zusammenfassend zeigt sich, dass Mausmodelle für eine Form der X-chromosomalen geistigen Behinderung beim Menschen messbare kognitive und verhaltensbiologische Defizite zeigen. Beim Menschen hingegen scheinen sich Defizite in kognitiven Fähigkeiten in einer geistigen Behinderung zu äußern, die vorerst nicht weiter differenzierbar ist. Um die geistige Behinderung beim Menschen näher differenzieren zu können, ist die Entwicklung von speziellen, an den Menschen angepassten Tests notwendig. Diese sollten eine Aufklärung von Fähigkeiten, die noch vergleichsweise normal sind und von stark beeinträchtigten Fähigkeiten ermöglichen. Für die Entwicklung solcher Tests könnten die aus Mausmodellen gewonnenen Daten einfließen.

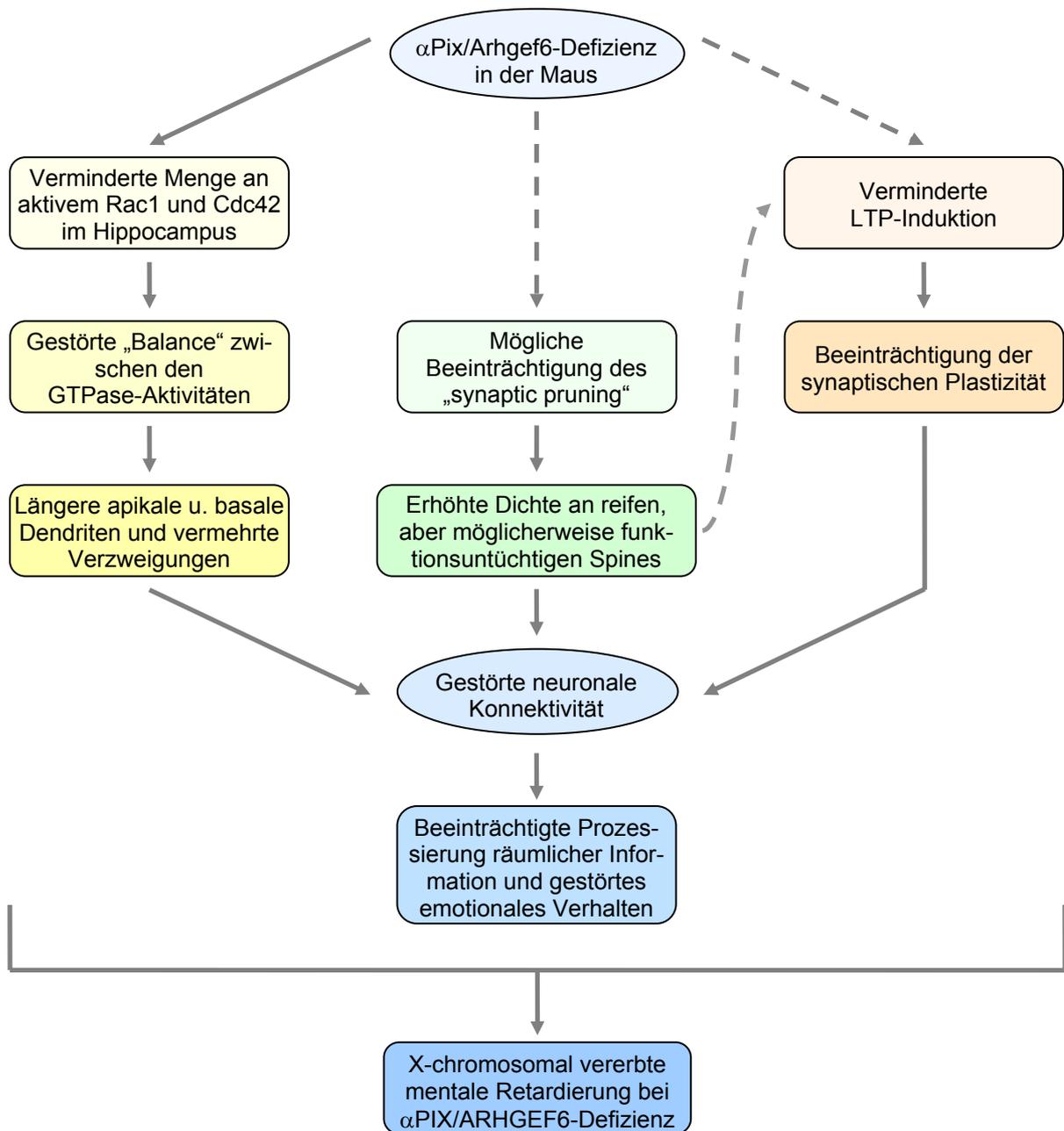
Um ein differenziertes Bild über die zellulären Auswirkungen der  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Defizienz in den Knockout-Mäusen zu erhalten, wurde die Langzeitpotenzierung (LTP) an Hirnschnittpräparaten der hippocampalen CA1-Region gemessen. Seit der Entdeckung der LTP als ein zelluläres Korrelat für die synaptische Plastizität wird

deren kausaler Zusammenhang mit der Ausbildung von Gedächtnisinhalten diskutiert. Die Argumentationen der Autoren für eine solche Beziehung basieren vor allem auf Erkenntnissen von genetisch manipulierten Mäusen (Dudai 2002; Silva 2003). Die Gruppe um Dr. Ger Ramakers konnte zeigen, dass die LTP-Induktion in der CA1-Region des Hippocampus von  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäusen signifikant reduziert ist, ähnlich wie bei *Pak3*-Knockout-Tieren. Diese zeigen Defizite in der späten Phase der Langzeitpotenzierung. Bei ihnen wird angenommen, dass Pak3 für die LTP-induzierte Genexpression notwendig ist (Meng et al, 2005). In *Fmr1*-defizienten Mäusen war keine LTP messbar und übereinstimmend dazu zeigten diese Tiere schwere Defizite im *Morris Water Maze*-Test (Fisch et al. 1999; Desai et al. 2006). In anderen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Knockout-Mäuse mit einer veränderten LTP Defizite in hippocampusabhängigen Lernaufgaben aufwiesen (Migaud et al. 1998; Meng et al. 2002; Alarcon et al. 2004; Korzus et al. 2004).

Wie bereits beschrieben, konnte in den verhaltensbiologischen Experimenten gezeigt werden, dass  $\alpha Pix/Arhgef6$ -Knockout-Mäuse in hippocampusabhängigen Lerntests im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant schlechtere Ergebnisse erzielten. Durch die reduzierte LTP-Induktion in diesen Mäusen könnte ein Zusammenhang zwischen der LTP auf der einen und der Prozessierung räumlicher Information auf der anderen Seite bestehen.

Nach der Hebb'schen Theorie ist für die Auslösung einer LTP das Zusammenspiel von prä- und postsynaptischer Aktivität notwendig. Das bedeutet, dass einerseits der Transmitter Glutamat aus präsynaptischen Endigungen infolge hochfrequenter Stimulation freigesetzt und andererseits gleichzeitig die postsynaptische Zelle durch diese Glutamatfreisetzung depolarisiert wird (Bliss und Collingridge 1993; Malenka und Nicoll 1999; Nicoll und Malenka 1999; Bliss et al. 2003). Der Verlust von  $\alpha Pix/Arhgef6$  könnte sich demnach auf die Signaltransduktion in dendritischen Dornen oder möglicherweise auch in der Präsynapse auswirken, die bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung einer LTP und damit der synaptischen Plastizität eine Rolle spielt. Folglich könnte  $\alpha Pix/Arhgef6$  eine Funktion bei der Ausbildung stabiler Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke besitzen, möglicherweise über weitere Protein-Protein-Interaktionen an der Synapse, und sich somit an der Ausbildung stabiler hippocampusabhängiger Gedächtnisformen beteiligen.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen und den von unseren Kollaborationsgruppen erhaltenen Daten lässt sich ein Modell erstellen, in welchem Ursachen für die Entstehung einer Form der X-chromosomal vererbten, unspezifischen mentalen Retardierung zusammengefasst sind (Abb. 43).



**Abb. 43: Modell für die möglichen Ursachen der beobachteten Beeinträchtigung kognitiver Leistungen bei der  $\alpha$ Pix/Arhgef-Knockout-Maus**

Für eine detailliertere Beschreibung des Modells siehe Text

Der Verlust von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der Knockout-Maus geht mit einer verminderten Menge an aktivem Rac1 und Cdc42 im Hippocampus einher. Diese Reduktion könnte zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen aktivem Rac1 bzw. Cdc42 und RhoA und somit zu einer Störung der Balance zwischen den Aktivitäten dieser Rho GTPasen führen. Damit einhergehend könnte es zur Ausbildung verlängerter apikaler und basaler Dendriten sowie zu einer verstärkten Dendritenverzweigung kom-

men. Weiterhin ist denkbar, dass das Fehlen von  $\alpha$ Pix/Arhgef6 in der Knockout-Maus sekundär zu einer Beeinträchtigung des „synaptic pruning“ während der erfahrungsabhängigen Plastizität führt, d.h. die Eliminierung von nichtfunktionellen synaptischen Verbindungen ist gestört, woraufhin eine erhöhte Anzahl von ungebrauchten und eventuell funktionsuntüchtigen dendritischen Dornen bestehen bleiben würde. Durch die Behinderung des Aufbaus von neuen funktionierenden dendritischen Dornen könnte die LTP-Induktion vermindert sein, die wiederum zur Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität führt. Allerdings könnte die verminderte LTP-Induktion auch durch eine andere, noch unbekanntere Ursache erfolgen, die mit der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Defizienz einhergeht. Sowohl die morphologisch veränderten Dendriten als auch die erhöhte Anzahl von möglicherweise nichtfunktionellen dendritischen Dornen sowie eine verminderte LTP-Induktion sind wahrscheinliche Ursachen für eine gestörte neuronale Konnektivität der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus. Folglich könnten diese zu Defiziten im *Morris Water Maze*-Test und zu einem gestörten emotionalen Verhalten im „exploration“-Test geführt haben. Die daraus abgeleitete Beeinträchtigung in der Prozessierung von räumlichen Informationen sowie das verminderte Angstverhalten der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus reflektieren messbare und unterscheidbare kognitive und verhaltensbiologische Defizite. Die  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus kann somit als Modell für eine Form der X-chromosomal vererbten, unspezifischen mentalen Retardierung beim Menschen dienen. Die bis zum jetzigen Zeitpunkt erzielten Daten sowie die in der Zukunft durchzuführenden Untersuchungen an der  $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus sollen entscheidend dazu beitragen, den Phänotyp der unspezifischen XLMR beim Menschen besser zu verstehen.

## VI. Literatur

- Aasheim, H.C., Pedoutour, F. and Smeland, E.B. (1997) Characterization, expression and chromosomal localization of a human gene homologous to the mouse Lsc oncogene, with strongest expression in hematopoietic tissues. *Oncogene*, **14**, 1747-1752.
- Abbi, S. and Guan, J.L. (2002) Focal adhesion kinase: protein interactions and cellular functions. *Histol Histopathol*, **17**, 1163-1171.
- Abbott, N.J., Ronnback, L. and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 41-53.
- Aghazadeh, B., Lowry, W.E., Huang, X.Y. and Rosen, M.K. (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell*, **102**, 625-633.
- Ahnert-Hilger, G., Holtje, M., Grosse, G., Pickert, G., Mucke, C., Nixdorf-Bergweiler, B., Boquet, P., Hofmann, F. and Just, I. (2004) Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones. *J Neurochem*, **90**, 9-18.
- Alarcon, J.M., Malleret, G., Touzani, K., Vronskaya, S., Ishii, S., Kandel, E.R. and Barco, A. (2004) Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP<sup>+/-</sup> mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron*, **42**, 947-959.
- Allen, K.M., Gleeson, J.G., Bagrodia, S., Partington, M.W., MacMillan, J.C., Cerione, R.A., Mulley, J.C. and Walsh, C.A. (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet*, **20**, 25-30.
- Aoki, K., Nakamura, T. and Matsuda, M. (2004) Spatio-temporal regulation of Rac1 and Cdc42 activity during nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem*, **279**, 713-719.
- Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R. and Macklis, J.D. (2005) Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, **45**, 207-221.
- Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J.L., Premont, R.T., Taylor, S.J. and Cerione, R.A. (1999) A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J Biol Chem*, **274**, 22393-22400.
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Jordon, K.A., Van Aelst, L. and Cerione, R.A. (1998) A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem*, **273**, 23633-23636.
- Baird, D., Feng, Q. and Cerione, R.A. (2005) The Cool-2/ $\alpha$ -Pix protein mediates a Cdc42-Rac signaling cascade. *Curr Biol*, **15**, 1-10.
- Barres, B.A., Chun, L.L. and Corey, D.P. (1989) Calcium current in cortical astrocytes: induction by cAMP and neurotransmitters and permissive effect of serum factors. *J Neurosci*, **9**, 3169-3175.
- Bateman, J., Shu, H. and Van Vactor, D. (2000) The guanine nucleotide exchange factor trio mediates axonal development in the Drosophila embryo. *Neuron*, **26**, 93-106.
- Birbaumer, N., Kubler, A., Ghanayim, N., Hinterberger, T., Perelmouter, J., Kaiser, J., Iversen, I., Kotchoubey, B., Neumann, N. and Flor, H. (2000) The thought translation device (TTD) for completely paralyzed patients. *IEEE Trans Rehabil Eng*, **8**, 190-193.
- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31-39.
- Bliss, T.V., Collingridge, G.L. and Morris, R.G. (2003) Introduction. Long-term potentiation and structure of the issue. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **358**, 607-611.
- Boda, B., Alberi, S., Nikonenko, I., Node-Langlois, R., Jourdain, P., Moosmayer, M., Parisi-Jourdain, L. and Muller, D. (2004) The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *J Neurosci*, **24**, 10816-10825.
- Boguski, M.S. and McCormick, F. (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**, 643-654.
- Bokoch, G.M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*, **72**, 743-781.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brewer, G.J. (1997) Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods*, **71**, 143-155.
- Cantrell, D. (1998) Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav? *Curr Biol*, **8**, R535-538.
- Cerione, R.A. and Zheng, Y. (1996) The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 216-222.

- Chelly, J. and Mandel, J.L. (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet*, **2**, 669-680.
- Chesler, M. and Kraig, R.P. (1987) Intracellular pH of astrocytes increases rapidly with cortical stimulation. *Am J Physiol*, **253**, R666-670.
- Chong, S.S., Pack, S.D., Roschke, A.V., Tanigami, A., Carozzo, R., Smith, A.C., Dobyns, W.B. and Ledbetter, D.H. (1997) A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum Mol Genet*, **6**, 147-155.
- Collin, C., Miyaguchi, K. and Segal, M. (1997) Dendritic spine density and LTP induction in cultured hippocampal slices. *J Neurophysiol*, **77**, 1614-1623.
- Comery, T.A., Harris, J.B., Willems, P.J., Oostra, B.A., Irwin, S.A., Weiler, I.J. and Greenough, W.T. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5401-5404.
- Coppola, G. and Geschwind, D.H. (2006) Microarrays and the microscope: Balancing throughput with resolution. *J Physiol*.
- Crespo, P., Schuebel, K.E., Ostrom, A.A., Gutkind, J.S. and Bustelo, X.R. (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*, **385**, 169-172.
- D'Adamo, P., Menegon, A., Lo Nigro, C., Grasso, M., Gulisano, M., Tamanini, F., Bienvenu, T., Gedeon, A.K., Oostra, B., Wu, S.K., Tandon, A., Valtorta, F., Balch, W.E., Chelly, J. and Toniolo, D. (1998) Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet*, **19**, 134-139.
- D'Adamo, P., Welzl, H., Papadimitriou, S., Raffaele di Barletta, M., Tiveron, C., Tatangelo, L., Pozzi, L., Chapman, P.F., Knevet, S.G., Ramsay, M.F., Valtorta, F., Leoni, C., Menegon, A., Wolfer, D.P., Lipp, H.P. and Toniolo, D. (2002) Deletion of the mental retardation gene Gdi1 impairs associative memory and alters social behavior in mice. *Hum Mol Genet*, **11**, 2567-2580.
- Dailey, M.E. and Smith, S.J. (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*, **16**, 2983-2994.
- Daniels, R.H., Hall, P.S. and Bokoch, G.M. (1998) Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *Embo J*, **17**, 754-764.
- Daniels, R.H., Zenke, F.T. and Bokoch, G.M. (1999) alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, **274**, 6047-6050.
- Deacon, R.M., Bannerman, D.M., Kirby, B.P., Croucher, A. and Rawlins, J.N. (2002) Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behav Brain Res*, **133**, 57-68.
- Deacon, R.M. and Rawlins, J.N. (2002) Learning impairments of hippocampal-lesioned mice in a paddling pool. *Behav Neurosci*, **116**, 472-478.
- del Pozo, M.A., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Serrador, J.M. and Sanchez-Madrid, F. (1999) Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol*, **29**, 3609-3620.
- Desai, N.S., Casimiro, T.M., Gruber, S.M. and Vanderklish, P.W. (2006) Early postnatal plasticity in neocortex of Fmr1 knockout mice. *J Neurophysiol*.
- Descheppe, C.F. (1998) Peptide receptors on astrocytes. *Front Neuroendocrinol*, **19**, 20-46.
- D'Hooge, R. and De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev*, **36**, 60-90.
- Doody, G.M., Bell, S.E., Vigorito, E., Clayton, E., McAdam, S., Tooze, R., Fernandez, C., Lee, I.J. and Turner, M. (2001) Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation. *Nat Immunol*, **2**, 542-547.
- Dougherty, J.D. and Geschwind, D.H. (2005) Progress in realizing the promise of microarrays in systems neurobiology. *Neuron*, **45**, 183-185.
- Dudai, Y. (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 211-216.
- Dustin, M.L. and Shaw, A.S. (1999) Costimulation: building an immunological synapse. *Science*, **283**, 649-650.
- Etienne-Manneville, S. (2006) In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol*, **406**, 565-578.
- Eva, A. and Aaronson, S.A. (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature*, **316**, 273-275.
- Fang, F. and Liu, G.T. (2006) Protective effects of compound FLZ on beta-amyloid peptide-(25-35)-induced mouse hippocampal injury and learning and memory impairment. *Acta Pharmacol Sin*, **27**, 651-658.

- Fauchereau, F., Herbrand, U., Chafey, P., Eberth, A., Koulakoff, A., Vinet, M.C., Ahmadian, M.R., Chelly, J. and Billuart, P. (2003) The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci*, **23**, 574-586.
- Faulkner, N.E., Dujardin, D.L., Tai, C.Y., Vaughan, K.T., O'Connell, C.B., Wang, Y. and Vallee, R.B. (2000) A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol*, **2**, 784-791.
- Feng, Q., Albeck, J.G., Cerione, R.A. and Yang, W. (2002) Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *J Biol Chem*, **277**, 5644-5650.
- Feng, Q., Baird, D. and Cerione, R.A. (2004) Novel regulatory mechanisms for the Dbl family guanine nucleotide exchange factor Cool-2/alpha-Pix. *Embo J*, **23**, 3492-3504.
- Fiala, J.C., Feinberg, M., Popov, V. and Harris, K.M. (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*, **18**, 8900-8911.
- Fisch, G.S., Hao, H.K., Bakker, C. and Oostra, B.A. (1999) Learning and memory in the FMR1 knockout mouse. *Am J Med Genet*, **84**, 277-282.
- Fischer, K.D., Tedford, K. and Penninger, J.M. (1998) Vav links antigen-receptor signaling to the actin cytoskeleton. *Semin Immunol*, **10**, 317-327.
- Fischer, K.D., Zmuldzinas, A., Gardner, S., Barbacid, M., Bernstein, A. and Guidos, C. (1995) Defective T-cell receptor signalling and positive selection of Vav-deficient CD4+ CD8+ thymocytes. *Nature*, **374**, 474-477.
- Flanders, J.A., Feng, Q., Bagrodia, S., Laux, M.T., Singavarapu, A. and Cerione, R.A. (2003) The Cbl proteins are binding partners for the Cool/Pix family of p21-activated kinase-binding proteins. *FEBS Lett*, **550**, 119-123.
- Fujita, A., Hattori, Y., Takeuchi, T., Kamata, Y. and Hata, F. (2001) NGF induces neurite outgrowth via a decrease in phosphorylation of myosin light chain in PC12 cells. *Neuroreport*, **12**, 3599-3602.
- Gage, F.H. and McAllister, A.K. (2005) Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol*, **15**, 497-499.
- Gecz, J. and Mulley, J. (2000) Genes for cognitive function: developments on the X. *Genome Res*, **10**, 157-163.
- Geinisman, Y., Berry, R.W., Disterhoft, J.F., Power, J.M. and Van der Zee, E.A. (2001) Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. *J Neurosci*, **21**, 5568-5573.
- Genot, E.M., Arriemerlou, C., Ku, G., Burgering, B.M., Weiss, A. and Kramer, I.M. (2000) The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 5469-5478.
- Gimona, M., Djinnovic-Carugo, K., Kranewitter, W.J. and Winder, S.J. (2002) Functional plasticity of CH domains. *FEBS Lett*, **513**, 98-106.
- Girkontaite, I., Missy, K., Sakk, V., Harenberg, A., Tedford, K., Potzel, T., Pfeffer, K. and Fischer, K.D. (2001) Lsc is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses. *Nat Immunol*, **2**, 855-862.
- Glaven, J.A., Whitehead, I.P., Nomanbhoy, T., Kay, R. and Cerione, R.A. (1996) Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein. *J Biol Chem*, **271**, 27374-27381.
- Goldin, M., Segal, M. and Avignone, E. (2001) Functional plasticity triggers formation and pruning of dendritic spines in cultured hippocampal networks. *J Neurosci*, **21**, 186-193.
- Govek, E.E., Newey, S.E., Akerman, C.J., Cross, J.R., Van der Veken, L. and Van Aelst, L. (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci*, **7**, 364-372.
- Govek, E.E., Newey, S.E. and Van Aelst, L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*, **19**, 1-49.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M. and Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, **285**, 221-227.
- Grosskreutz, Y., Hermann, A., Kins, S., Fuhrmann, J.C., Betz, H. and Kneussel, M. (2001) Identification of a gephyrin-binding motif in the GDP/GTP exchange factor collybistin. *Biol Chem*, **382**, 1455-1462.
- Groysman, M., Russek, C.S. and Katzav, S. (2000) Vav, a GDP/GTP nucleotide exchange factor, interacts with GDIs, proteins that inhibit GDP/GTP dissociation. *FEBS Lett*, **467**, 75-80.
- Habets, G.G., Scholtes, E.H., Zuydgeest, D., van der Kammen, R.A., Stam, J.C., Berns, A. and Collard, J.G. (1994) Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell*, **77**, 537-549.

- Hall, A. (1994) Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 31-54.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Hama, H., Hara, C., Yamaguchi, K. and Miyawaki, A. (2004) PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron*, **41**, 405-415.
- Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A. and Zheng, Y. (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the *dbl* oncogene product. *J Biol Chem*, **269**, 62-65.
- Hayashi, K., Ohshima, T. and Mikoshiba, K. (2002) Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. *Mol Cell Neurosci*, **20**, 579-594.
- Hayashi, M.L., Choi, S.Y., Rao, B.S., Jung, H.Y., Lee, H.K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A. and Tonegawa, S. (2004) Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron*, **42**, 773-787.
- Hering, H. and Sheng, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 880-888.
- Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J. and Wynshaw-Boris, A. (1998) Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet*, **19**, 333-339.
- Hirsch, E., Pozzato, M., Vercelli, A., Barberis, L., Azzolino, O., Russo, C., Vanni, C., Silengo, L., Eva, A. and Altruda, F. (2002) Defective dendrite elongation but normal fertility in mice lacking the Rho-like GTPase activator *Dbl*. *Mol Cell Biol*, **22**, 3140-3148.
- Hou, P., Estrada, L., Kinley, A.W., Parsons, J.T., Vojtek, A.B. and Gorski, J.L. (2003) *Fgd1*, the *Cdc42* GEF responsible for *Faciogenital Dysplasia*, directly interacts with cortactin and *mAbp1* to modulate cell shape. *Hum Mol Genet*, **12**, 1981-1993.
- Huttenlocher, P.R. (1974) Dendritic development in neocortex of children with mental defect and infantile spasms. *Neurology*, **24**, 203-210.
- Irwin, S.A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J.B., Crisostomo, R.A., Larsen, B.P., Kooy, F., Willems, P.J., Cras, P., Kozlowski, P.B., Swain, R.A., Weiler, I.J. and Greenough, W.T. (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet*, **98**, 161-167.
- Jin, P. and Warren, S.T. (2003) New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem Sci*, **28**, 152-158.
- Kaartinen, V., Gonzalez-Gomez, I., Voncken, J.W., Haataja, L., Faure, E., Nagy, A., Groffen, J. and Heisterkamp, N. (2001) Abnormal function of astroglia lacking *Abr* and *Bcr* RacGAPs. *Development*, **128**, 4217-4227.
- Kalman, D., Gomperts, S.N., Hardy, S., Kitamura, M. and Bishop, J.M. (1999) Ras family GTPases control growth of astrocyte processes. *Mol Biol Cell*, **10**, 1665-1683.
- Kang, H. and Schuman, E.M. (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*, **273**, 1402-1406.
- Kennedy, M.B. (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, **290**, 750-754.
- Kholmanskikh, S.S., Dobrin, J.S., Wynshaw-Boris, A., Letourneau, P.C. and Ross, M.E. (2003) Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in *Lis1*-deficient neurons. *J Neurosci*, **23**, 8673-8681.
- Kim, S., Kim, T., Lee, D., Park, S.H., Kim, H. and Park, D. (2000) Molecular cloning of neuronally expressed mouse *betaPix* isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*, **272**, 721-725.
- Kim, T. and Park, D. (2001) Molecular cloning and characterization of a novel mouse *betaPix* isoform. *Mol Cells*, **11**, 89-94.
- Kins, S., Betz, H. and Kirsch, J. (2000) *Collybistin*, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of *gephyrin*. *Nat Neurosci*, **3**, 22-29.
- Kirsch, J. (1999) Assembly of signaling machinery at the postsynaptic membrane. *Curr Opin Neurobiol*, **9**, 329-335.
- Kirsch, J. and Betz, H. (1995) The postsynaptic localization of the glycine receptor-associated protein *gephyrin* is regulated by the cytoskeleton. *J Neurosci*, **15**, 4148-4156.
- Kneussel, M., Engelkamp, D. and Betz, H. (2001) Distribution of transcripts for the brain-specific GDP/GTP exchange factor *collybistin* in the developing mouse brain. *Eur J Neurosci*, **13**, 487-492.
- Koh, C.G., Manser, E., Zhao, Z.S., Ng, C.P. and Lim, L. (2001) *Beta1PIX*, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. *J Cell Sci*, **114**, 4239-4251.

- Kohn, M., Steinbach, P., Hameister, H. and Kehrer-Sawatzki, H. (2004) A comparative expression analysis of four MRX genes regulating intracellular signalling via small GTPases. *Eur J Hum Genet*, **12**, 29-37.
- Korzus, E., Rosenfeld, M.G. and Mayford, M. (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron*, **42**, 961-972.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. and Lim, L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **15**, 1942-1952.
- Ku, G.M., Yablonski, D., Manser, E., Lim, L. and Weiss, A. (2001) A PAK1-PIX-PKL complex is activated by the T-cell receptor independent of Nck, Slp-76 and LAT. *Embo J*, **20**, 457-465.
- Kuhn, T.B., Meberg, P.J., Brown, M.D., Bernstein, B.W., Minamide, L.S., Jensen, J.R., Okada, K., Soda, E.A. and Bamberg, J.R. (2000) Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases. *J Neurobiol*, **44**, 126-144.
- Kunda, P., Paglini, G., Quiroga, S., Kosik, K. and Caceres, A. (2001) Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci*, **21**, 2361-2372.
- Kutsche, K. and Gal, A. (2001) The mouse Arhgef6 gene: cDNA sequence, expression analysis, and chromosome assignment. *Cytogenet Cell Genet*, **95**, 196-201.
- Kutsche, K., Yntema, H., Brandt, A., Jantke, I., Nothwang, H.G., Orth, U., Boavida, M.G., David, D., Chelly, J., Fryns, J.P., Moraine, C., Ropers, H.H., Hamel, B.C., van Bokhoven, H. and Gal, A. (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet*, **26**, 247-250.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lee, J.S., Kang Decker, N., Chatterjee, S., Yao, J., Friedman, S. and Shah, V. (2005) Mechanisms of nitric oxide interplay with Rho GTPase family members in modulation of actin membrane dynamics in pericytes and fibroblasts. *Am J Pathol*, **166**, 1861-1870.
- Lee, T., Winter, C., Marticke, S.S., Lee, A. and Luo, L. (2000) Essential roles of Drosophila RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron*, **25**, 307-316.
- Leeuwen, F.N., Kain, H.E., Kammen, R.A., Michiels, F., Kranenburg, O.W. and Collard, J.G. (1997) The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 affects neuronal morphology; opposing roles for the small GTPases Rac and Rho. *J Cell Biol*, **139**, 797-807.
- Lehrke, R. (1972) A theory of X-linkage of major intellectual traits. Response to Dr. Anastasi and to the Drs. Nance and Engel. *Am J Ment Defic*, **76**, 626-631.
- Leinweber, B., Tang, J.X., Stafford, W.F. and Chalovich, J.M. (1999) Calponin interaction with alpha-actinin-actin: evidence for a structural role for calponin. *Biophys J*, **77**, 3208-3217.
- Lemmon, M.A. and Ferguson, K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*, **350 Pt 1**, 1-18.
- Li, X., Saint-Cyr-Proulx, E., Aktories, K. and Lamarche-Vane, N. (2002) Rac1 and Cdc42 but not RhoA or Rho kinase activities are required for neurite outgrowth induced by the Netrin-1 receptor DCC (deleted in colorectal cancer) in N1E-115 neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, **277**, 15207-15214.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A.V., Wu, G., Li, L., Liu, M., Huang, C.K. and Wu, D. (2003) Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell*, **114**, 215-227.
- Li, Z., Van Aelst, L. and Cline, H.T. (2000) Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in Xenopus central neurons in vivo. *Nat Neurosci*, **3**, 217-225.
- Logue, S.F., Paylor, R. and Wehner, J.M. (1997) Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci*, **111**, 104-113.
- Luo, L. (2000) Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci*, **1**, 173-180.
- Luo, L., Jan, L. and Jan, Y.N. (1996) Small GTPases in axon outgrowth. *Perspect Dev Neurobiol*, **4**, 199-204.
- Ma, X.M., Huang, J., Wang, Y., Eipper, B.A. and Mains, R.E. (2003) Kalirin, a multifunctional Rho guanine nucleotide exchange factor, is necessary for maintenance of hippocampal pyramidal neuron dendrites and dendritic spines. *J Neurosci*, **23**, 10593-10603.
- Malenka, R.C. and Nicoll, R.A. (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, **285**, 1870-1874.
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998) PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell*, **1**, 183-192.

- Mason, C.A., Edmondson, J.C. and Hatten, M.E. (1988) The extending astroglial process: development of glial cell shape, the growing tip, and interactions with neurons. *J Neurosci*, **8**, 3124-3134.
- Matus, A., Brinkhaus, H. and Wagner, U. (2000) Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus*, **10**, 555-560.
- May, V., Schiller, M.R., Eipper, B.A. and Mains, R.E. (2002) Kalirin Dbl-homology guanine nucleotide exchange factor 1 domain initiates new axon outgrowths via RhoG-mediated mechanisms. *J Neurosci*, **22**, 6980-6990.
- McCormick, F. (1995) Ras signaling and NF1. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 51-55.
- McPherson, C.E., Eipper, B.A. and Mains, R.E. (2002) Genomic organization and differential expression of Kalirin isoforms. *Gene*, **284**, 41-51.
- McPherson, C.E., Eipper, B.A. and Mains, R.E. (2005) Multiple novel isoforms of Trio are expressed in the developing rat brain. *Gene*, **347**, 125-135.
- Meng, J., Meng, Y., Hanna, A., Janus, C. and Jia, Z. (2005) Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J Neurosci*, **25**, 6641-6650.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L. and Jia, Z. (2002) Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*, **35**, 121-133.
- Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L.C., Watabe, A.M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M.F., Morris, R.G., Morrison, J.H., O'Dell, T.J. and Grant, S.G. (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, **396**, 433-439.
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J.K., Jones, Y., Martone, M.E. and Mayford, M. (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*, **36**, 507-519.
- Mirnics, K. and Pevsner, J. (2004) Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat Neurosci*, **7**, 434-439.
- Missy, K., Sindrilaru, A., Hu, B., Harenberg, A., Sakk, V., Kuchenbecker, K., Kutsche, K., Sunderkötter, C. H., Fischer, K. D. alphaPIX RhoGEF regulates TCR signaling and Th1 responses. *eingereicht*.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A. (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, **395**, 82-86.
- Monks, C.R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. and Kupfer, A. (1997) Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature*, **385**, 83-86.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N. and O'Keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, **297**, 681-683.
- Morris, R.G., Schenk, F., Tweedie, F. and Jarrard, L.E. (1990) Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. *Eur J Neurosci*, **2**, 1016-1028.
- Moser, B. and Loetscher, P. (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, **2**, 123-128.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y. and Pasquale, E.B. (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*, **6**, 153-160.
- Murphy, S. and Pearce, B. (1987) Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells. *Neuroscience*, **22**, 381-394.
- Nakayama, A.Y., Harms, M.B. and Luo, L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, **20**, 5329-5338.
- Narumiya, S., Ishizaki, T. and Watanabe, N. (1997) Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, **410**, 68-72.
- Nelson, S.B., Sugino, K. and Hempel, C.M. (2006) The problem of neuronal cell types: a physiological genomics approach. *Trends Neurosci*, **29**, 339-345.
- Newey, S.E., Velamoor, V., Govek, E.E. and Van Aelst, L. (2005) Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol*, **64**, 58-74.
- Nguyen, D.V., Arpat, A.B., Wang, N. and Carroll, R.J. (2002) DNA microarray experiments: biological and technological aspects. *Biometrics*, **58**, 701-717.
- Nicoll, R.A. and Malenka, R.C. (1999) Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 515-525.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1995) Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*, **23**, 456-459.

- Nobes, C.D., Hawkins, P., Stephens, L. and Hall, A. (1995) Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell Sci*, **108 ( Pt 1)**, 225-233.
- Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S.C., Hall, C. and Lim, L. (1998) PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *Embo J*, **17**, 4328-4339.
- O'Brien, S.P., Seipel, K., Medley, Q.G., Bronson, R., Segal, R. and Streuli, M. (2000) Skeletal muscle deformity and neuronal disorder in Trio exchange factor-deficient mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12074-12078.
- Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H. (2001) Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci*, **21**, 6105-6114.
- Olson, M.F., Pasteris, N.G., Gorski, J.L. and Hall, A. (1996) Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr Biol*, **6**, 1628-1633.
- Park, E., Na, M., Choi, J., Kim, S., Lee, J.R., Yoon, J., Park, D., Sheng, M. and Kim, E. (2003) The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem*, **278**, 19220-19229.
- Parker, T.W. and Walley, R.E. (1988) Effect of low-intensity hippocampal stimulation on spatial versus working memory in rats. *Behav Neurosci*, **102**, 653-661.
- Parnas, D., Haghighi, A.P., Fetter, R.D., Kim, S.W. and Goodman, C.S. (2001) Regulation of postsynaptic structure and protein localization by the Rho-type guanine nucleotide exchange factor dPix. *Neuron*, **32**, 415-424.
- Penzes, P., Beeser, A., Chernoff, J., Schiller, M.R., Eipper, B.A., Mains, R.E. and Huganir, R.L. (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron*, **37**, 263-274.
- Penzes, P., Johnson, R.C., Sattler, R., Zhang, X., Huganir, R.L., Kambampati, V., Mains, R.E. and Eipper, B.A. (2001) The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, **29**, 229-242.
- Phee, H., Abraham, R.T. and Weiss, A. (2005) Dynamic recruitment of PAK1 to the immunological synapse is mediated by PIX independently of SLP-76 and Vav1. *Nat Immunol*, **6**, 608-617.
- Pilpel, Y. and Segal, M. (2004) Activation of PKC induces rapid morphological plasticity in dendrites of hippocampal neurons via Rac and Rho-dependent mechanisms. *Eur J Neurosci*, **19**, 3151-3164.
- Portales-Casamar, E., Briancon-Marjollet, A., Fromont, S., Triboulet, R. and Debant, A. (2006) Identification of novel neuronal isoforms of the Rho-GEF Trio. *Biol Cell*, **98**, 183-193.
- Potter, D.A., Tirnauer, J.S., Janssen, R., Croall, D.E., Hughes, C.N., Fiocco, K.A., Mier, J.W., Maki, M. and Herman, I.M. (1998) Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol*, **141**, 647-662.
- Purpura, D.P. (1974) Dendritic spine "dysgenesis" and mental retardation. *Science*, **186**, 1126-1128.
- Qian, X., Esteban, L., Vass, W.C., Upadhyaya, C., Papageorge, A.G., Yienger, K., Ward, J.M., Lowy, D.R. and Santos, E. (2000) The Sos1 and Sos2 Ras-specific exchange factors: differences in placental expression and signaling properties. *Embo J*, **19**, 642-654.
- Ramakers, G.J. (2002) Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci*, **25**, 191-199.
- Raymond, F.L. (2006) X linked mental retardation: a clinical guide. *J Med Genet*, **43**, 193-200.
- Reif, K. and Cantrell, D.A. (1998) Networking Rho family GTPases in lymphocytes. *Immunity*, **8**, 395-401.
- Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T. and Ledbetter, D.H. (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*, **364**, 717-721.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B. and Schwartz, M.A. (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo J*, **18**, 578-585.
- Renner, M.J. and Rosenzweig, M.R. (1987) The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals. *Dev Psychobiol*, **20**, 19-24.
- Rhee, S., Yang, S.J., Lee, S.J. and Park, D. (2004) betaPix-b(L), a novel isoform of betaPix, is generated by alternative translation. *Biochem Biophys Res Commun*, **318**, 415-421.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-410.
- Ropers, H.H. (2006) X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder. *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 260-269.

- Rosenberger, G., Gal, A. and Kutsche, K. (2005) AlphaPIX associates with calpain 4, the small subunit of calpain, and has a dual role in integrin-mediated cell spreading. *J Biol Chem*, **280**, 6879-6889.
- Rosenberger, G., Jantke, I., Gal, A. and Kutsche, K. (2003) Interaction of alphaPIX (ARHGEF6) with beta-parvin (PARVB) suggests an involvement of alphaPIX in integrin-mediated signaling. *Hum Mol Genet*, **12**, 155-167.
- Rosenberger, G., Kutsche, K. (2006) alphaPIX and betaPIX and their role in focal adhesion formation. *European Journal of cell biology*, **85**, 265-274
- Rossman, K.L., Der, C.J. and Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 167-180.
- Rottner, K., Hall, A. and Small, J.V. (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol*, **9**, 640-648.
- Ruchhoeft, M.L., Ohnuma, S., McNeill, L., Holt, C.E. and Harris, W.A. (1999) The neuronal architecture of Xenopus retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *J Neurosci*, **19**, 8454-8463.
- Sala, C., Piech, V., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G. and Sheng, M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, **31**, 115-130.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sarner, S., Kozma, R., Ahmed, S. and Lim, L. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42, and Rac1 act downstream of Ras in integrin-dependent neurite outgrowth in N1E-115 neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 158-172.
- Schmidt, A. and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, **16**, 1587-1609.
- Schuebel, K.E., Bustelo, X.R., Nielsen, D.A., Song, B.J., Barbacid, M., Goldman, D. and Lee, I.J. (1996) Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes. *Oncogene*, **13**, 363-371.
- Scott, E.K., Reuter, J.E. and Luo, L. (2003) Small GTPase Cdc42 is required for multiple aspects of dendritic morphogenesis. *J Neurosci*, **23**, 3118-3123.
- Scoville, W.B. and Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **20**, 11-21.
- Sepulveda, J.L. and Wu, C. (2006) The parvins. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 25-35.
- Shoemaker, D.D. and Linsley, P.S. (2002) Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 334-337.
- Silva, A.J. (2003) Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J Neurobiol*, **54**, 224-237.
- Slezak, M., Pfrieger, F.W. and Soltys, Z. (2006) Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *J Physiol Paris*, **99**, 84-91.
- Smith, H.O. and Birnstiel, M.L. (1976) A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res*, **3**, 2387-2398.
- Sorra, K.E. and Harris, K.M. (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, **10**, 501-511.
- Stekel, D. (2003) *Microarray Bioinformatics*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Stouten, P.F., Sander, C., Wittinghofer, A. and Valencia, A. (1993) How does the switch II region of G-domains work? *FEBS Lett*, **320**, 1-6.
- Suh, Y.H., Shin, Y.K., Kook, M.C., Oh, K.I., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, I.S., Park, H.J., Huh, T.L. and Park, S.H. (2003) Cloning, genomic organization, alternative transcripts and expression analysis of CD99L2, a novel paralog of human CD99, and identification of evolutionary conserved motifs. *Gene*, **307**, 63-76.
- Symons, M. and Settleman, J. (2000) Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol*, **10**, 415-419.
- Tapon, N. and Hall, A. (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 86-92.
- Tashiro, A., Minden, A. and Yuste, R. (2000) Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex*, **10**, 927-938.
- Tashiro, A. and Yuste, R. (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci*, **26**, 429-440.
- Tedford, K., Nitschke, L., Girkontaite, I., Charlesworth, A., Chan, G., Sakk, V., Barbacid, M. and Fischer, K.D. (2001) Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling. *Nat Immunol*, **2**, 548-555.

- Teng, E. and Squire, L.R. (1999) Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. *Nature*, **400**, 675-677.
- Threadgill, R., Bobb, K. and Ghosh, A. (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron*, **19**, 625-634.
- Townsend, P. (1997) Use of in-cage shelters by laboratory rats. *Anim. Welfare*, **6**, 95-103.
- Turner, C.E., Brown, M.C., Perrotta, J.A., Riedy, M.C., Nikolopoulos, S.N., McDonald, A.R., Bagrodia, S., Thomas, S. and Leventhal, P.S. (1999) Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J Cell Biol*, **145**, 851-863.
- Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R. and Tybulewicz, V.L. (1997) A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity*, **7**, 451-460.
- Ullian, E.M., Christopherson, K.S. and Barres, B.A. (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, **47**, 209-216.
- Van Aelst, L. and Cline, H.T. (2004) Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol*, **14**, 297-304.
- Van Aelst, L. and D'Souza-Schorey, C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*, **11**, 2295-2322.
- van Horck, F.P., Ahmadian, M.R., Haeusler, L.C., Moolenaar, W.H. and Kranenburg, O. (2001) Characterization of p190RhoGEF, a RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor that interacts with microtubules. *J Biol Chem*, **276**, 4948-4956.
- van Leeuwen, J.E. and Samelson, L.E. (1999) T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol*, **11**, 242-248.
- Vicente-Manzanares, M., Cruz-Adalia, A., Martin-Cofreces, N.B., Cabrero, J.R., Dosil, M., Alvarado-Sanchez, B., Bustelo, X.R. and Sanchez-Madrid, F. (2005) Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood*, **105**, 3026-3034.
- Volinsky, N., Gantman, A. and Yablonski, D. (2006) A Pak- and Pix-dependent branch of the SDF-1alpha signalling pathway mediates T cell chemotaxis across restrictive barriers. *Biochem J*, **397**, 213-222.
- Walikonis, R.S., Jensen, O.N., Mann, M., Provance, D.W., Jr., Mercer, J.A. and Kennedy, M.B. (2000) Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci*, **20**, 4069-4080.
- Wang, D.Z., Hammond, V.E., Abud, H.E., Bertoncillo, I., McAvoy, J.W. and Bowtell, D.D. (1997) Mutation in Sos1 dominantly enhances a weak allele of the EGFR, demonstrating a requirement for Sos1 in EGFR signaling and development. *Genes Dev*, **11**, 309-320.
- Weiler, I.J. and Greenough, W.T. (1999) Synaptic synthesis of the Fragile X protein: possible involvement in synapse maturation and elimination. *Am J Med Genet*, **83**, 248-252.
- Whitford, K.L., Dijkhuizen, P., Polleux, F. and Ghosh, A. (2002) Molecular control of cortical dendrite development. *Annu Rev Neurosci*, **25**, 127-149.
- Wu, W.J., Tu, S. and Cerione, R.A. (2003) Activated Cdc42 sequesters c-Cbl and prevents EGF receptor degradation. *Cell*, **114**, 715-725.
- Yamaji, S., Suzuki, A., Kanamori, H., Mishima, W., Takabayashi, M., Fujimaki, K., Tomita, N., Fujisawa, S., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y. (2002) Possible role of ILK-affixin complex in integrin-cytoskeleton linkage during platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*, **297**, 1324-1331.
- Yamaji, S., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Koide, Y., Yoshida, M., Kanamori, H., Mohri, H., Ohno, S. and Ishigatsubo, Y. (2001) A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol*, **153**, 1251-1264.
- Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M. and Duan, S. (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15194-15199.
- Yokota, T., Kouno, J., Adachi, K., Takahashi, H., Teramoto, A., Matsumoto, K., Sugisaki, Y., Onda, M. and Tsunoda, T. (2006) Identification of histological markers for malignant glioma by genome-wide expression analysis: dynein, alpha-PIX and sorcin. *Acta Neuropathol (Berl)*, **111**, 29-38.
- Yoshii, S., Tanaka, M., Otsuki, Y., Wang, D.Y., Guo, R.J., Zhu, Y., Takeda, R., Hanai, H., Kaneko, E. and Sugimura, H. (1999) alphaPIX nucleotide exchange factor is activated by interaction with phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene*, **18**, 5680-5690.
- Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2001) Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1071-1089.
- Yuste, R. and Bonhoeffer, T. (2004) Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*, **5**, 24-34.

- Za, L., Albertinazzi, C., Paris, S., Gagliani, M., Tacchetti, C. and de Curtis, I. (2006)  $\beta$ PIX controls cell motility and neurite extension by regulating the distribution of GIT1. *J Cell Sci*, **119**, 2654-2666.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. and Bagni, C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, **112**, 317-327.
- Zhang, H., Webb, D.J., Asmussen, H. and Horwitz, A.F. (2003) Synapse formation is regulated by the signaling adaptor GIT1. *J Cell Biol*, **161**, 131-142.
- Zhang, H., Webb, D.J., Asmussen, H., Niu, S. and Horwitz, A.F. (2005) A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci*, **25**, 3379-3388.
- Zhang, R., Alt, F.W., Davidson, L., Orkin, S.H. and Swat, W. (1995) Defective signalling through the T- and B-cell antigen receptors in lymphoid cells lacking the vav proto-oncogene. *Nature*, **374**, 470-473.
- Zhang, W. and Benson, D.L. (2000) Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses. *Hippocampus*, **10**, 512-526.
- Zheng, Y. (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*, **26**, 724-732.
- Zirlinger, M. and Anderson, D. (2003) Molecular dissection of the amygdala and its relevance to autism. *Genes Brain Behav*, **2**, 282-294.
- Ziv, N.E. and Smith, S.J. (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, **17**, 91-102.

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits eingereicht:

Missy, K., Sindrilaru, A, Hu, B., Harenberg, A., Sakk, V., **Kuchenbecker, K.**, Kutsche, K., Sunderkötter, C. H., Fischer, K. D.  $\alpha$ PIX RhoGEF regulates TCR signaling and Th1 responses. *J Exp Med*

Vorträge mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

**Kuchenbecker, K.**, van Galen, E.J.M., Baker, R.E., Ramakers, G.J.A., Gal, A., Kutsche, K. Decrease of mature dendritic spines in the *Arhgef6*-deficient mice, a model for non-specific X-linked mental retardation. Congress of the European Society of Human Genetics, Juni 2004, München

**Kuchenbecker, K.**, van Galen, E.J.M., Baker, R.E., Ramakers, G.J.A., Gal, A., Kutsche, K. *Arhgef6*-deficient mice, a model for non-specific X-linked mental retardation, show a decrease of mature dendritic spines. 11. Workshop on Neurogenetics

Poster mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgendem Kongress präsentiert:

**Kuchenbecker, K.**, van Galen, E.J.M., Baker, R.E., Ramakers, G.J.A., Gal, A., Kutsche, K. *Arhgef6*-deficient mice, a model for non-specific X-linked mental retardation, show a decrease of mature dendritic spines. 14. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Oktober 2003, Marburg

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Kerstin Kuchenbecker  
geboren 1974 in Celle

## Studium

Okt. 1994 - Okt. 2001	Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
Sept. 2000 - Sept. 2001	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Georg-August-Universität Göttingen Thema: „Zur intrazellulären Lokalisation und funktionellen Charakterisierung des Genproduktes von <i>etr2</i> der Maus“ Betreuer Dr. Franco Laccone
Mai. 2002 - Okt. 2006	Doktorarbeit am Institut für Humangenetik, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, Butenfeld 42, 22529 Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Kutsche: „Expressionsanalyse des murinen $\alpha$ Pix/Arhgef6-Proteins und funktionelle Charakterisierung der $\alpha$ Pix/Arhgef6-Knockout-Maus“ 1. Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas Gal 2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Rodewald

## **Danksagung**

An erster Stelle sei Prof. Dr. Kerstin Kutsche herzlichst gedankt für die engagierte und fachkundige Betreuung dieser Arbeit, ihre Offenheit für neue Ideen und versierten Kommentare sowie für viele weiterführende Diskussionen. Weiterhin möchte ich mich für das prompte Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre stete Aufmunterung während „heißer Phasen“ bedanken.

Prof. Dr. Andreas Gal danke ich für seine kritischen und qualifizierten Korrekturen, seine hilfreiche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik. Darüber hinaus möchte ich mich für die schnelle und kompetente Begutachtung der Dissertation bedanken.

Bei Prof. Dr. Alexander Rodewald bedanke ich mich für das Interesse an dieser Arbeit und für das bereitwillige Übernehmen des Zweitgutachtens.

Stefan Kindler und Hans-Jürgen Kreienkamp danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und Verbindlichkeit mir gegenüber. Ihre Ratschläge haben viel zum Gelingen der Laborarbeit beigetragen.

„Schorsch“ Rosenberger möchte ich für die Auffrischung und Ergänzung meiner naturwissenschaftlichen Kenntnisse, für seine ausgeprägte Hilfsbereitschaft, gerade zu Beginn dieser Arbeit, und auch für seine Freundschaft danken.

Vor allem Tine Hartwig danke ich sehr für ihre Freundschaft und ihre außergewöhnlich große Hilfsbereitschaft. Sie war mir mit Motivation, Kritik und Korrekturen zur rechten Zeit eine große Stütze.

Ich möchte mich bei Inka, Isa und Ben sowie bei allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für eine angenehme Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft, und geduldigem Ertragen des Zustandes meines Arbeitsplatzes und Schreibtisches bedanken. Sie schafften eine Atmosphäre von gegenseitiger Unterstützung und Heiterkeit, die diese Zeit sehr schön machten.

„Kuchen“ gilt zudem ein besonderer Dank für seine Kraft und liebevolle Unterstützung, die mich all die Zeit durch meine Doktorarbeit begleitet haben.