

**Mechanismen der Adaptation retinaler Wachstumskegel  
an das axonale Lenkungssignal Ephrin-A5**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

**Diplom-Biologe Martin Fritz**

aus

Rastatt







# **Mechanismen der Adaptation retinaler Wachstumskegel an das axonale Lenkungssignal Ephrin-A5**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

**Diplom-Biologe Martin Fritz**

aus

Rastatt

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.12



Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von März 2008 bis November 2012 am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Die Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Martin Fritz

Bischweier, den 05.11.2012



## DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen recht herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bei meinem Betreuer und dem Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer. Vielen Dank für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Zoologischen Institut durchführen zu können. Vielen Dank für das interessante Thema, für hilfreiche Diskussionen, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für das in mich gesetzte Vertrauen. Desweiteren bedanke ich mich recht herzlich dafür, dass Sie mir die zweimalig Teilnahme am höchst lehrreichen Meeting in Cold Spring Harbor ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Peter Nick danke ich herzlich für die Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Franco Weth - für hilfreiche Diskussionen in angenehmer Atmosphäre und für die kritische und ausführliche Durchsicht dieser Arbeit. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen diverser Abstracts, Förderanträge, Vorträge und Poster.

Prof. Dr. Uwe Drescher (MRC Centre for Developmental Neurobiology, King`s College London) danke ich recht herzlich für den zur Verfügung gestellten EphA3-Antikörper.

Vielen Dank an die ehemaligen Doktoranden Anne von Philipsborn und Christoph Gebhardt, die mir die Eingliederung in die „retinotektale“ Arbeitsgruppe und das Themengebiet wirklich leicht gemacht haben.

Dankeschön an Michael Bachmann für die Aufnahmen der SIM-Bilder.

Einen herzlichen Dank an meine Bürokollegen/innen Markus, Mica, Tatjana, Raphael und Heiny - für stets sehr intelligente und tiefgreifende Gesprächsthemen ;-). Es war stellenweise schwer, schlechte Laune zu haben...

Dankeschön an alle Mitarbeiter des Zoologischen Instituts für eine wirklich tolle Arbeitsatmosphäre. Ohne die stets freundlichen Begegnungen und Gespräche wäre diese Arbeit so sicherlich nicht entstanden.

Ein ganz persönlicher Dank geht an meine Familie. Danke an meine Frau Corinna, meine Eltern, meinen Bruder Thomas und meine Schwägerin Sandra, die mich stets moralisch unterstützten, wenn - wie so oft - mal wieder gar nichts funktionierte.



# INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG .....	VII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>- 1 -</b>
1.1 Mechanismen der axonalen Lenkung .....	- 1 -
1.2 Axonale Lenkung durch Ephrine und Eph-Rezeptoren.....	- 4 -
1.3 Die retinotektale Projektion.....	- 7 -
1.4 Adaptation im retinotektalen System.....	- 11 -
1.5 Fragestellung und Herangehensweise .....	- 13 -
1.5.1 Fragestellung.....	- 13 -
1.5.2 Herangehensweise .....	- 14 -
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>2.1 Materialien.....</b>	<b>- 18 -</b>
2.1.1 Chemikalien.....	- 18 -
2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen .....	- 19 -
2.1.3 Proteine und Enzyme .....	- 21 -
2.1.4 Antikörper und Färbesubstanzen .....	- 22 -
2.1.5 Versuchstiere .....	- 22 -
2.1.6 Zelllinien.....	- 23 -
2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	- 23 -
2.1.8 Geräte und Software .....	- 24 -
<b>2.2 Methodik.....</b>	<b>- 26 -</b>
2.2.1 Reinigung der Deckgläser.....	- 26 -
2.2.2 Reinigung der Silizium-Master.....	- 26 -
2.2.3 Oberflächenbeschichtung von Deckgläsern mit Laminin.....	- 26 -
2.2.4 Clustern der Ephrin-Konstrukte.....	- 27 -
2.2.5 Herstellung mikrostrukturierter Ephrin-A5-Substrate .....	- 27 -
2.2.6 Charakterisierung der Adaptationssubstrate .....	- 28 -
2.2.7 Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen des Hühnchens.....	- 29 -
2.2.8 Fixierung und Phalloidin-Färbung an retinalen Ganglienzellen.....	- 30 -
2.2.9 Der Kollaps-Assay.....	- 30 -
2.2.10 Der Streifen-Assay.....	- 31 -
2.2.11 Isolierung von EphA3 aus retinalen Wachstumskegeln .....	- 31 -
2.2.12 Lyse von Retina-Zellen.....	- 32 -
2.2.13 SDS-PAGE und Western Blot.....	- 32 -
2.2.14 Immunhistochemische Färbung des EphA3-Rezeptors .....	- 33 -

2.2.15	Quantitative Auswertung von Fluoreszenzintensitäten.....	34 -
2.2.16	Versuche mit Dynasore zur Inhibition der Endocytose .....	35 -
2.2.17	Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Endocytose von Transferrin .....	35 -
2.2.18	Versuche mit Anisomycin zur Inhibition der lokalen Proteinsynthese.....	36 -
2.2.19	Versuche mit Pervanadat zur Inhibition zellulärer Tyrosin-Phosphatasen .....	37 -
2.2.20	Quantitative Auswertung des Axonwachstums .....	39 -
2.2.21	Statistische Datenanalyse.....	40 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Desensitivierung retinaler Wachstumskegel gegenüber gelöstem Ephrin-A5.....</b>	<b>43 -</b>
3.1.1	Ephrin-A5-vermittelter Kollaps retinaler Wachstumskegel .....	43 -
3.1.2	Desensitivierung nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps .....	45 -
3.1.3	Kontrollexperiment zur Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5.....	47 -
<b>3.2</b>	<b>Biochemischer Ansatz zur Untersuchung des EphA3-Rezeptorgehaltes retinaler Wachstumskegel.....</b>	<b>50 -</b>
<b>3.3</b>	<b>Immunhistochemische Färbung des EphA3-Rezeptors an Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen des Hühnchens.....</b>	<b>52 -</b>
3.3.1	Vergleich zwischen oberflächenständiger und intrazellulärer Lokalisation des Rezeptors .....	52 -
3.3.2	Analyse der Rezeptorverteilung mittels hochauflösender Mikroskopie .....	54 -
3.3.3	Quantitative Analyse des Rezeptorgehaltes von retinalen Wachstumskegeln.....	57 -
<b>3.4</b>	<b>Analyse des EphA3-Rezeptorgehaltes von retinalen Wachstumskegeln während des Wachstums auf Adaptationssubstraten.....</b>	<b>59 -</b>
<b>3.5</b>	<b>Kontrollfärbungen zur Überprüfung der Spezifität des EphA3-Antikörpers .....</b>	<b>62 -</b>
3.5.1	Kontrollfärbung ohne Primärantikörper .....	62 -
3.5.2	Anfärbung nicht-neuronaler Zellen.....	64 -
3.5.3	Färbung mit einem Antikörper gegen neuronales $\beta$ 3-Tubulin (Tuj).....	65 -
<b>3.6</b>	<b>Einfluss der Endocytose auf die Adaptation retinaler Wachstumskegel.....</b>	<b>69 -</b>
3.6.1	Endocytose bei der Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 .....	69 -
3.6.2	Endocytose bei der Adaptation gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.....	72 -
3.6.3	Untersuchung der Funktionalität des Inhibitors Dynasore .....	75 -
<b>3.7</b>	<b>Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Adaptation retinaler Wachstumskegel.....</b>	<b>78 -</b>
3.7.1	Lokale Proteinsynthese bei der Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 ..	78 -
3.7.2	Lokale Proteinsynthese bei der Desensitivierung gegenüber Substrat- gebundenem Ephrin-A5 .....	80 -
<b>3.8</b>	<b>Einfluss der Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen auf die Desensitivierung retinaler Wachstumskegel .....</b>	<b>81 -</b>
3.8.1	Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 .....	81 -

3.8.2	Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf die Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5 .....	86 -
3.8.3	Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf das Verhalten retinaler Axone im Streifenassay mit Ephrin-A2.....	89 -
3.8.4	Kontrollexperiment zur Funktionsweise des Inhibitors Pervanadat .....	91 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>94 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Adaptation während der axonalen Lenkung von retinalen Ganglienzellen .....</b>	<b>94 -</b>
<b>4.2</b>	<b>Verwendete <i>in vitro</i>-Systeme zur Untersuchung des Adaptationsverhaltens .....</b>	<b>96 -</b>
<b>4.3</b>	<b>Die Dynamik des EphA3-Rezeptors bei der Adaptation retinaler Wachstumskegel gegenüber Ephrin-A5.....</b>	<b>100 -</b>
4.3.1	Biochemische Untersuchung des EphA3-Rezeptorgehalts.....	100 -
4.3.2	Immunhistochemische Untersuchung des EphA3-Rezeptorgehaltes.....	102 -
<b>4.4</b>	<b>Der molekulare Mechanismus der Adaptation von retinalen Wachstumskegeln gegenüber Ephrin-A5 .....</b>	<b>107 -</b>
4.4.1	Einfluss der Endocytose auf die Adaptation gegenüber Ephrin-A5 .....	107 -
4.4.2	Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Adaptation gegenüber Ephrin-A5..	111 -
4.4.3	Einfluss der Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen auf die Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5.....	113 -
<b>5</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>120 -</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>124 -</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>135 -</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>135 -</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>136 -</b>
	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>137 -</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1.	Der neuronale Wachstumskegel. ....	- 2 -
Abb. 1-2.	Mechanismen der axonalen Lenkung. ....	- 3 -
Abb. 1-3.	Axonale Lenkung durch gradiert verteilte Signale. ....	- 4 -
Abb. 1-4.	Molekularer Aufbau der Ephrine und Eph-Rezeptoren. ....	- 5 -
Abb. 1-5.	Ephrin-A- und EphA-Gradienten in der Retina und im Tektum.....	- 9 -
Abb. 1-6.	Adaptation in Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Mustern. ....	- 12 -
Abb. 1-7.	Hühnerembryo am 6. Entwicklungstag.....	- 15 -
Abb. 1-8.	Molekülstruktur der verwendeten Inhibitoren. ....	- 16 -
Abb. 2-1.	Schematische Darstellung der verwendeten Adaptationssubstrate. ....	- 29 -
Abb. 2-2.	Beurteilung des Axonwachstums.....	- 40 -
Abb. 3-1.	Ephrin-A5-vermittelter Kollaps retinaler Wachstumskegel.....	- 44 -
Abb. 3-2.	Desensitivierung temporaler Wachstumskegel gegenüber gelöstem Ephrin-A5. ....	- 46 -
Abb. 3-3.	Kontrollexperiment zur Stabilität von gelöstem Ephrin-A5/Fc. ....	- 47 -
Abb. 3-4.	Isolierung von EphA3 aus Hühnchen-Retinae.....	- 51 -
Abb. 3-5.	Immunhistochemische Färbung des EphA3-Rezeptors an retinalen Wachstumskegeln....	- 53 -
Abb. 3-6.	Untersuchung der EphA3-Färbung mittels hochauflösender SIM-Mikroskopie. ....	- 55 -
Abb. 3-7.	Lokalisation von EphA3 und Mikrotubuli in retinalen Wachstumskegeln.....	- 56 -
Abb. 3-8.	Analyse des EphA3-Rezeptorgehaltes von temporalen und nasalen Wachstumskegeln. ..	- 58 -
Abb. 3-9.	EphA3-Rezeptorgehalt von retinalen Wachstumskegeln während des Wachstums auf Adaptationssubstraten.....	- 61 -
Abb. 3-10.	Kontrollversuch zur EphA3-Antikörperfärbung ohne Primärantikörper .....	- 63 -
Abb. 3-11.	EphA3-Färbung an nicht-neuronalen Zellen.....	- 65 -
Abb. 3-12.	Kontrollfärbung mit einem Antikörper gegen neuronales $\beta$ 3-Tubulin (Tuj). ....	- 66 -
Abb. 3-13.	Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf den Ephrin-A5-vermittelten Kollaps. ....	- 70 -
Abb. 3-14.	Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5.....	- 71 -
Abb. 3-15.	Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf die initiale Reaktion und das Auswachsverhalten gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.....	- 73 -
Abb. 3-16.	Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf die Resensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5. ....	- 75 -
Abb. 3-17.	Transferrin-Assay zur Untersuchung der Funktionalität des Inhibitors Dynasore.....	- 76 -
Abb. 3-18.	Quantitative Auswertung des Transferrin-Assays. ....	- 77 -
Abb. 3-19.	Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf den initialen Kollaps und die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5. ....	- 79 -

Abb. 3-20. Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.....	- 81 -
Abb. 3-21. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf den initialen Kollaps und die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5.....	- 83 -
Abb. 3-22. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf das Axonwachstum in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5.....	- 85 -
Abb. 3-23. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf das Axonwachstum auf Substrat-gebundenem Ephrin-A5-Mustern.....	- 86 -
Abb. 3-24. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf die Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.....	- 88 -
Abb. 3-25. Verhalten retinaler Axone in Streifenassays mit Ephrin-A2 nach Zugabe des Inhibitors Pervanadat.....	- 90 -
Abb. 3-26. Kontrollexperiment zur Wirkungsweise des Phosphatase-Inhibitors Pervanadat.....	- 92 -
Abb. 4-1. Retinaler Goldfisch-Wachstumskegel nach Fixierung mit 2 % Glutaraldehyd.....	- 105 -

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 2-1. Verwendete Chemikalien.....	- 18 -
Tab. 2-2. Verwendete Proteine und Enzyme.....	- 21 -
Tab. 2-3. Verwendete Antikörper und Färbesubstanzen.....	- 22 -
Tab. 2-4. Benötigte Verbrauchsmaterialien.....	- 23 -
Tab. 2-5. Statistische Datenauswertung.....	- 40 -
Tab. 3-1. Bewertung des Axonwachstums in Anwesenheit von Pervanadat.....	- 87 -



## ZUSAMMENFASSUNG

Neuronale Wachstumskegel werden durch attraktive und repulsive Signale gelenkt. Im retinotektalen System bewirken gradiert verteilte Ephrine und Eph-Rezeptoren den Aufbau einer topografischen, d.h. nachbarschaftstreuen, Projektion. *In vitro*-Versuche mithilfe von elaborierten mikrostrukturierten Substraten zeigen, dass retinale Wachstumskegel gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal Ephrin-A5 desensitivieren und resensitivieren können. Diese Eigenschaft erscheint jedoch kontraintuitiv, da die Zielfindung im Tektum auf einer zuverlässigen Bestimmung absoluter Konzentrationen beruht.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein einfacherer Assay entwickelt, mit dem die Desensitivierung untersucht werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 0,25 µg/ml Ephrin-A5 ins Kulturmedium topografisch differenziell einen Kollaps bei temporalen, jedoch nicht bei nasalen Wachstumskegeln auslöst. Die kollabierten Wachstumskegel nehmen trotz der Gegenwart des repulsiven Signals das Wachstum wieder auf und zeigen nach 120 min eine intakte Morphologie. Da die Wachstumskegel auf absolute Konzentrationen und nicht nur auf Konzentrationsänderungen reagieren, ist dieses Verhalten als Desensitivierung zu werten.

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der molekularen Adaptationsmechanismen. Mithilfe der oben genannten Kollaps-Assays und Substrat-gebundenen Ephrin-Mustern wurde die Adaptation gegenüber Ephrin-A5 untersucht. Ein naheliegender Adaptationsmechanismus beruht auf der Modulation des Rezeptorlevels in der Wachstumskegelmembran. Immunhistochemische Färbungen konnten jedoch keine Veränderung der Oberflächenkonzentration an EphA3-Rezeptoren während der Adaptation nachweisen. Versuche mit dem Endocytose-Inhibitor Dynasore unterstützen diese Ergebnisse: die Clathrin-vermittelte Endocytose von Eph-Rezeptoren ist an der Adaptation gegenüber Ephrin-A5 nicht beteiligt.

Auch die lokale Proteinsynthese im Wachstumskegel übt keinen Einfluss auf die genannten Phänomene aus. Nach einer Behandlung mit Anisomycin sind retinale Wachstumskegel nach wie vor in der Lage, gegenüber dem Ephrin-Signal zu adaptieren.

Experimente mit dem Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Peroxovanadat zeigen, dass die Modulation der Ephrin-A5-Signalkaskade an der Adaptation beteiligt ist. Die Behandlung mit dem Inhibitor verhindert die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach dem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps und das Wachstum auf hohen Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Konzentrationen. Die Ergebnisse zeigen sowohl einen Einfluss des Inhibitors auf das primäre Ephrin-A5-Signal, als auch einen Einfluss auf die adaptive Modulation des Signals. Adaptation ist demzufolge ein integraler Bestandteil der Signaltransduktion der Lenkungsinformation bei der Ausbildung der topografischen Projektion.



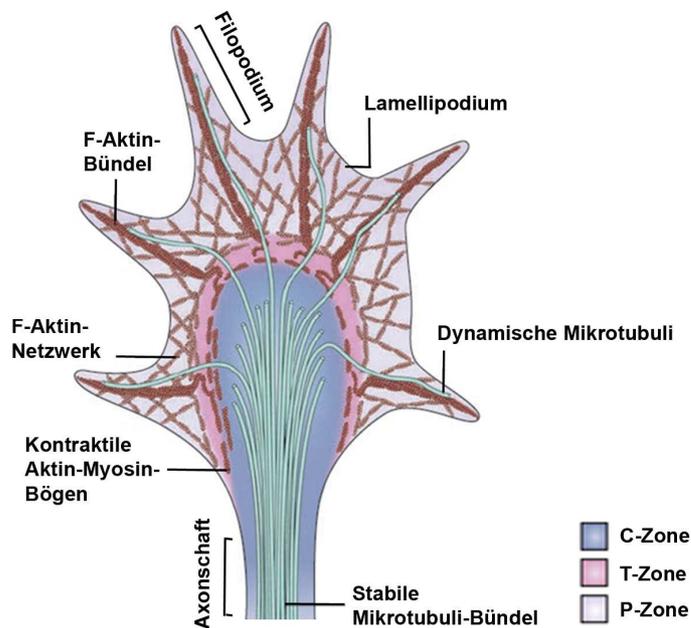
# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Mechanismen der axonalen Lenkung

Ein funktionierendes Nervensystem setzt hoch spezifische Verbindungen zwischen Neuronen voraus. Diese Verbindungen gewährleisten die sensorische Signalübertragung ins Gehirn, die Signalverarbeitung in verschiedenen Hirnarealen und die Übermittlung motorischer Befehle in die Peripherie. Eine außergewöhnliche Eigenschaft des embryonalen Nervensystems ist in diesem Zusammenhang seine Fähigkeit zur Selbstorganisation. Während der Entwicklung wird die Verschaltung der Neurone durch einen Prozess aufgebaut, der als „axonale Lenkung“ bezeichnet wird. Aus dem Zellkörper einer Nervenzelle wächst ein Axon aus, das an seiner Spitze einen sog. Wachstumskegel trägt. Der Wachstumskegel ist eine autonome und bewegliche Struktur, die über Rezeptoren in der Zellmembran mit ihrer Umwelt kommuniziert und auf attraktive und repulsive Lenkungsmoleküle reagieren kann.

Der Wachstumskegel besteht aus drei Bereichen, die sich durch den individuellen Aufbau des Cytoskeletts unterscheiden. Die periphere Zone (P-Zone) besteht aus langen Bündeln filamentösen Aktins (F-Aktin), die die sog. Filopodien ausbilden. Die Filopodien sind durch Membranbereiche voneinander getrennt, die als Lamellipodien bezeichnet werden und in denen F-Aktin in Form eines dichten Netzwerks angeordnet ist. Die zentrale Zone (C-Zone) des Wachstumskegels enthält hauptsächlich stabile Mikrotubulibündel, die sich aus dem Axonschaft bis in den Wachstumskegel fortsetzen. Zwischen der C- und der P-Zone befindet sich eine Übergangszone (T-Zone). In dieser sind kontraktile Aktin-Myosin-Filamente senkrecht zu den peripheren Aktinbündeln angeordnet (Abb. 1.1). Die Bewegung eines Wachstumskegels erfolgt über die Polymerisation und Depolymerisation des F-Aktins in den Filopodien und Lamellipodien. Dynamische Mikrotubuli, die sich vereinzelt in die P-Zone hinein fortsetzen, stabilisieren eingeschlagene Bewegungsrichtungen um das fortgesetzte Wachstum in diese Richtung zu gewährleisten. Die kontraktile Aktin-Myosin-Bögen regulieren die Mikrotubulidynamik und sind an der Aufrechterhaltung einer stabilen C-Zone beteiligt (Burnette *et al.*, 2008; Schaefer *et al.*, 2008). Während des gerichteten Wachstums interagieren F-Aktin und

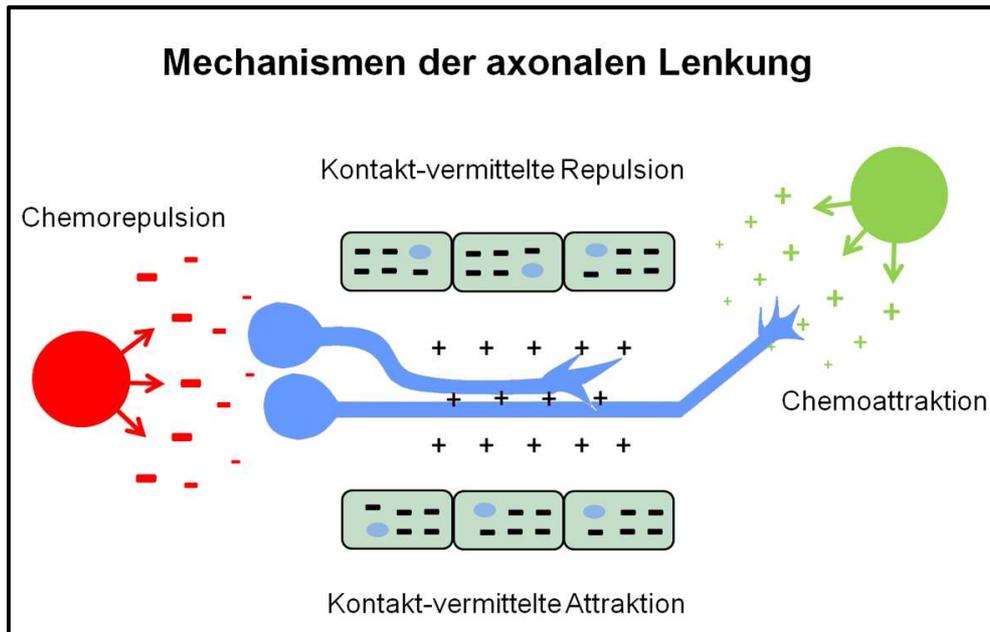
Mikrotubuli verstärkt sowohl miteinander als auch mit Cytoskelett-bindenden Proteinen (Zhou und Cohan, 2004; Kalil und Dent, 2005).



**Abb. 1-1. Der neuronale Wachstumskegel.**

Schematische Darstellung eines neuronalen Wachstumskegels. F-Aktin-Bündel bilden Filopodien aus, mit deren Hilfe der Wachstumskegel die Umgebung sondiert. Dazwischen befinden sich Lamellipodien in denen Aktinfasern in Form eines dichten Netzwerks angeordnet sind. Die Bewegung in eine bestimmte Richtung oder der Rückzug erfolgen über die Polymerisation bzw. Depolymerisation der Aktinfilamente. Dynamische Mikrotubuli helfen dabei, eine eingeschlagen Bewegungsrichtung zu stabilisieren. Kontraktile Aktin-Myosin-Bögen regulieren die Mikrotubuli-Dynamik. Abbildung modifiziert nach: Lowery und Van Vactor, 2009.

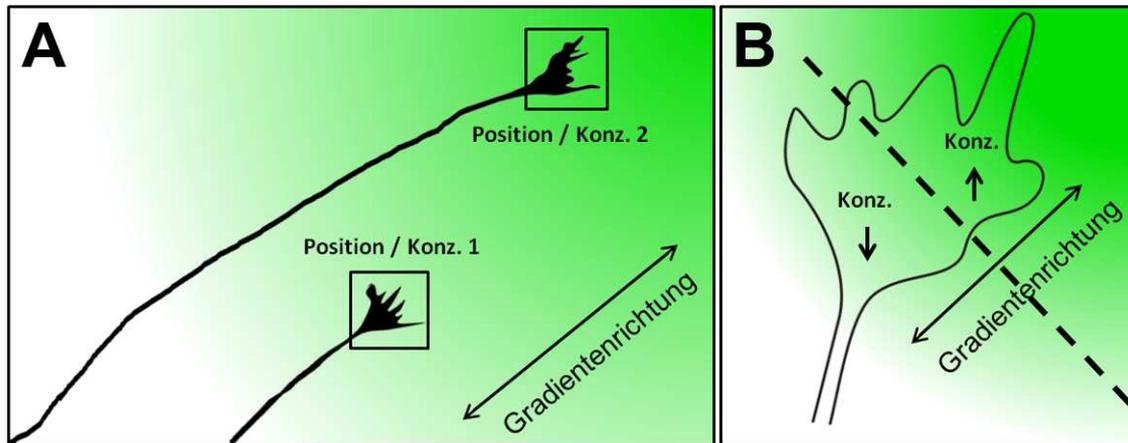
Auf dem Weg zur Zielzelle werden Wachstumskegel durch attraktive und repulsive Signale gelenkt. Diese Lenkungssignale binden an Rezeptoren in der Wachstumskegelmembran und initiieren Signalkaskaden, die letztendlich Veränderungen am Cytoskelett hervorrufen (Dickson, 2002; Erskine und Herrera, 2007). Dadurch wird die Polymerisationsdynamik der Aktinfasern verändert und entweder ein Wachstum in Richtung des Signals (attraktive Signale) oder ein Rückzug (repulsive Signale) ermöglicht. Axonale Lenkungssignale können in verschiedenen Formen auftreten: Sie werden entweder sekretiert, verteilen sich durch Diffusion und wirken aus der Lösung (Chemoattraktion, Chemorepulsion) oder sind an Komponenten der extrazellulären Matrix bzw. an Zellmembranen verankert (kontakt-vermittelte Attraktion, kontakt-vermittelte Repulsion). Sind Lenkungsmoleküle an Axonmembranen gebunden, kann dies Axon-Axon-Wechselwirkungen, wie beispielsweise eine Faszikulation, hervorrufen und schließlich die Ausbildung eines Nervs nach sich ziehen. Abb. 1-2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Lenkungsmechanismen.



**Abb. 1-2. Mechanismen der axonalen Lenkung.**

Bei der Lenkung von neuronalen Wachstumskegeln spielen vier Mechanismen eine Rolle: Chemorepulsion, Chemoattraktion, kontakt-vermittelte Repulsion und kontakt-vermittelte Attraktion. Wachstumskegel können durch sekretierte Lenkungssignale von einer Quelle abgestoßen (Chemorepulsion, dargestellt in rot), und von einer anderen Quelle angezogen (Chemoattraktion, dargestellt in grün) werden. Moleküle, die an Zellen der Umgebung oder an anderen Axonen verankert sind, leiten die Axone entlang bestimmter Bahnen zur Zielzelle (kontakt-vermittelte Attraktion, kontakt-vermittelte Repulsion). Das Zusammenwirken der vier Mechanismen gewährleistet die korrekte Lenkung. Abbildung modifiziert nach: Tessier-Lavigne und Goodman, 1996.

Eine Form der axonalen Lenkung, die über lange Strecken wirken kann, ist die Lenkung durch gradiert verteilte Signale. Derartige Signalverteilungen entstehen, indem sekretierte Morphogene von einer Quelle wegdiffundieren und die Konzentration des Morphogens mit der Entfernung abnimmt. Sie binden an Zelloberflächenrezeptoren und lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, was zu einer konzentrationsabhängigen Veränderung der Genexpression, z.B. von membranständigen Lenkungsmolekülen, führt. Auf diese Weise werden Diffusionsgradienten von Morphogenen in Gradienten membranverankerter Lenkungsmoleküle umgesetzt (Shigetani *et al.*, 1997; Sansom und Livesey; 2009). Solche Gradienten übermitteln sowohl positionale als auch direktionale Informationen (Abb. 1-3). Durch das Auslesen absoluter Konzentrationen wird die aktuelle Position im Gradient bestimmt. Der Konzentrationsvergleich über die Länge eines Wachstumskegels legt hingegen eine Richtung fest. Je nachdem, ob es sich um den Gradienten eines attraktiven oder repulsiven Moleküls handelt, erfolgt das Wachstum in Richtung der höheren oder der niedrigeren Konzentration.



**Abb. 1-3. Axonale Lenkung durch gradiert verteilte Signale.**

Konzentrationsgradienten axonaler Lenkungsmoleküle übermitteln sowohl positionale (A) als auch direktionale (B) Information. Das Auslesen absoluter Konzentrationen (Konz.) ermöglicht die Bestimmung der aktuellen Position im Gradient (A). Der Konzentrationsvergleich über die Länge des Wachstumskegels legt eine Richtung fest (B). Somit ist eine Unterscheidung zwischen höherer und niedrigerer Konzentration möglich und damit ein gerichtetes Wachstum zur Quelle hin oder von der Quelle weg.

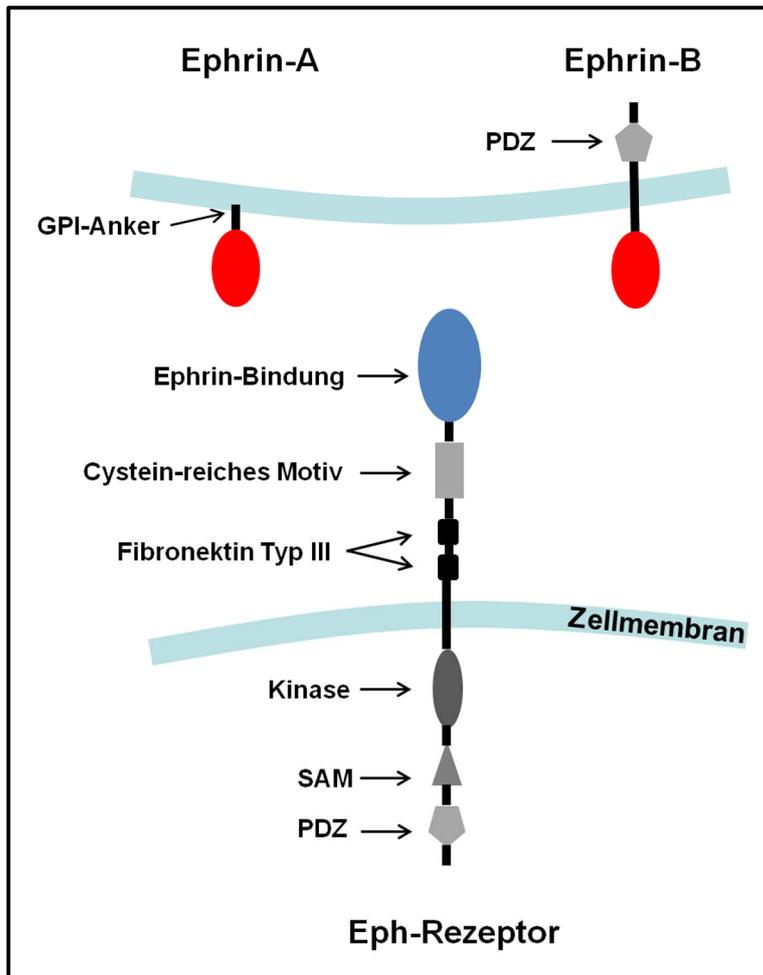
## 1.2 Axonale Lenkung durch Ephrine und Eph-Rezeptoren

Proteine der Netrin-, Slit-, Semaphorin- und Ephrin-Familie bilden die vier Hauptklassen axonaler Lenkungssignale (Dickson, 2002; Guan und Rao, 2003). In der vorliegenden Arbeit wird die Reaktion neuronaler Wachstumskegel gegenüber Ephrinen untersucht, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Ephrine werden anhand ihres molekularen Aufbaus in zwei Klassen eingeteilt. Ephrin-A-Moleküle sind durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker an der Zell- oder Wachstumskegelmembran verankert. Ephrin-B-Moleküle besitzen eine Transmembran-Domäne sowie eine kurze cytoplasmatische Domäne mit einem PDZ-Bindemotiv (PDZ: *PSD95/Disc large/Zona occludens-1*) (Abb. 1-4). Bisher sind sechs Vertreter der Klasse A und drei Vertreter der Klasse B bekannt.

Ephrine binden an Eph-Rezeptoren. Diese Rezeptorklasse wurde 1987 bei der Suche nach Rezeptortyrosin-Kinasen identifiziert, die möglicherweise eine Rolle bei der Krebsentwicklung spielen (Hirai *et al.*, 1987). Ihren Namen *Erythropoietin-Producing Hepatocellular carcinoma* verdanken sie der Zelllinie, aus der ihre cDNA isoliert wurde. Es sind zehn verschiedene EphA- und sechs EphB-Rezeptoren bekannt. Die Zuordnung erfolgt einerseits durch Sequenzhomologien und andererseits durch die bevorzugte Bindung an Ephrin-A- oder Ephrin-

B-Moleküle. Eph-Rezeptoren bestehen im extrazellulären Bereich aus einer globulären, N-terminalen Ephrin-Bindedomäne, einem Cystein-reichen Motiv sowie zwei Fibronectin Typ III-Sequenzwiederholungen. Daran schließen sich die Transmembrandomäne, eine Kinase-Domäne, ein *sterile  $\alpha$ -motif* (SAM) und ein PDZ-bindendes Motiv an (Pasquale, 2005). Abbildung 1-4 zeigt schematische Darstellungen des molekularen Aufbaus der Ephrine und Eph-Rezeptoren.



**Abb. 1-4. Molekularer Aufbau der Ephrine und Eph-Rezeptoren.**

Während Ephrin-A-Moleküle durch einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden sind, besitzen Ephrin-B-Moleküle eine Transmembrandomäne und einen kurzen cytoplasmatischen Anteil. Eph-Rezeptoren enthalten eine Ephrin-Bindedomäne, ein Cystein-reiches Motiv und zwei Fibronectin Typ III-Sequenzwiederholungen im extrazellulären Bereich. Daran schließt sich die Transmembrandomäne an, gefolgt von einer Kinase-Domäne, einer SAM-Domäne und einem PDZ-Motiv. GPI, Glycosylphosphatidylinositol; SAM, *sterile  $\alpha$ -motif*; PDZ, *PSD95/Disc large/Zona occludens-1*)

Ephrin-A-Moleküle binden an EphA-Rezeptoren und Ephrin-B-Moleküle an EphB-Rezeptoren. Jeder Vertreter der A-Familie (Ephrin-A1-6) kann, mit unterschiedlicher Affinität, an alle EphA-Rezeptoren (EphA1-10) binden. Gleiches gilt für die Vertreter der Ephrin-B- und EphB-Familie. Eine Bindung von A-Ephrinen an EphB-Rezeptoren ist für Ephrin-A5 bekannt, das den EphB2-Rezeptor erkennt. Darüberhinaus kann EphA4 an Ephrin-B2 und Ephrin-B3 binden (Gale *et al.*, 1996; Himanen *et al.*, 2004).

Eph-Rezeptoren gehören zur Klasse der Rezeptortyrosin-Kinasen. Die Ephrin-Bindung an den zugehörigen Rezeptor führt zunächst zur Dimerisierung der Rezeptoren. Durch die

Dimerisierung nähern sich die katalytischen intrazellulären Domänen einander an und phosphorylieren sich gegenseitig an Tyrosin-Resten. An die phosphorylierten Tyrosine binden cytoplasmatische Adapterproteine, die das Signal weiterleiten und GTPasen der Rho-Familie aktivieren oder inaktivieren (Wahl *et al.*, 2000; Noren und Pasquale, 2004; Sahin *et al.*, 2005). Diese Moleküle üben einen Einfluss auf das Cytoskelett aus, indem sie beispielsweise die Polymerisationsdynamik der Aktin- oder Mikrotubulifasern verändern. An die Rezeptor-Dimerisierung schließt sich die laterale Assoziation weiterer aktivierter Rezeptoren und damit die Bildung eines Clusters an (Himanen *et al.*, 2007; Himanen *et al.*, 2010). Die Größe der Cluster kann den Bereich des eigentlichen Zell-Zell-Kontakts übersteigen (Wimmer-Kleikamp *et al.*, 2004). Da die Initiation der Ephrin-Eph-Signaltransduktion im Wesentlichen von der Rezeptor-Dimerisierung abhängt, werden gelöste Ephrine *in vitro* stets in dimerisierter oder geclusteter Form angeboten (Davis *et al.*, 1994; Egea *et al.*, 2005).

Eine besondere Eigenschaft der Ephrin/Eph-Familie ist die bidirektionale Signalweiterleitung. Kommt es zum Kontakt zwischen einer Ephrin-exprimierenden und einer Eph-Rezeptor-exprimierenden Zelle, so kann ein Signal in beide Richtungen übermittelt werden. Die Signalweiterleitung über die Rezeptortyrosinkinase-Aktivität der Rezeptoren wird als *forward signaling* bezeichnet. Beim *reverse signaling* wird ein Signal in die Ephrin-exprimierende Zelle geleitet. Im Falle der Ephrin-B-Moleküle erfolgt dies über die Tyrosin-Phosphorylierung der intrazellulären Domäne und die Signalweiterleitung durch Adapterproteine. Ephrin-A-Moleküle hingegen besitzen keine Transmembrandomäne und auch keinen cytoplasmatischen Anteil. Die Signalübertragung erfolgt daher über Co-Rezeptoren. Die Neutrophin-Rezeptoren p75<sup>NTR</sup> und TrkB wurden als mögliche Co-Rezeptoren identifiziert (Lim *et al.*, 2008; Marler *et al.*, 2008). In den meisten Fällen führt die Bindung von Ephrinen an Eph-Rezeptoren zu einem repulsiven Signal. Zellen, die Eph-Rezeptoren exprimieren, vermeiden den Kontakt zu Ephrin-exprimierenden Zellen und umgekehrt. Dieses Verhalten setzt voraus, dass der initiale, Eph/Ephrin-vermittelte Zell-Zell-Kontakt aufgelöst werden muss. Bei B-Ephrinen und EphB-Rezeptoren erfolgt dies über eine bidirektionale Endocytose des gesamten Eph-Ephrin-Komplexes. Dieser Vorgang entfernt Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden aus der Zellmembran, sodass sich die interagierenden Zellen voneinander trennen können (Marston *et al.*, 2003; Zimmer *et al.*, 2003). Ephrin-A/EphA-Komplexe werden aufgelöst, indem das gebundene Ephrin-A durch die membranständigen Metalloprotease ADAM10 proteolytisch gespalten wird (Hattori *et al.*, 2000; Janes *et al.*, 2005).

Ephrine und Eph-Rezeptoren erfüllen vielfältige Aufgaben während der Entwicklung und im adulten Organismus. Sie spielen beispielsweise bei der Angiogenese (Zhang und Hughes, 2006), der Zellmigration (Poliakov *et al.*, 2004) oder der Abgrenzung von Keimblättern in der

frühen Embryonalentwicklung (Rohani *et al.*, 2011) eine Rolle. Auch die Metastasierung von Krebszellen wird stark durch Eph/Ephrin-Signale beeinflusst (Kandouz, 2012). Im Nervensystem sind sie an der Ausbildung dendritischer Fortsätze, der Kommunikation zwischen Neuronen und Gliazellen und an der Regulation der synaptischen Plastizität beteiligt, um nur wenige Beispiele zu nennen (Yamaguchi und Pasquale, 2004). Darüber hinaus spielen sie eine Rolle bei der Entwicklung des olfaktorischen Systems (Mombaerts, 2006) und der Ausbildung auditorischer Regelkreise (Cramer, 2005).

Eine entscheidende Funktion kommt den Ephrinen und Eph-Rezeptoren bei der axonalen Lenkung während der Ausbildung der retinotektalen, bzw. retinocolliculären Projektion zu. Auf diesen Aspekt wird im folgenden Kapitel eingegangen.

### **1.3 Die retinotektale Projektion**

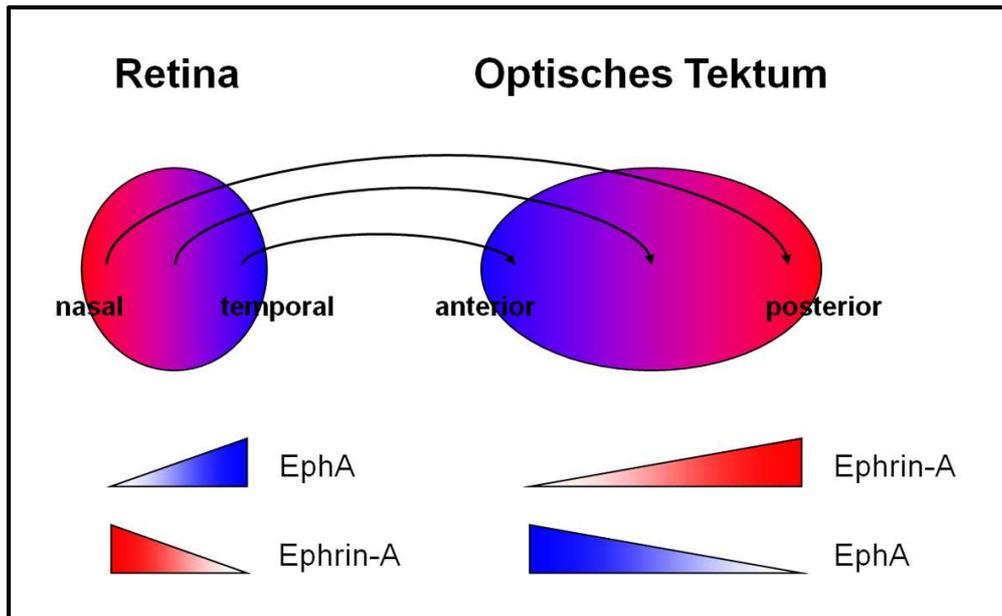
Als retinotektale oder retinocolliculäre Projektion bezeichnet man die Axon-Verbindung der Wirbeltier-Retina mit den primären visuellen Zentren des Gehirns. Axone retinaler Ganglienzellen (RGCs) verlassen das Auge am optischen Nervaustritt. Bei niederen Wirbeltieren und Vögeln kreuzen sich die Axone beider Retinae am *Chiasma opticum* und wachsen in die jeweils kontralateral liegenden Gehirnbereiche. Das Sehzentrum wird bei diesen Tieren *Tectum opticum* genannt. Eine besondere Eigenschaft der retinotektalen Verbindung ist die topografische Organisation. Das bedeutet, dass die Ortsbeziehungen der RGCs in Form ihrer Axon-Verknüpfungen im Tektum beibehalten werden. Diese Eigenschaft gewährleistet eine korrekte Repräsentation von Objekten im Gehirn. Die entlang der temporal-nasal-Achse der Retina liegenden RGCs werden entlang der anterior-posterior-Achse des Tektums verknüpft. Temporale RGCs entsenden Axone ins anteriore Tektum, nasale RGCs terminieren hingegen im posterioren Tektum. Die retinale dorso-ventrale Achse wird entlang der tektalen latero-medial-Achse abgebildet. Dorsal liegende RGCs projizieren ins laterale Tektum, ventral liegende RGCs ins mediale Tektum.

Die Entwicklung der retinotektalen bzw. retinocolliculären Projektion ist u.a. im Zebrafisch (*Danio rerio*), dem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), dem Haushuhn (*Gallus Gallus*) und der Maus (*Mus musculus*) untersucht worden (McLaughlin und O'Leary, 2005). Im Zebrafisch (Kaethner und Stürmer, 1992) und im Krallenfrosch (Harris *et al.*, 1987) wachsen Axone retinaler Ganglienzellen direkt zur korrekten Terminationszone und bilden dort Verzweigungen aus. In der Maus wachsen die Axone zunächst weit über ihren Projektionsort hinaus. An der

eigentlichen Terminationszone bilden sich zu einem späteren Zeitpunkt Verzweigungen am Axonschaft aus. Der Teil des Axons, der über die Terminationszone hinausgewachsen ist, wird abgebaut (Simon und O`Leary, 1992). Im Hühnchen entwickelt sich die retinotektale Projektion durch eine Kombination beider Mechanismen (Nakamura und O`Leary, 1989; Yates *et al.*, 2001).

Roger Sperry postulierte bereits im Jahr 1963, dass topografische Projektionen durch gradierte Verteilungen von Lenkungsmolekülen und deren Rezeptoren entstehen (Chemoaffinitätshypothese, Sperry, 1963). Erste Moleküle, die im retinotektalen System für eine Lenkung in Frage kamen, konnten 1995 in den Arbeitsgruppen von Friedrich Bonhoeffer (Ephrin-A5, frühere Bezeichnung: RAGS) und John Flanagan (Ephrin-A2, frühere Bezeichnung: ELF-1) identifiziert werden (Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.*, 1995). Diese Moleküle zeigen *in vitro* repulsive Eigenschaften: Werden retinale Axone mit gelöstem Ephrin-A5 konfrontiert, führt die Behandlung zu einem Kollaps der Wachstumskegel (Wahl *et al.*, 2000). Im sog. Streifenassay vermeiden temporale Axone das Wachstum auf posterioren tektalen Membranen bzw. auf Substrat-gebundenen Ephrin-Streifen (Walter *et al.*, 1987; Hornberger *et al.*, 1999). *In vivo* bilden Ephrin-A2 und Ephrin-A5 von anterior nach posterior ansteigende Gradienten im Tektum (Abb. 1-5). Die zugehörigen EphA-Rezeptoren werden in einem von nasal nach temporal ansteigenden Gradienten in der Retina exprimiert. Diese Verteilung könnte erklären, warum nasale RGC-Axone im Ephrin-A-reichen posterioren Tektum terminieren und temporale Axone im Ephrin-A-armen anterioren Tektum.

Die beschriebene Verteilung der Ephrine und Eph-Rezeptoren ist jedoch unvollständig. Ephrin-A-Moleküle werden nicht nur im Tektum exprimiert, sondern auch in einem von temporal nach nasal ansteigenden Gradienten in der Retina (Hornberger *et al.*, 1999). Ebenso liegen im Tektum zusätzlich Eph-Rezeptoren in einem von posterior nach anterior ansteigenden Gradienten vor (Connor *et al.*, 1998; Abb. 1-5). Auch diese Gradienten leisten einen Beitrag zum Aufbau retinotektaler Verbindungen. Durch ein repulsives *reverse signaling* zwischen tektalen Eph-Rezeptoren und axonalen Ephrinen werden nasale Axone ins posteriore Tektum gelenkt (Rashid *et al.*, 2005). Knock-out- und Überexpressionsstudien, in denen die Expression der Ephrine oder Eph-Rezeptoren verändert wurde, zeigen veränderte retinotektale, bzw. retinocolliculäre Projektionen (Nakamoto *et al.*, 1996; Frisén *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2000; Feldheim *et al.*, 2000; Feldheim *et al.*, 2004).



**Abb. 1-5. Ephrin-A- und EphA-Gradienten in der Retina und im Tektum.**

Die entlang der temporal-nasal-Achse der Retina liegenden RGCs werden entlang der anterior-posterior-Achse des Tektums verknüpft. Sowohl in der Retina als auch im Tektum werden Ephrins und EphAs in Form von Gegengradienten exprimiert. Die Ephrin-A-Konzentration steigt in der Retina von temporal nach nasal, und im Tektum von anterior nach posterior an (dargestellt in rot). Die EphA-Konzentration steigt in der Retina von nasal nach temporal, und im Tektum von posterior nach anterior an (dargestellt in blau). Diese Gradienten sind wesentlich an der Ausbildung der topografischen Projektion beteiligt. Temporale Wachstumskegel, die hohe Mengen an Eph-Rezeptoren exprimieren, terminieren im Ephrin-A-armen anterioren Tektum. Nasale Wachstumskegel, die geringe Rezeptormengen exprimieren, hingegen im Ephrin-A-reichen posterioren Tektum.

Die Coexpression von Ephrinen und Eph-Rezeptoren in der Retina ermöglicht einerseits Wechselwirkungen zwischen projizierenden Neuronen und andererseits die Interaktion von Ephrinen und Eph-Rezeptoren in derselben Membran (*cis*-Interaktion). Der Einfluss von Axon-Axon-Wechselwirkungen beim Aufbau der retinotektalen Projektion ist hinreichend belegt (Brown *et al.*, 2000; Reber *et al.*, 2004). Ebenso existieren Hinweise auf eine *cis*-Interaktion der Bindungspartner und deren Bedeutung für den Aufbau der Projektion: Die Ephrin-A-Überexpression in temporalen Axonen reduziert deren Sensitivität gegenüber externem Ephrin-A *in vitro* und *in vivo*. Die enzymatische Abspaltung der nasalen Ephrin-A-Moleküle führt hingegen zur Erhöhung der Sensitivität (Dütting *et al.*, 1999; Hornberger *et al.*, 1999). Wie genau die *cis*-Interaktion allerdings wirkt, ist nicht im Detail aufgeklärt: Experimente an nicht-neuronalen Zellen zeigen eine *cis*-Interaktion, die die *trans*-Aktivierung der EphA-Rezeptoren verhindert (Yin *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006). Diese Experimente führten zu einer Modellvorstellung, in der retinales Ephrin-A den Rezeptorgradient verschärft, in dem es die Konzentration an funktionellem Rezeptor verringert. Gebhardt *et al.*, 2012 schlagen hingegen einen Mechanismus vor, in dem die interagierenden *cis*-Bindungspartner als funktionelle

Lenkungsrezeptoren fungieren und sich ein repulsives *forward* und ein attraktives *reverse signaling* ausbalancieren.

An der Ausbildung der topografischen Projektion entlang der dorso-ventralen, bzw. latero-medialen Achse ist das Ephrin-B/EphB-System beteiligt. Allerdings ist dieser Prozess nur teilweise verstanden. Hindges *et al.*, 2002 postulierten, dass ein tektaler, von lateral nach medial ansteigender Ephrin-B1-Gradient im Hühnchen und der Maus attraktiv auf die Seitenastausbildung ventraler RGCs wirkt. Diese Axonpopulation exprimiert aufgrund eines von dorsal nach ventral ansteigenden Rezeptorgradienten große Mengen an EphB-Rezeptoren. Sehr hohe Ephrin-B1-Konzentrationen werden jedoch von axonalen Seitenästen gemieden (McLaughlin *et al.*, 2003) und lösen *in vitro* einen Kollaps bei retinalen *Xenopus*-Axonen aus (Mann *et al.*, 2003). Das zeigt, dass Ephrin-B1 nicht nur attraktiv, sondern im gleichen System auch repulsiv, d.h. bifunktionell, wirkt. Die konzentrationsabhängige Attraktion bzw. Repulsion soll eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung der Projektion spielen.

Die Rolle des Ephrin/Eph-System bei der Ausbildung der retinotektalen Projektion ist unumstritten und anerkannt. Allerdings sind Ephrine und deren Rezeptoren nicht die einzigen Moleküle, die an der retinotektalen Lenkung beteiligt sind. Die Bindung des Neurotrophins BDNF an seinen Rezeptor TrkB wirkt bei retinalen *Xenopus*-Axonen an der Ausbildung terminaler Verzweigungen im Zielgebiet mit (Cohen-Cory und Fraser, 1995; Alsina *et al.*, 2001). Ebenso nimmt eine extrazelluläre Funktion des Transkriptionsfaktors Engrailed (En) eine zentrale Rolle ein. Während der frühen Mittelhirnentwicklung werden En1 und En2 in von anterior nach posterior ansteigenden Gradienten exprimiert (Hemmati-Brivanlou *et al.*, 1991; Wurst *et al.*, 1994). Brunet *et al.*, 2005 konnten eine repulsive Wirkung von En-2 auf temporale, und eine attraktive Wirkung auf nasale *Xenopus*-Axone nachweisen. Werden En1 oder En2 an ektopischen Stellen im Tektum exprimiert, vermeiden temporale Axone diese Bereiche während nasale Axone dort gezielt terminieren (Friedman und O'Leary, 1996; Itasaki und Nakamura, 1996). Darüber hinaus führt die Inkubation mit einem neutralisierenden En-Antikörper zu einer veränderten Projektion entlang der antero-posterioren Achse und zu einem Verlust der repulsiven Aktivität posteriorer tektaler Membranen *in vitro* (Wizenmann *et al.*, 2009). Entlang der dorso-ventralen Achse scheint neben dem Ephrin-B/EphB-System ein von lateral nach medial ansteigender und repulsiv wirkender Wnt3-Gradient beteiligt zu sein. Der zugehörige Rezeptor Ryk wird in der Retina in einem von dorsal nach ventral ansteigenden Gradienten exprimiert (Schmitt *et al.*, 2006).

## 1.4 Adaptation im retinotektalen System

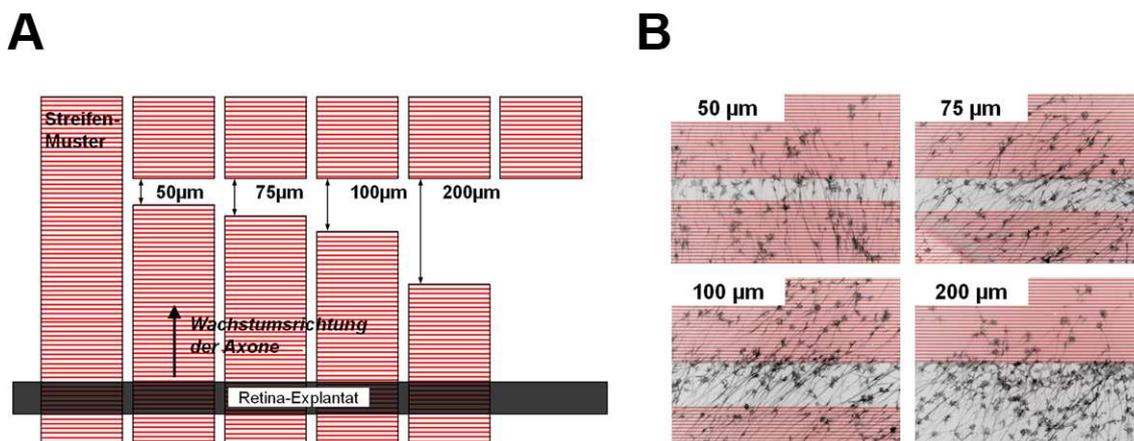
Adaptation kann als „Veränderung der Antwort auf ein definiertes Signal in Abhängigkeit der Signalstatistik“ definiert werden (Borst *et al.*, 2005). Signalstatistik bezeichnet in diesem Zusammenhang räumliche oder zeitliche Mittelwerte eines veränderlichen Signals. Adaptation ist ein allgemeines Phänomen und tritt in verschiedenen Systemen auf. Bei der Navigation von Zellen zur Quelle oder Senke von chemotaktisch aktiven Gradienten scheinen Adaptationsvorgänge sinnvoll. Die Zellen bewegen sich relativ zu einem extrazellulären Gradienten und sind wechselnden Konzentrationen des Signals ausgesetzt. Veränderungen der Sensitivität, um die Signaländerungen an verschiedenen Positionen im Gradienten effizient auslesen zu können und sich daraufhin zur Quelle hin oder von der Quelle weg zu bewegen, sind daher plausibel. Bei der bakteriellen Chemotaxis ist diese Form der Adaptation verbreitet (Koshland, 1980; Alon *et al.*, 1999)

Auch während der axonalen Lenkung sind Adaptationsmechanismen nachgewiesen worden. Ming *et al.*, 2002 konnten zeigen, dass Wachstumskegel von Rückenmarksneuronen aus *Xenopus* gegenüber den Lenkungssignalen Netrin-1 und BDNF desensitivieren und resensitivieren. Auch retinale *Xenopus*-Axone desensitivieren und resensitivieren gegenüber den Lenkungssignalen Netrin-1 und Sema3A (Piper *et al.*, 2005).

Im retinotektalen System scheint das Phänomen der Adaptation nicht mit der Ausbildung einer topografischen Projektion vereinbar zu sein. Das System aus Ephrin- und Eph-Gegengradienten bewirkt hier nicht die stetige Migration zu höheren oder niedrigen Proteinkonzentrationen, sondern legt einen für jeden Wachstumskegel spezifischen Projektionsort im Tektum fest. Es ist nicht klar, wie Wachstumskegel quantitative Proteinkonzentrationen auslesen und ihr exaktes Zielgebiet finden können, wenn sie die Sensitivität gegenüber den dafür nötigen Molekülen verändern. Dennoch existieren Hinweise auf adaptive Prozesse im retinotektalen System: Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen halten an spezifischen Positionen in Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Gradienten an. Wenn sie bereits vor dem Einwachsen in den Gradienten Kontakt zum repulsiven Signal hatten, ist die Stopp-Position im Gradienten in Richtung höherer Ephrin-Konzentrationen verschoben (Rosentreter *et al.*, 1998).

Anne von Philipsborn untersuchte das Phänomen der Adaptation bei retinalen Ganglienzellen des Hühnchens gezielt mithilfe Substrat-gebundener Muster (von Philipsborn, 2007). Sie nutzte die Methode des Microcontact Printing ( $\mu$ CP) (von Philipsborn *et al.*, 2006a), um das repulsive Lenkungssignal Ephrin-A5 in definierter geometrischer Anordnung auf einer Oberfläche zu verankern. Wachsen temporale Axone auf einer Laminin-Oberfläche aus und treffen initial auf

das gestempelte Muster, bilden sie eine Stoppfront vor dem Muster aus. Werden temporale Retina-Explantate hingegen auf dem Muster ausgelegt, so zeigt sich, dass die Axone auf den hohen Ephrin-A5-Konzentrationen wachsen können, wenn sie unmittelbar nach Verlassen des Explantats damit konfrontiert werden. Axone, die auf den Ephrin-A5-Mustern wachsen, zeigen zwei interessante Eigenschaften: Zum einen reagieren sie nicht mehr auf die Zugabe von gelöstem Ephrin-A5, das normalerweise einen Kollaps der Wachstumskegel auslöst (von Philipsborn, 2007). Zum anderen überwachen die Axone eine Front aus Ephrin-A5, die sich nach einer 50-75  $\mu\text{m}$  breiten Lücke im Muster befindet (Abb. 1-6). Dieses Verhalten belegt eine Desensitivierung gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal. Bei zunehmender Lückenbreite tritt eine Resensitivierung ein. Dies äußert sich in einer Stoppreaktion an der Oberkante der Lücke (von Philipsborn, 2007; Abb. 1-6). Ein zusätzlicher Hinweis auf adaptive Verhaltensweisen ergibt sich aus folgendem Sachverhalt: Temporale Axone, die normalerweise hoch sensitiv gegenüber dem repulsiven Ephrin-A5-Signal sind, wachsen in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5 aus einem Explantat aus und zeigen keine Reaktion auf Substratgebundene Ephrin-A5-Muster mehr (von Philipsborn *et al.*, 2006b; von Philipsborn, 2007).



**Abb. 1-6. Adaptation in Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Mustern.**

Temporale Axone wachsen auf Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Mustern aus, wenn sie unmittelbar nach dem Verlassen des Explantats mit dem repulsiven Signal konfrontiert werden. Sie überwachen darüberhinaus Ephrin-A5-Fronten, die sich nach 50-75  $\mu\text{m}$  breiten Lücken im Muster befinden. Dieses Verhalten belegt eine Desensitivierung gegenüber dem Ephrin-Signal. Bei zunehmender Lückenbreite tritt eine Resensitivierung in der Lücke ein. Dies zeigt sich an Stoppreaktionen nach dem Überqueren von 100  $\mu\text{m}$ - und 200  $\mu\text{m}$  breiten Lücken. (A) Schematische Darstellung der gestempelten Ephrin-A5-Muster und der Positionierung der Retina-Explantate während des Versuchs. (B) Darstellung von temporalen Axonen beim Überqueren verschieden breiter Lücken. Die Phalloidin gefärbten Axone sind in schwarz dargestellt, das gestempelte Ephrin-A5 in rot. Abbildung modifiziert nach: von Philipsborn, 2007.

Die von Anne von Philipsborn beobachteten Phänomene zeigen, dass die Adaptation auch im retinotektalen System auftritt. Über die genauen Mechanismen, die einer De- und

Resensitivierung gegenüber Ephrin-A5 zugrunde liegen, ist allerdings noch nichts bekannt. Sie sind Thema dieser Arbeit.

## 1.5 Fragestellung und Herangehensweise

### 1.5.1 Fragestellung

Die in Abschnitt 1.4 beschriebenen Sachverhalte zeigen, dass topografisch organisierte Axone die Fähigkeit zur Adaptation gegenüber Faktoren besitzen, die entscheidend am Aufbau der Projektion beteiligt sind. Über die molekularen Mechanismen, die an diesen Vorgängen beteiligt sind, ist allerdings noch nichts bekannt. Die Untersuchung dieser Mechanismen ist das zentrale Thema dieser Arbeit.

Es sind mehrere Adaptationsmechanismen vorstellbar. Bei der Desensitivierung, d.h. beispielsweise während des Axonwachstums auf Substrat-gebundenen Ephrin-Mustern, muss dem repulsiven Ephrin-A5-Signal entweder entgegengewirkt werden, oder es muss durch einen bestimmten Mechanismus vollständig blockiert sein. Dies könnte z.B. auf folgende Weisen geschehen:

- (1) Die Eph-Rezeptoren werden aus der Wachstumskegelmembran entfernt. Damit stehen keine Rezeptoren mehr für die Übertragung des repulsiven Signals zur Verfügung. Ein entsprechender Mechanismus ist z.B. an der Desensitivierung gegenüber Netrin-1 und Sema3A beteiligt und wird über die Clathrin-vermittelte Endocytose reguliert (Piper *et al.*, 2005).
- (2) Die Menge an Eph-Rezeptoren in der Wachstumskegelmembran verändert sich nicht, stattdessen werden die Rezeptoren inaktiviert. An einem solchen Mechanismus könnte z.B. die Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor Typ O (PTPRO) beteiligt sein. Shintani *et al.*, 2006 konnten zeigen, dass diese Phosphatase EphA-Rezeptoren in retinalen Hühnerwachstumskegeln dephosphoryliert und damit inaktiviert. Eine weitere Möglichkeit der Rezeptor-Inaktivierung bestünde in der Neusynthese von Ephrin-A-Liganden. Eine *cis*-Interaktion von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden verhindert die *trans*-Aktivierung der Eph-Rezeptoren und damit die Übertragung des Signals.

Der an der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 beteiligte Mechanismus wird in Gegenwart hoher Ephrin-A5-Konzentrationen an- und während der Resensitivierung in 100  $\mu\text{m}$ - und

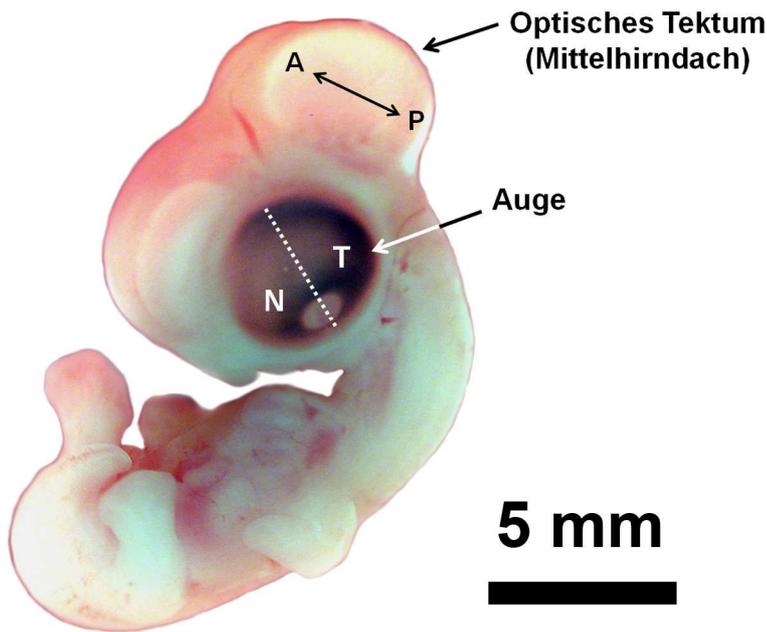
200 µm breiten Lücken abgeschaltet. Eine Resensitivierung könnte sich beispielsweise durch folgende Mechanismen ereignen:

- (1) Eph-Rezeptoren werden verstärkt in die Wachstumskegelmembran eingebaut. Entweder durch Neusynthese von Rezeptormolekülen oder durch Recycling von zuvor endocytierten Rezeptoren. Die Resensitivierung von retinalen *Xenopus*-Wachstumskegeln gegenüber Netrin-1 und Sema3A geht beispielsweise einher mit dem Membraneinbau derer Rezeptoren DCC und Neuropilin-1 (Piper *et al.*, 2005).
- (2) Umwandlung von inaktiven in aktive Eph-Rezeptoren. Dies könnte beispielsweise durch die Inaktivierung der PTPRO oder anderer Phosphatasen geschehen, die möglicherweise an der Inaktivierung der Eph-Rezeptoren beteiligt sind. Ebenso wäre eine Endocytose von coexprimierten Ephrin-A-Liganden denkbar. Dies würde die *cis*-Interaktion zwischen Rezeptoren und Liganden und damit eine Rezeptorinaktivierung verhindern.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Hypothesen experimentell zu überprüfen und so die zellulären Mechanismen zu untersuchen, die der Desensitivierung und der Resensitivierung von retinalen Ganglienzellen gegenüber Ephrin-A5 zugrunde liegen. Die Mechanismen spielen möglicherweise beim Einwachsen ins optische Tektum eine entscheidende Rolle und leisten daher einen wertvollen Beitrag zum korrekten Aufbau der retinotektalen Projektion. Da die retinotektale Projektion als Modell für die Ausbildung weiterer topografischer Projektionen herangezogen wird, können die Erkenntnisse beispielsweise Hinweise auf die Entwicklung des auditorischen oder des somatosensorischen Systems geben, die ebenfalls topografisch organisiert sind.

### 1.5.2 Herangehensweise

Die Mechanismen der Desensitivierung und Resensitivierung von retinalen Ganglienzellen gegenüber Ephrinen werden am Modellsystem des Hühnchens (*Gallus gallus domesticus*) untersucht. Am 6. Embryonaltag (Hamburger-Hamilton-Stadium 29) beginnen Axone retinaler Ganglienzellen mit der Ausbildung von Verknüpfungen im Zielgebiet (Thanos und Mey, 2001). Das Auge und das optische Tektum sind in diesem Stadium bereits sehr prominent ausgeprägt und erreichen Größen von mehreren Millimetern (Abb. 1-7). Retinale Ganglienzellen lassen sich daher leicht explantieren und kultivieren.



**Abb. 1-7. Hühnerembryo am 6. Entwicklungstag.**

Die Abbildung zeigt einen sechs Tage alten Hühnerembryo. Zur Präparation retinaler Ganglienzellen wurden in der vorliegenden Arbeit sechs bis sieben Tage alte Embryonen verwendet. Beschriftet sind die für die Ausbildung der retinotektalen Projektion wichtigen Strukturen und deren Orientierung. A, anterior; P, posterior; N, nasal; T, temporal

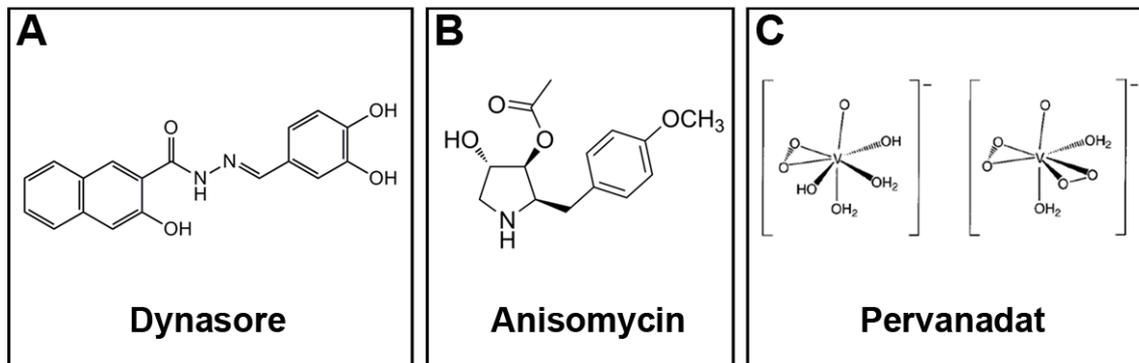
Die bisher von Anne von Philipsborn erzielten Ergebnisse zur Adaptation gegenüber Ephrin-A5 wurden anhand Substrat-gebundener Muster erhalten. In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob sich die Hinweise zur Adaptation auch gegenüber gelöstem Ephrin-A5 bestätigen lassen. Da Ephrin-A5 *in vivo* Membran-gebunden vorliegt, entspricht die Verankerung des Moleküls an einer Oberfläche zwar eher der biologischen Realität, jedoch sind Experimente mit dem gelösten Lenkungssignal einfacher durchzuführen und weitaus weniger zeitaufwändig. Daher werden in der vorliegenden Arbeit stets beide Formen untersucht. Auch unterstützen sich die Ergebnisse möglicherweise gegenseitig, was wiederum die Gesamtaussage festigt.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem molekularen Mechanismus der Adaptation von retinalen Wachstumskegeln. Dabei wird das Augenmerk zunächst auf eine eventuelle Modulation des Rezeptorlevels in der Wachstumskegelmembran gelegt. Dieser Mechanismus ist bereits am Modellsystem *Xenopus laevis* als zentraler Bestandteil der Adaptation gegenüber Netrin-1 und Sema3A identifiziert worden (Piper *et al.*, 2005). Die Untersuchung erfolgt sowohl auf biochemischem Weg als auch mittels immunhistochemischer Färbungen. Durch Isolierung und Nachweis des EphA3-Rezeptors mittels Immunoblots soll überprüft werden, ob sich der Rezeptorgehalt im desensitivierten und unbeeinflussten Zustand unterscheidet. Das gleiche Ziel wird durch immunhistochemische Rezeptorfärbungen und die anschließende quantitative Ausmessung der Immunfluoreszenz verfolgt.

Zur Untersuchung der zellulären Mechanismen werden zusätzlich Experimente mit pharmakologischen Inhibitoren durchgeführt. Dabei wird vorangig mit den Inhibitoren

Dynasore, Anisomycin (AIM) und Peroxovanadat (Pervanadat) gearbeitet (Abb. 1-8). Diese inhibieren essenzielle Signalwege, die möglicherweise bei der Desensitivierung oder der Resensitivierung eine Rolle spielen. Verändert sich nach der Inhibitor-Zugabe das Adaptationsverhalten der Wachstumskegel, so kann davon ausgegangen werden, dass der betreffende Mechanismus am untersuchten Phänomen beteiligt ist.

Das Membran-permeable Molekül *3-Hydroxynaphtalen-2-carboxylsäure (3,4-dihydroxybenzyliden)hydrazid* (Dynasore) wird zur Hemmung der Clathrin-vermittelten Endocytose eingesetzt. Es blockiert spezifisch und nicht-kompetitiv die Aktivität der kleinen GTPasen Dynamin1 und Dynamin2, die für die Abschnürung von endocytotischen Vesikeln verantwortlich sind (Macia *et al.*, 2006).



**Abb. 1-8. Molekülstruktur der verwendeten Inhibitoren.**

(A) 3-Hydroxynaphtalen-2-carboxylsäure (3,4-dihydroxybenzyliden)hydrazid (Dynasore) zur nicht-kompetitiven Hemmung der Clathrin-vermittelten Endocytose. Der Inhibitor blockiert die Aktivität der kleinen GTPasen Dynamin1 und Dynamin2, die für die Abschnürung der endocytotischen Vesikel notwendig sind. (B) Anisomycin, das zur Inhibition der lokalen Proteinsynthese im Wachstumskegel eingesetzt wird, hemmt reversibel die für die Ausbildung von Peptidbindungen notwendige Peptidyltransferase. (C) Pervanadat zur Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Es existieren verschiedene Komplexe, die sich durch die Inkubation von Vanadaten und Wasserstoffperoxid bilden. In der Abbildung ist die Monoperoxo- und die Diperoxo-Form gezeigt. Abbildung (c) aus Huyer *et al.*, 1997.

AIM (u.a. bekannt als Flagecidin) ist ein auch als Antibiotikum eingesetzter Proteinsynthese-Inhibitor. Das Pyrrolidin-Derivat hemmt die für die Ausbildung von Peptidbindungen notwendige Peptidyltransferase reversibel und unterdrückt in einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  die lokale Proteinsynthese im Wachstumskegel (Piper *et al.*, 2005; Piper *et al.*, 2006).

Pervanadat oder Peroxovanadat ist die Bezeichnung für Komplexe aus Vanadaten und Wasserstoffperoxid. Es inhibiert Protein-Tyrosin-Phosphatasen irreversibel durch die Oxidation des katalytischen Cysteins im aktiven Zentrum (Huyer *et al.*, 1997). Spielt die

Dephosphorylierung der Eph-Rezeptoren eine Rolle bei der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5, so können retinale Axone nach Inhibition der Phosphatasen nicht mehr gegenüber dem Lenkungssignal desensitivieren.

Zur Untersuchung des Adaptationsverhaltens werden sowohl Kollaps-Assay-Experimente (Cox *et al.*, 1990; Raper und Kapfhammer, 1990) als auch mittels  $\mu$ CP hergestellte, Substratgebundene Ephrin-A5-Muster eingesetzt (von Philipsborn *et al.*, 2006a; von Philipsborn, 2007).

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Tab. 2-1. Verwendete Chemikalien

Name	Details	Bezugsquelle
Aceton	≥ 99,8 % p.a. (v/v)	Carl Roth
Acrylamid/Bisacrylamid	Rotiphorese 37,5:1	Carl Roth
Ammoniak (NH <sub>3</sub> )	≥ 25 % p.a. (v/v)	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	≥ 99,8 % (w/w)	GE Healthcare
Anisomycin (AIM)	20 mM in DMSO	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	1 % in PBS (w/v)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	keine Angaben	Riedel-de Haën
Complete Mini Protease Inhibitor	1 Tablette in 1,5 ml ddH <sub>2</sub> O lösen	Roche
Chicken Serum (CS)	keine Angaben	Gibco Life Technologies
Dimethylsulfoxid (DMSO)	keine Angaben	Sigma-Aldrich
Dynasore	100 mM in DMSO	Tocris Bioscience
Ethanol (EtOH)	≥ 99 % p.a. (v/v)	Carl Roth
F12 Nutrient Mixture (Ham)	keine Angaben	Invitrogen
Fötale Kälber Serum (FCS)	keine Angaben	Dianova
L-Glutamin	200 mM	Gibco Life Technologies
Glutaraldehyd (GA)	25 % in ddH <sub>2</sub> O (v/v)	AppliChem
Glycerin	≥ 86 % p.a. (v/v)	Carl Roth
Glycin	keine Angaben	Carl Roth
HALT Protease Inhibitor	100 x	Thermo Scientific
HEPES	keine Angaben	Carl Roth
Magermilchpulver	keine Angaben	Fluka
β-Mercaptoethanol	99 % p.a. (v/v)	Carl Roth

**Tab. 2-1.** Verwendete Chemikalien (Fortsetzung)

<b>Name</b>	<b>Details</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Methanol (MeOH)	keine Angaben	Carl Roth
Monodansylcadaverin (MDC)	10 mM in DMSO	Sigma-Aldrich
Methylcellulose (MZ)	keine Angaben	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	keine Angaben	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	keine Angaben	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	keine Angaben	Carl Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	1 N, 10 N	Carl Roth
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	100 mM in ddH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
n- Propylgallat	1 Spatelspitze auf 10 ml Mowiol	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	4 % in PBS (w/v)	Merck
Penicillin-Streptomycin	Penicillin: 10.000 U/ml Streptomycin: 10 mg/ml	Invitrogen
Polydimethylsiloxan (PDMS)	Sylgard 184	Dow Corning
D-Saccharose	≥ 95 % p.a. (w/w)	Carl Roth
Salzsäure (HCl)	≥ 25 % p.a. (v/v)	Carl Roth
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	≥ 95 % p.a. (v/v)	Carl Roth
Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Reinheit 5.0	Linde Gas
Tetramethylen-ethylendiamin (TEMED)	keine Angaben	Carl Roth
Tris-Base	keine Angaben	Carl Roth
Triton X-100	keine Angaben	Sigma-Aldrich
Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	zweifach destilliert	TKA MicroLab
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	30 %, stabilisiert (v/v)	Carl Roth

## 2.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

### Blot-Puffer

50 mM Tris, pH 8,3; 0,1 % SDS (w/v); 20 % MeOH (v/v)

### Blockierungslösung für PVDF-Membranen

5 % Magermilchpulver in TBS (w/v)

### **Einbettmittel (Mowiol)**

16,67 % Mowiol (w/v) (Calbiochem); 33,3 % Glycerin (v/v), 0,1 % Thimerosal (v/v);  
1 Spatelspitze n-Propylgallat; in PBS; pH 8-8,5

### **Elektrodenpuffer für die SDS-PAGE (10x)**

0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (w/v); pH 8,3

### **F12-Kulturmedium (F12-KM)**

1 x F12 Nutrient Mixture; 1,176 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 10 % FCS (v/v); 2 % CS (v/v); 10 U/ml  
Penicillin/Streptomycin; 2 mM L-Glutamin

### **F12-MZ-Kulturmedium (F12-MZ)**

1 x F12-KM; 0,4 % Methylzellulose (w/v)

### **Fixierungslösung**

4 % PFA (w/v); 0,33 M D-Saccharose; 0,1 % Glutaraldehyd (v/v); in PBS; pH 7,4

### **Hanks`-Puffer (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)**

8 g/l NaCl; 0,4 g/l KCl; 60 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 60 mg/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 0,35 g/l NaHCO<sub>3</sub>;  
1 g/l Glucose; 7,76 g/l HEPES; 10 mg/l Phenolrot; pH 7,4

### **Ladepuffer für die SDS-PAGE (5x)**

10 % SDS (w/v); 25 % β-Mercaptoethanol (v/v); 25 % Glycerin (v/v); 0,5 %  
Bromphenolblau (w/v)

### **Lyse-Puffer**

RIPA-Puffer (Thermo Scientific); HALT Protease und Phosphatase Inhibitor (1:100); Complete  
Mini Protease Inhibitor (1:7)

### **Peroxovanadat (Pervanadat)-Lösung**

12 mM Natriumorthovanadat; 12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 25 mM HEPES-Puffer, pH 7,4

### **Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>)**

8 g/l NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

**Piranha-Lösung**

50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v); 15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v)

**Sammelgelpuffer für die SDS-PAGE (4x)**

1 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,8 % SDS

**Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)**

50 mM Tris/HCl, pH 7,3; 150 mM NaCl

**Trenngelpuffer für die SDS-PAGE**

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS

**2.1.3 Proteine und Enzyme**

Tab. 2-2. Verwendete Proteine und Enzyme

<b>Protein / Enzym</b>	<b>Organismus</b>	<b>Eingesetzte Konzentration</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ephrin-A2/Fc Chimäre	Maus/Mensch	8 µg/ml in PBS	R&D Systems
Ephrin-A5/Fc Chimäre	Mensch	0,25 µg/ml in F12-MZ	R&D Systems
		8 µg/ml in PBS	
IgG, Fc Fragment	Mensch	0,25 µg/ml in F12-MZ	Calbiochem
		8 µg/ml in PBS	
Katalase	Rind	ca. 500 µg/ml in 25 mM HEPES	Sigma-Aldrich
Laminin	Maus	20 µg/ml in Hanks`-Puffer	Invitrogen
Transferrin-Alexa594	Mensch	20 µg/ml in F12-MZ	Invitrogen

### 2.1.4 Antikörper und Färbesubstanzen

**Tab. 2-3.** Verwendete Antikörper und Färbesubstanzen - Monoklonale (mkl) Antikörper wurden aus der Maus gewonnen, polyklonale (pkl) Antikörper aus dem Kaninchen.

Antigen / Name	Typ / Konjugat	Stamm- lösung	Verdünnung	Bezugsquelle
<b>Primärantikörper</b>				
EphA3	mkl, IgG	keine Angabe	1:2500	Iwamasa <i>et al.</i> , 1999
EphA3 (L-18)	pkl, IgG	0,2 mg/ml	1:200	Santa Cruz
GAPDH	pkl, IgG	1 mg/ml	1:1000	Invitrogen
β3- Tubulin (Tuj)	pkl, IgG	0,3 mg/ml	1:300	Abcam
<b>Sekundärantikörper</b>				
Human IgG	Alexa-594	2 mg/ml	1:80 – 1:200	Molecular Probes
Kaninchen IgG	Alexa-488	1 mg/ml	1:200	Molecular Probes
Kaninchen IgG	HRP	10 mg/ml	1:200	Thermo Scientific
Maus IgG	Cy3	1 mg/ml	1:500	Dianova
Maus IgG	Alexa-488	1 mg/ml	1:200	Invitrogen
<b>Andere Färbesubstanzen</b>				
Phalloidin	Alexa-488	200 U/ml	1:20 – 1:50	Invitrogen
Phalloidin	Alexa-546	200 U/ml	1:20 – 1:50	Invitrogen
Phalloidin	Alexa-647	200 U/ml	1:20	Invitrogen
DAPI		1 mg/ml	1:1000	Sigma-Aldrich

### 2.1.5 Versuchstiere

Zur Durchführung der Experimente mit Axonen retinaler Ganglienzellen werden Retinae aus Hühner-Embryonen präpariert. Die Bruteier (Kreuzung der Hühner-Rassen „Rhode Island Red X“ und „White Rock“, *Gallus gallus domesticus*) werden von der Geflügelzucht Hockenberger in 75031 Eppingen bezogen. Bis zum Gebrauch werden die Eier bei 18 °C gelagert und anschließend in einem Brutschrank (60 % Luftfeuchtigkeit, automatisches Wenden im 6-stündigen Rhythmus) bei 37 °C inkubiert. Zur Präparation der Retinae werden sechs- bis sieben Tage alte Embryonen verwendet.

### 2.1.6 Zelllinien

In dieser Arbeit werden für Kontrollexperimente vier nicht-neuronale, adhärenzte Zelllinien untersucht:

- (1) **A549-Zellen** (*American Type Culture Collection, CCL-185*)

Hierbei handelt es sich um humane Alveolarepithelzellen, die 1972 aus dem Lungenkarzinomgewebe eines männlichen Patienten isoliert wurden (Giard *et al.*, 1973).

- (2) **B16-Zellen** (*American Type Culture Collection, CCL-6323*)

Diese nicht-epithelialen Zellen entstammen dem Hautmelanom einer C57BL/6-Maus (*Mus musculus*). Sie wurden 1954 *in vitro* kultiviert und produzieren Melanin (Fidler und Kripke, 1977).

- (3) **HeLa-Zellen** (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ACC 57)

HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixcarcinoms, die 1951 der 31-jährigen Patientin „Henrietta Lacks“ in Baltimore entnommen wurden.

- (4) **Embryonale Maus-Fibroblasten (MEF)**

Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen wurden am Embryonaltag 9 isoliert und *in vitro* kultiviert. Die Zellen wurden von W. Ziegler (Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung, IZKF, in Leipzig) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2-4.** Benötigte Verbrauchsmaterialien

Art	Bezugsquelle
6-Well-Kulturplatten	Greiner Bio One
Aluminiumoxid-Platten, 10 x 8 cm	Techne AG
Chemolumineszenz-Substrat, Super Signal West Pico	Thermo Scientific
Deckgläser, rund, Ø 18 mm	Thermo Scientific
Fritten zum Festsaugen der Retinae	Werkstadt Uni Jena
Gel-Blot-Filterpapiere	Schleicher & Schuell
Glasplatten, 10 x 8 cm	Amersham

**Tab. 2-4.** Benötigte Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Art	Bezugsquelle
Membranfilter, Cellulose-Mischester, 0,45 µm Porengröße	Whatman
Metallklötzchen, ca. (0,2 x 0,2 x 1) cm	KIT Werkstatt
Mikroliter-Spritze	Hamilton
Objektträger, 76 x 26 mm	Carl Roth
Präparationsbesteck (Dumont-Pinzetten, kleiner Löffel)	Carl Roth, Mercato
Petrischalen, Ø 35 mm, Ø 60 mm, Ø 145 mm	Greiner Bio One
Protein G Sepharose Beads 4 Fast Flow	GE Healthcare
PVDF Blot-Membranen, 0,2 µm Porengröße	PeqLab
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak
Röntgenfilm-Fixierer	Kodak
Silizium-Master mit Mikrostrukturen	IPHT, Uni Jena
Sterilfilter, 0,22 µm Porengröße	Millipore, Whatman
Silikon-Matrizen	AG Bastmeyer, KIT
Zellschaber	Sarstedt

## 2.1.8 Geräte und Software

### Benötigte Geräte

- Analysenwaage Sartorius
- Backofen zum Backen der Deckgläser, 180 °C Binder
- Binokulare, *Stemi 2000* und *Stemi SV 11* Carl Zeiss
- Brutschrank zur Inkubation der Bruteier Grumbach  
*37 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit*
- Brutschrank zur Inkubation retinaler Ganglienzell-Kulturen Binder  
*37 °C, 4 % CO<sub>2</sub>*
- Elektrophorese-Kammer, *Mighty Small SE 245* Hofer
- Elektrophorese Power Supply, *EPS 600* und *EPS 3500* Pharmacia
- Gewebeschnneider, *Tissue Chopper McIlwain* Mickle
- Heizplatten Techne  
*Dri-Block 3*  
*MR 3001 K* Heidolph

- Mikroskope:
  - 1) Durchlicht-Mikroskop mit inverser Optik, *Axiovert 40C* Carl Zeiss
  - 2) Fluoreszenz-Mikroskop mit aufrechter Optik und Kamera:
    - ApoTome Imager Z1* Carl Zeiss
    - AxioCam MRm CCD Farbkamera* Carl Zeiss
  - 3) Hochauflösungs-Mikroskop:
    - Elyra PS.1, Prototyp* Carl Zeiss
    - Andor iXON 897 EM CCD Kamera* Carl Zeiss
- Plasma Cleaner, *Plasma System 100-E* PVA Technics
- Produktschutzwerkbänke BDK, Heraeus
- Thermomixer compact Eppendorf
- TKA Wasseraufbereitungssystem,  
zur Herstellung von deionisiertem Wasser (*ddH2O*) TKA
- Ultraschallgerät, *RK52H* Bandelin
- Vakuumpumpe mit Kühlfalle:
  - Edwards 5, BS 2208* Edwards
  - Unicryo MC 2L-60* UniEquip
- Western-Blot-Apparatur, *Trans-Blot SD, Semi-Dry* Bio-Rad
- Zentrifugen:
  - GPR, Rotor GH 3.7* Beckmann
  - MiniSpin, Rotor F-45-12-11* Eppendorf
  - 5417R, Rotor F-45-30-11* Eppendorf

### Verwendete Analysesoftware

- Bildbearbeitungssoftware:
  - Adobe Photoshop CS2, Version 9.0* Adobe Systems
- Messung von Fluoreszenz-Intensitäten:
  - MetaMorph, 6.2r6* Visitron
- Mikroskop-Software:
  - AxioVision, Rel. 4.8* Carl Zeiss
- Auswertung des Streifenassays und der Western Blot-Banden
  - Image J, Version 1.44p* Wayne Rasband
  - Plugin: JACoP* Fabrice P. Cordelieres,  
Susanne Bolte

- Software zur Darstellung und statistischen Analyse:  
*Office Excel 2003* Microsoft

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Reinigung der Deckgläser

Bevor die Deckgläser zur homogenen Oberflächenbeschichtung mit Laminin oder zur Substrat-Herstellung mittels  $\mu$ CP genutzt werden, erfolgen folgende Reinigungsschritte: Die Deckgläser werden in einer Lösung aus 50 % EtOH und 50 % ddH<sub>2</sub>O für 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend in einer Lösung aus 50 % Aceton und 50 % EtOH über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten in 100 % EtOH für jeweils 30 min werden die Deckgläser unter dem Abzug getrocknet und über Nacht bei 180 °C gebacken.

### 2.2.2 Reinigung der Silizium-Master

Die Mikrostrukturierung von Glasoberflächen erfolgt durch die Lift-off-Variante des  $\mu$ CP (von Philipsborn *et al.*, 2006a). Dabei werden Protein-beschichtete Silikon-Quader auf die Silizium-Master gelegt und anschließend auf ein Deckglas übertragen.

Zur Entfernung von organischen Rückständen werden die Master in Piranha-Lösung bis zur Blasenbildung (ca. 80 °C) erhitzt. Daraufhin werden die Master mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Die Sauberkeit wird mithilfe eines Binokulars überprüft und die Inkubation in Piranha-Lösung bei Bedarf mehrfach wiederholt. Abschließend werden die Master in einer Lösung aus 25 % NH<sub>3</sub>, 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ddH<sub>2</sub>O (im Verhältnis 1:1:5) erneut bis zur Blasenbildung erhitzt, mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und mit Stickstoff getrocknet.

### 2.2.3 Oberflächenbeschichtung von Deckgläsern mit Laminin

Die Beschichtung der Deckgläser erfolgt im „Sandwich-Verfahren.“ Dazu werden auf eine Deckglas-Oberfläche ca. 60  $\mu$ l der Laminin-Lösung (20  $\mu$ g/ml in Hanks`-Puffer) pipettiert und ein zweites Deckglas darüber gelegt. Die Beschichtung erfolgt für eine Stunde bei 37 °C. Anschließend werden die Deckgläser zweimal in Hanks`-Puffer gewaschen und bis zum Auflegen der Retina-Explantate bzw. dem Aussäen der Zellen bei 37 °C in F12-Medium äquilibriert.

### 2.2.4 Clustern der Ephrin-Konstrukte

Voraussetzung für die Aktivierung der transmembranen Eph-Rezeptoren ist die Aggregation, bzw. „Clusterbildung“, der Ephrin-Liganden (Davis *et al.*, 1994). In dieser Arbeit werden rekombinante Ephrin-A5- und Ephrin-A2-Konstrukte verwendet. Das Ephrin-A5-Konstrukt besteht aus den ersten 203 Aminosäuren des humanen Ephrin-A5-Proteins, das Ephrin-A2-Konstrukt aus den Aminosäuren 23-184 des Proteins der Maus. Die jeweiligen Aminosäureanteile sind über eine IEGRMD-Sequenz an das konstante Fragment (Fc) eines humanen IgG-Moleküls gekoppelt. Die Ephrin-Konstrukte liegen als Homodimere vor, indem zwei Monomere über Disulfidbrücken zwischen den Fc-Teilen verbunden sind.

Die Inkubation der Homodimere mit einem  $\alpha$ -human-IgG-Antikörper erlaubt eine höhere Aggregation zu multimeren Clustern. Dafür wird eine Lösung aus 8  $\mu\text{g/ml}$  des jeweiligen Ephrin-Konstrukts und 24  $\mu\text{g/ml}$  eines goat  $\alpha$ -human-Antikörpers (Alexa Fluor594-konjugiert) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (molares Antikörper/Ephrin-Verhältnis ca. 2:1). Anschließend wird bei 4 °C und 1500 g für 10 min abzentrifugiert.

### 2.2.5 Herstellung mikrostrukturierter Ephrin-A5-Substrate

Die definierte Mikrostrukturierung von Deckglas-Oberflächen mit Ephrin-A5/Fc erfolgt durch die Lift-off-Methode des  $\mu\text{CP}$  (von Philipsborn *et al.*, 2006a). Hierzu werden Silizium-Master benötigt, in die das zum späteren Stempel inverse Muster eingätzt ist. Ein Silikon-Quader aus Polydimethylsiloxan (PDMS) wird einheitlich mit der Proteinlösung beschichtet und auf die mikrostrukturierte Oberfläche des Masters gelegt. Die hervorstehenden, nicht geätzten Bereiche des Masters entfernen dabei das Protein vom Silikon-Quader. Der Quader wird daraufhin als Stempel verwendet, um das verbliebene Protein auf eine Glasoberfläche zu übertragen.

#### Herstellung der Silikon-Quader

Zur Herstellung der Silikon-Quader wird Sylgard 184, ein Silikon-Elastomer mittlerer Viskosität, verwendet. Das Grundmaterial und das Härtungsmittel werden im Verhältnis 10:1 (nach Gewicht) gemischt, in eine Petrischale gegossen und anschließend mit Hilfe einer Vakuumpumpe (bei einem Vakuum von ca. 500 mTorr) entgast. Die Polymerisation des Silikons erfolgt entweder über Nacht bei 60 °C oder vier Stunden bei 70 °C.

Mit einem sauberen Skalpell werden kleine Quader (Kantenlänge ca. 1 cm) aus dem polymerisierten Silikon geschnitten und diese auf Verunreinigungen geprüft. Bei Bedarf werden die Würfel mit 100 % EtOH gereinigt.

### **Substratherstellung**

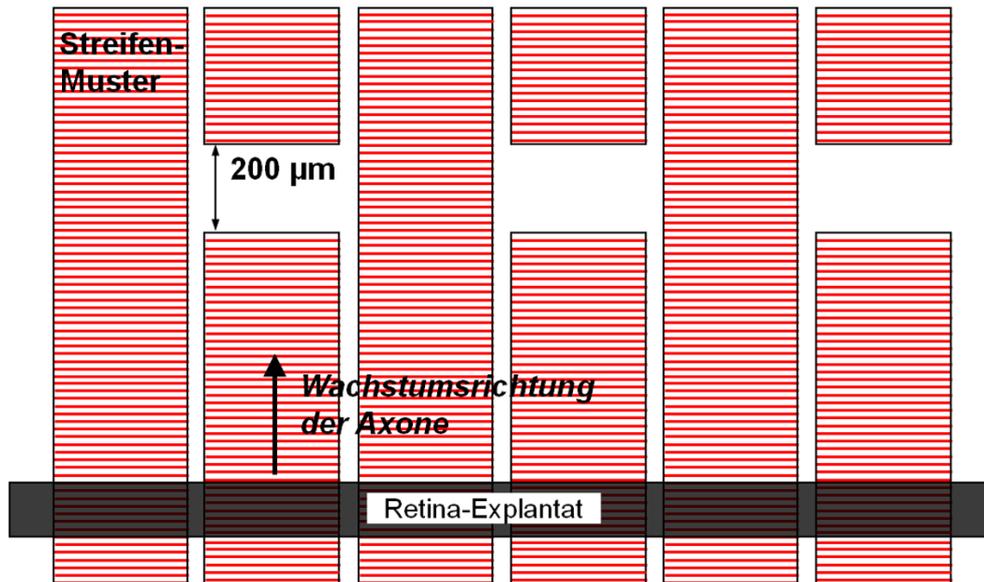
Die Quaderoberfläche, die zuvor dem Boden der Petrischale zugewandt war, wird mit ca. 250  $\mu$ l einer geclusterten Ephrin-A5/Fc-Lösung (8 $\mu$ g/ml) überschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Quader zweimal in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit Stickstoff trockengeblasen. Die Protein-beschichtete Oberfläche des Quaders wird nun vorsichtig auf die Mikrostruktur des Masters gelegt und die Ränder des Masters auf der Rückseite des Silikon-Quaders markiert. Der Quader wird vom Master abgenommen und das Muster auf ein Deckglas übertragen. Die Markierungen auf dem Silikon-Quader werden auf der Rückseite des Deckglases angebracht. Der Quader wird daraufhin vorsichtig vom Deckglas abgenommen, die gestempelte Struktur mit ca. 200  $\mu$ l Laminin-Lösung überschichtet und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach zwei Waschstufen mit Hanks`-Puffer wird das Substrat in F12-Medium äquilibriert und bis zum Auflegen der Retina-Explantate bei 37 °C gelagert.

Die Silizium-Master werden zunächst mehrfach mit einer Mischung aus 50 % EtOH und 50 % ddH<sub>2</sub>O, und anschließend mit 100 % EtOH abgespült. Unmittelbar vor der nächsten Verwendung werden die Master für ca. eine Minute mit einem Sauerstoff-Plasma behandelt (Vakuum von 0,8 torr bei 200 W). Bei zunehmend starken Verunreinigungen erfolgt eine Reinigung in Piranha-Lösung (siehe 2.2.2).

### **2.2.6 Charakterisierung der Adaptationssubstrate**

Um das Adaptationsverhalten von Axonen retinaler Ganglienzellen zu untersuchen, werden Retina-Explantate auf mittels  $\mu$ CP hergestellten Ephrin-A5/Fc-Substraten (sog. „Lückensubstrate“) ausgelegt. Die Substrate wurden von Anne von Philipsborn im Rahmen ihrer Dissertation (2007) entworfen und bestehen aus gestempelten, 2,5  $\mu$ m breiten Ephrin-A5/Fc-Streifen. Dazwischen befinden sich 5  $\mu$ m breite, nicht-gestempelte Bereiche, die mit Laminin überschichtet werden. Somit entsteht ein Muster aus alternierenden Ephrin-A5-Laminin-Streifen. Das Streifen-Muster ist in bestimmten Bereichen durch Lücken unterbrochen, die ebenfalls mit Laminin überschichtet werden (Lückenbreiten: 200  $\mu$ m). Eine schematische Darstellung der verwendeten Substrate sowie der Positionierung der Retina-Explantate ist in Abb. 2-1 gezeigt.

Die Silizium-Master, in die die beschriebenen Muster eingätzt sind, wurden mittels standardisierten Methoden der Fotolithografie vom „Institut für Photonische Technologien“ (IPHT) in Jena hergestellt.



**Abb. 2-1. Schematische Darstellung der verwendeten Adaptationssubstrate.**

Zur Untersuchung des Adaptations- und Resensitivierungsverhaltens werden sog. „Lückensubstrate“ verwendet. Diese bestehen aus alternierend angeordneten, 2,5 µm breiten Ephrin-A5/Fc- und 5 µm breiten Laminin-Streifen. Das Streifenmuster ist durch Lücken der Breite 200 µm unterbrochen. Retinale Explantate werden so auf das Streifenmuster gelegt, dass die Axone auf die Lücken zu wachsen.

### 2.2.7 Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen des Hühnchens

Die Präparation und Kultivierung retinaler Ganglienzellen erfolgt nach Walter *et al.*, 1987 und wird hier nur in Kürze erläutert: Bruteier werden sechs- bis sieben Tage bei 37 °C inkubiert, anschließend mit 70 % EtOH desinfiziert und mit einer groben Pinzette vorsichtig aufgeschlagen. Der Inhalt wird in eine Petrischale ausgegossen und der Embryo mit Hilfe einer groben Pinzette dekapitiert. Der Kopf des Embryos wird in kaltem Hanks`-Puffer überführt, die Augen vorsichtig herausgelöst und möglichst vollständig von Bindegewebe befreit. Die Augen werden mit einer Pinzette entlang der optischen Fissur aufgeschnitten und die Pigmentschicht entfernt. Anschließend werden die Linse und der Glaskörper herausgelöst, die Retina auf einem Nitrocellulose-Filter ausgebreitet und festgesaugt. Mit einem Gewebeschneider wird die Retina entlang der gewünschten Achse in 275 µm bis 300 µm breite Streifen geschnitten und jeweils zwei Streifen auf ein mit Laminin beschichtetes Deckglas gelegt (die retinale Ganglienzellschicht ist dabei dem Deckglas zugewandt). Die Explantatstreifen werden mit zwei Metallklötzchen beschwert und das Deckglas im Anschluss mit ca. 300 µl F12-MZ-Medium überschichtet. Die Kulturen werden, abhängig vom Axonwachstum, 20 bis 48 Stunden bei 37 °C und 4 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Werden Medienwechsel vorgenommen, so erfolgen diese auf einer vorgewärmten Heizplatte (37 °C). Die retinalen Ganglien-Zellkulturen werden vorsichtig aus dem Brutschrank genommen, zügig auf die Heizplatte gestellt und die Medien möglichst rasch ausgetauscht.

### **2.2.8 Fixierung und Phalloidin-Färbung an retinalen Ganglienzellen**

Vor der Fixierung werden eine Heizplatte und das Fixierungsmittel (4 % PFA in PBS + 0,33 M Saccharose + 0,1 % Glutaraldehyd) auf ca. 37 °C vorgewärmt. Die retinalen Ganglienzell-Kulturen werden aus dem Brutschrank genommen und umgehend auf die Heizplatte gestellt. Anschließend wird das Kulturmedium zügig abgesaugt, ca. 400 µl vorgewärmte Fixierlösung zugegeben und die Kulturen 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei Waschrufen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS (jeweils ca. 5 min) werden die Kulturen entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit Fluorophor-markiertem Phalloidin gefärbt (Verdünnung 1:20 bis 1:50 in 1 % BSA). Abschließend wird dreimal mit PBS gewaschen und die Präparate in Mowiol eingebettet.

### **2.2.9 Der Kollaps-Assay**

Der Wachstumskegel-Kollaps-Assay (Cox *et al.*, 1990; Raper und Kapfhammer, 1990) ist ein *in vitro*-Test, mit dem die spontane Reaktion von Wachstumskegeln auf löslich applizierte, homogen im Medium verteilte Moleküle untersucht wird. Mit diesem Test kann beurteilt werden, ob Lenkungssignale auf bestimmte Axon-Populationen repulsiv wirken. Wachstumskegel reagieren auf repulsive Signale mit einem Kollaps, verbunden mit einer Retraktion des Axonschafts. Sie erscheinen unter dem Mikroskop nur noch als Axon-Endigungen und weisen keine Lamellipodien und Filopodien mehr auf.

Zur Durchführung eines Kollaps-Assays werden Retina-Explantate auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern ausgelegt und in F12-MZ-Medium kultiviert. Nach 20-22 Stunden werden die Kulturen auf eine vorgewärmte Heizplatte (37 °C) gestellt, das Medium bis auf einen kleinen Rest abgesaugt und neues F12-MZ-Medium, das die zu untersuchenden Moleküle enthält, zugegeben. Nach der gewünschten Inkubationszeit werden die Kulturen fixiert und mit Alexa Fluor488-gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Die Zahl der kollabierten und intakten Wachstumskegel wird (blind für die Versuchsbedingungen) am Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt und in einem prozentualen Verhältnis angegeben. Pro Deckglas werden mindestens 100 Wachstumskegel ausgewertet.

### 2.2.10 Der Streifen-Assay

Der Streifen-Assay ist, genauso wie der Kollaps-Assay, ein *in vitro*-Test. Mit diesem Assay werden die Lenkungseigenschaften von Substrat-gebundenen Molekülen untersucht, wobei die Moleküle in Form alternierender Streifen angeboten werden (Vielmetter *et al.*, 1990). Repulsive Signale lenken Axone in die alternativen Bahnen, während attraktive Moleküle ein Wachstum auf den betreffenden Streifen begünstigen (Vielmetter *et al.*, 1990; Drescher, *et al.*, 1995).

Der Streifenassay wird nach Vielmetter *et al.*, 1990 durchgeführt: Eine Silikonmatrize, die 40 µm oder 90 µm breite, parallele Kanäle enthält, wird auf den Boden einer Petrischale gelegt und angedrückt. Ca. 200 µl einer geclusterten Ephrin-A2/Fc-Lösung (8 µg/ml) werden auf den Einführkanal der Matrize pipettiert und mittels einer Pipette durch die Kanälchen gesaugt (für die Kontrolle werden 8 µg/ml Fc verwendet). Anschließend wird die Oberfläche samt Matrize und Ephrin-Lösung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Kanäle werden zweimal mit Hanks`-Puffer gespült und die Matrize vorsichtig abgenommen. Daraufhin wird die Oberfläche mit einer Laminin-Lösung (20 µg/ml) überschichtet und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Hanks`-Puffer wird die Oberfläche bis zum Auflegen der Retina-Explantate in F12-Medium äquilibriert. Die Retina-Explantate werden so auf die Oberflächen gelegt, dass die Axone parallel zu den Ephrin/Laminin-Streifen auswachsen.

#### Auswertung

Nach 20-22 Stunden Inkubation in F12-MZ-Medium werden die Kulturen fixiert und mit Alexa Fluor488-Phalloidin gefärbt. Aufnahmen des Axonwachstums und der Streifen-Oberfläche werden am Fluoreszenz-Mikroskop gemacht. Die Bilder werden im TIF-Format in ImageJ importiert. Mithilfe des Plugins JACoP werden in beiden Farbkanälen Intensitätsschwellenwerte festgelegt und der Anteil Phalloidin-gefärbter Axone ausgemessen, der mit den Alexa Fluor594-markierten Ephrin-A2/Fc-Streifen überlappt.

### 2.2.11 Isolierung von EphA3 aus retinalen Wachstumskegeln

Der Boden einer Petrischale (Ø 60 mm) wird in fünf bis sieben von einander abgegrenzten Bereichen mit Laminin beschichtet. Pro Laminin-Oberfläche werden zwei temporale Retina-Explantate ausgelegt und mit Metallklötzchen beschwert. Nach ca. 20-22 Stunden Inkubation in F12-MZ-Medium wird das Medium abgesaugt, die Metallklötzchen entfernt und die Explantat-Streifen abgenommen. Damit wird gewährleistet, dass sich keine Zellkörper mehr auf der Oberfläche befinden, sondern hauptsächlich ausgewachsene Axone. Pro Oberfläche werden ca. 70 µl Lyse-Puffer zugegeben und die Kulturen für 15 min bei 4 °C lysiert. Anschließend werden

die Axone mit einem Zellschaber von der Petrischale abgelöst und in Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Lysate werden für 15 min bei 14.000 g (4 °C) zentrifugiert, kurz im Ultraschallbad inkubiert und der Überstand vom Pellet getrennt. Die Überstände werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Um die Proteinmenge zu erhöhen werden Lysate aus ca. 120 Explantat-Kulturen (20 Petrischalen) gesammelt.

Nach dem Auftauen werden die Lysate vereinigt. Für eine Vorreinigung werden 50-75 µl der zuvor in PBS gewaschenen ProteinG-Sepharose zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wird die Sepharose bei 600 g für 30 Sekunden abzentrifugiert, dreimal in PBS gewaschen und bei -20 °C gelagert. Das vorgereinigte Lysat wird für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem  $\alpha$ -EphA3-Antikörper (Santa Cruz, 2 µg Antikörper pro 100 µg Protein) inkubiert und anschließend wiederum 50-75 µl ProteinG-Sepharose zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wird die Sepharose abzentrifugiert und vom Überstand getrennt. Der Überstand wird bei -20 °C gelagert. Die Sepharose wird dreimal in PBS gewaschen und anschließend ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.12 Lyse von Retina-Zellen

Acht temporale bzw. nasale Retinae werden in Hanks`-Puffer gesammelt und anschließend in 500 µl Lyse-Puffer aufgenommen. Daraufhin werden die Zellen mithilfe einer Pipette lysiert. Der Zellextrakt wird für 30 min bei 4 °C inkubiert, kurz im Ultraschallbad behandelt und anschließend abzentrifugiert (Zentrifuge *MiniSpin*, Rotor *F-45-12-11*, Eppendorf, 13.400 Umdrehungen pro min). Der Überstand wird abgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.13 SDS-PAGE und Western Blot

Die auf das Gel aufzutragenden Proben werden mit 5x Ladepuffer versetzt, für 10 min aufgeköcht und kurz zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. 20 µl der Proben werden mithilfe einer Hamilton-Spritze auf ein 0,75 mm dickes Gel aufgetragen. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels beträgt 12 %, die des Sammelgels 6 %. Nach dem Auftragen der Proben wird die Gelelektrophorese bei Raumtemperatur, beliebiger Spannung und einer Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt. Die Gele werden anschließend kurz in Blotpuffer äquilibriert.

Die aufgetrennten Proteine werden vom SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Der Elektrobplot erfolgt in einer *Semi-Dry*-Apparatur. Die Membran wird zuvor mit MeOH benetzt und ebenfalls kurz in Blotpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgt bei

Raumtemperatur, beliebiger Spannung und einem konstanten Stromfluss (1 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche).

Die PVDF-Membran wird nach Entnahme aus der Blot-Apparatur sofort kurz in H<sub>2</sub>O gelegt. Alle weiteren Schritte erfolgen in einem 50 ml-Reaktionsröhrchen bei Raumtemperatur. Die Membran wird zunächst für eine Stunde in 5 % Magermilchlösung blockiert und anschließend viermal 10 min mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper ( $\alpha$ -EphA3, Santa Cruz, Verdünnung 1:200, und  $\alpha$ -GAPDH, Verdünnung 1:1000 in 5 % Magermilchlösung) erfolgt über Nacht. Nach weiteren vier zehninütigen Waschschrinen in TBS wird eine Stunde mit dem Sekundärantikörper ( $\alpha$ -Kaninchen, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert, Verdünnung 1:100 bis 1:200 in 5 % Magermilchlösung) inkubiert. Die Membran wird für 10 min mit 1 ml Chemolumineszenz-Substratlösung (Super Signal West Pico, Thermo Scientific) überschichtet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Nach unterschiedlichen Belichtungszeiten (3 min bis 1 Stunde) wird dieser entwickelt und fixiert.

#### **2.2.14 Immunhistochemische Färbung des EphA3-Rezeptors**

##### **Doppelfärbung von EphA3 und Phalloidin**

Die Gewebekulturen werden für 30 min in 400  $\mu$ l vorgewärmter Fixierlösung (4 % PFA + 0,33 M Saccharose + 0,1 % GA) inkubiert. Der Austausch des Mediums gegen die Fixierlösung erfolgt auf einer vorgewärmten Heizplatte (37 °C). Nach der Fixierung erfolgen drei fünfminütige Waschschrine: abhängig davon, ob die Zellen permeabilisiert werden sollen oder nicht, wird entweder mit 0,1 % TritonX-100 in PBS oder PBS gewaschen. Die Färbung mit einem monoklonalen  $\alpha$ -EphA3-Antikörper (Verdünnung 1:2500 in 1 % BSA) erfolgt über Nacht bei 4 °C. Der Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe von Hideaki Tanaka (Kumamoto University Graduate School of Medical Science, Japan) hergestellt und bereits erfolgreich zur Anfärbung von Nervenfasern am optischen Nervaustritt eingesetzt (Hornberger *et al.*, 1999; Iwamasa *et al.*, 1999). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wird weitere dreimal mit 0,1 % TritonX-100 in PBS bzw. PBS gewaschen und anschließend mit einem  $\alpha$ -Maus-Antikörper (Verdünnung 1:200 und 1:500 in 1% BSA) und Fluorophor-markiertem Phalloidin (1:20 bis 1:50 in 1 % BSA) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS werden die Präparate in Mowiol eingebettet. Die Auswertung erfolgt entweder mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (*ApoTome Imager Z1*) oder mittels hochauflösender SIM-Mikroskopie (*structured illumination microscopy*) (Gustafsson, 2000). Dazu wird der Prototyp des Mikroskops *Elyra PS.1* der Firma Carl Zeiss verwendet.

### **Dreifachfärbung von EphA3, neuronalem $\beta$ 3-Tubulin (Tuj) und Phalloidin**

Die Fixierung der Gewebekulturen erfolgt wie bereits beschrieben. Nach der Fixierung werden die Zellen dreimal in PBS gewaschen und anschließend mit dem  $\alpha$ -EphA3-Antikörper inkubiert (über Nacht bei 4 °C, Verdünnung 1:2500 in 1 % BSA). Es folgen drei weitere Waschschriffe in PBS und die zweistündige Inkubation mit einem Cy3-konjugierten  $\alpha$ -Maus-Antikörper bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:500 in 1 % BSA). Anschließend wird dreimal in PBS gewaschen und fünf Minuten mit 0,1 % TritonX-100 in PBS permeabilisiert. Nach drei weiteren Waschschriffen in PBS wird für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem  $\alpha$ - $\beta$ 3-Tubulin-Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:300 in 1% BSA). Danach wird erneut dreimal in PBS gewaschen und anschließend sowohl ein  $\alpha$ -Kanninchen-Antikörper (Alexa488-konjugiert, Verdünnung 1:200 in 1 % BSA) als auch Alexa647-konjugiertes Phalloidin (Verdünnung 1:20 in 1 % BSA) für eine Stunde zugegeben. Nach drei letzten Waschschriffen werden die Präparate in Mowiol eingebettet. Die Auswertung erfolgt mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (*ApoTome Imager Z1*) und mittels hochauflösender SIM-Mikroskopie.

### **2.2.15 Quantitative Auswertung von Fluoreszenzintensitäten**

Die Quantifizierung der EphA3-Fluoreszenz dient als Parameter für die vorliegende Proteinmenge. Die Retina-Explantate werden hierzu mittels der in 2.2.14 beschriebenen Methode gefärbt. Aufnahmen von einzelnen Wachstumskegeln werden, bei gleichbleibender Belichtungszeit, mit einem Ölimmersionsobjektiv (63-fache Vergrößerung) am Fluoreszenz-Mikroskop (*ApoTome Imager Z1*) gemacht. Die Bilder werden im TIF-Format in MetaMorph importiert. Im Farbkanal, der die Phalloidin-Fluoreszenz zeigt, erfolgt die Festlegung eines Intensitäts-Schwellenwertes, sodass die Kontur des auszumessenden Bereichs (des Wachstumskegels) erfasst wird. Eine Region um den gewünschten Bereich wird anschließend automatisch definiert. Zur Bestimmung der Hintergrund-Fluoreszenz wird diese Region dupliziert und in unmittelbarer Nähe des Wachstumskegels positioniert. Daraufhin wird die integrierte Fluoreszenz-Intensität (Summe über alle Pixel-Intensitäten) in beiden Regionen gemessen. Die Regionen werden an die entsprechenden Positionen im EphA3-Farbkanal übertragen und auch hier die integrierte Fluoreszenzintensität gemessen. Zur Auswertung wird die jeweils gemessene Hintergrund-Fluoreszenz vom spezifischen Signal subtrahiert und der Quotient aus EphA3-Intensität und Phalloidin-Intensität angegeben.

### 2.2.16 Versuche mit Dynasore zur Inhibition der Endocytose

#### Versuche zur Adaptation gegenüber gelöstem Ephrin-A5

Temporale Retina-Explantate werden auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern ausgelegt und über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert. Nach ca. 20-22 Stunden wird das Medium abgesaugt und nacheinander folgende Medien zugegeben:

- (1) 30 min: F12-MZ + 80  $\mu$ M/150  $\mu$ M Dynasore
- (2) 20 min oder 120 min: F12-MZ + 80  $\mu$ M/150  $\mu$ M Dynasore + 0,25  $\mu$ g/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc

(Als Kontrollen werden DMSO statt Dynasore und 0,25  $\mu$ g/ml einer geclusterten Fc-Lösung statt Ephrin-A5/Fc verwendet)

Die Axone werden fixiert, mit Alexa Fluor488-Phalloidin gefärbt und die Präparate in Mowiol eingebettet. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz-Mikroskop indem die Anzahl an intakten und kollabierten Wachstumskegeln (blind für die Versuchsbedingungen) bestimmt und in einem prozentualen Verhältnis angegeben wird. Pro Deckglas werden mindestens 100 Axone ausgezählt.

#### Versuche zur Adaptation gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5

Temporale Retina-Explantate werden in unterschiedlicher Weise auf mittels  $\mu$ CP gestempelten Adaptationssubstraten positioniert: In einer Versuchsreihe werden die Explantate vor das Muster gelegt. Die Axone wachsen in diesem Fall auf einer Laminin-Oberfläche aus und treffen frontal auf das gestempelte Streifenmuster. In der zweiten Versuchsreihe werden die Explantate gemäß Abb. 2-1 auf das Ephrin-A5/Fc-Muster gelegt. Die Axone wachsen demzufolge auf erhöhten Ephrin-A5-Konzentrationen aus. Die Axone werden über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert, das zusätzlich 80  $\mu$ M bzw. 150  $\mu$ M Dynasore enthält. Nach ca. 20-22 Stunden werden die Axone fixiert, mit Alexa-Fluor488-Phalloidin gefärbt und die Präparate in Mowiol eingebettet.

### 2.2.17 Untersuchung der Rezeptor-vermittelten Endocytose von Transferrin

Um die Funktionalität des Endocytose-Inhibitors Dynasore zu testen, wird ein Transferrin-Assay durchgeführt, der in ähnlicher Art und Weise von Macia *et al.*, 2006 beschrieben wurde. A549-Zellen (humane Alveolarepithelzellen eines Lungenkarzinoms, ca. 40.000 Zellen/ml) werden auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern ausgesät und über Nacht in F12-Medium

inkubiert. Nach 20-22 Stunden wird das Medium abgesaugt und frisches Medium, das zusätzlich 80  $\mu\text{M}$  Dynasore (bzw. DMSO) enthält, zugegeben. Nach 30 min erfolgt die Zugabe von Alexa Fluor546-konjugiertem Transferrin in einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$ . Nach weiteren 10 min werden die Zellen dreimal in F12-Medium gewaschen und für 10 min in den Brutschrank gestellt. Unmittelbar vor der Fixierung erfolgt ein weiterer Waschschrift in einer sauren Lösung aus 50 mM Glycin, pH 3 und 100 mM NaCl. Die Zellen werden mit Alexa Fluor488-Phalloidin und DAPI gefärbt und Bilder mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (*ApoTome Imager Z1*) aufgenommen.

Die Bilder werden im TIF-Format in MetaMorph importiert. Im Farbkanal, der die Phalloidin-Fluoreszenz zeigt, erfolgt die Festlegung eines Intensitäts-Schwellenwertes, sodass die Kontur des auszumessenden Bereichs (der Zelle) erfasst wird. Eine Region um den gewünschten Bereich wird anschließend automatisch definiert. Daraufhin wird die integrierte Fluoreszenz-Intensität (Summe über alle Pixel-Intensitäten) in dieser Region sowie die Fläche ausgemessen. Die Regionen werden an die entsprechenden Positionen im Transferrin-Farbkanal übertragen. Hier erfolgen die Festlegung eines neuen Intensitäts-Schwellenwertes zur Isolierung des spezifischen Signals und das Ausmessen der integrierten Transferrin-Fluoreszenz.

### **2.2.18 Versuche mit Anisomycin zur Inhibition der lokalen Proteinsynthese**

#### **Versuche zur Adaptation gegenüber gelöstem Ephrin-A5**

Temporale Retina-Explantate werden auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern ausgelegt und über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert. Nach 20-22 Stunden wird das Medium abgesaugt und nacheinander folgende Medien zugegeben:

- (1) 30 min: F12-MZ + 40  $\mu\text{M}$  AIM
- (2) 20 min oder 120 min: F12-MZ + 40  $\mu\text{M}$  AIM + 0,25  $\mu\text{g/ml}$  geclustertes Ephrin-A5/Fc

(Als Kontrollen werden DMSO statt AIM und 0,25  $\mu\text{g/ml}$  einer geclusterten Fc-Lösung statt Ephrin-A5/Fc verwendet)

Danach werden die Kulturen fixiert, mit Alexa Fluor488-gekoppeltem Phalloidin gefärbt und die Präparate in Mowiol eingebettet. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz-Mikroskop (*ApoTome Imager Z1*). Die Anzahl an intakten und kollabierten Wachstumskegeln wird blind für die Versuchsbedingungen bestimmt und in einem prozentualen Verhältnis angegeben. Pro Deckglas werden mindestens 100 Wachstumskegel ausgezählt.

### **Versuche zur Adaptation gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5**

Temporale Retina-Explantate werden gemäß Abb. 2-1 auf Adaptationssubstraten ausgelegt und über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert. Nach 20-22 Stunden wird das Medium abgesaugt und frisches Medium, das zusätzlich 40  $\mu\text{M}$  AIM enthält, für 2 Stunden zugegeben. Anschließend werden die Axone fixiert, mit Alexa Fluor488-gekoppeltem Phalloidin gefärbt und die Präparate in Mowiol eingebettet. Ausgewertet werden nur die Wachstumskegel, die sich nach der Fixierung auf dem Streifensubstrat befinden. Die Anzahl an intakten und kollabierten Wachstumskegeln wird blind für die Versuchsbedingungen bestimmt und in einem prozentualen Verhältnis angegeben. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz-Mikroskop (*ApoTome Imager Z1*).

### **2.2.19 Versuche mit Pervanadat zur Inhibition zellulärer Tyrosin-Phosphatasen**

#### **Herstellung der Vanadat und Pervanadat-Lösungen**

Die Herstellung der Vanadat-Stammlösung (120 mM Natriumorthovanadat in ddH<sub>2</sub>O, pH 10) erfolgt gemäß der Angaben im zugehörigen Datenblatt (Sigma Aldrich, Produktnummer S6508). Nach Auflösen des Vanadats erscheint die Lösung aufgrund sich spontan ausbildender Decavanadate gelblich bis orange. Diese depolymerisieren bei pH 10 langsam zum farblosen Monovanadat. Um die Depolymerisation zu beschleunigen wird die Lösung solange erhitzt, bis die gelblich-orange Farbe vollständig verschwunden ist. Anschließend wird die Lösung aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Die Herstellung der Pervanadat-Lösung erfolgt nach Castan *et al.*, 1999. Die Vanadat-Stammlösung wird 1:10 in 25 mM HEPES-Puffer, pH 7,4, verdünnt und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer Endkonzentration von 12 mM zugegeben. Der Ansatz wird 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, in das zuvor eine Spatelspitze (ca. 0,5 mg) Katalase vorgelegt wurde. Zur Inkubation der Zellen wird die Pervanadat-Lösung 1:1000 in F12-MZ-Medium verdünnt.

Für eine Kontroll-Lösung wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Endkonzentration 12 mM) in 25 mM HEPES verdünnt, diese Lösung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß mit vorgelegter Katalase pipettiert.

### **Charakterisierung des Auswachsverhaltens**

Um das Auswachsverhalten retinaler Ganglienzellen unter dem Einfluss des Inhibitors zu untersuchen, werden temporale Retina-Explantate entweder auf Laminin-Deckgläsern oder auf gestempelten Adaptationssubstraten ausgelegt. Bei Verwendung der Adaptationssubstrate werden die Explantate schräg aufgelegt, sodass ein Teil des Explantats Kontakt zur Ephrin-A5/Fc-Oberfläche, der andere Teil Kontakt zur Laminin-Oberfläche hat. Die Explantate werden über Nacht in folgenden Medien inkubiert:

Wachstum auf Laminin:

- (1) F12-MZ + 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc + Kontroll-Lösung
- (2) F12-MZ + 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc + 12 µM Pervanadat
- (3) F12-MZ + 12 µM Pervanadat

Wachstum auf Adaptationssubstraten:

- (1) F12-MZ + 12 µM Pervanadat
- (2) F12-MZ + Kontroll-Lösung

Nach ca. 20-22 Stunden werden die Axone fixiert, mit Alexa Fluor488-Phalloidin gefärbt und die Präparate in Mowiol eingebettet.

### **Untersuchung des Ephrin-A5-vermittelten Kollaps**

Temporale Retina-Explantate werden entweder auf Laminin-Deckgläsern oder auf gestempelten Adaptationssubstraten ausgelegt und über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert. Nach ca. 20-22 Stunden wird das Medium abgesaugt und frisches F12-MZ-Medium, das zusätzlich folgende Bestandteile enthält, zugegeben:

Wachstum auf Laminin:

- (1) 20 min oder 120 min: 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc + Kontroll-Lösung
- (2) 20 min oder 120 min: 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc + 12 mM Pervanadat
- (3) 20 min oder 120 min: 0,25 µg/ml geclustertes Fc + 12 mM Pervanadat

Wachstum auf Adaptationssubstraten:

- (1) 30 min: 12 mM Pervanadat
- (2) 30 min: Kontroll-Lösung

Nach den angegebenen Inkubationszeiten werden die Axone fixiert, mit Alexa Fluor488-Phalloidin gefärbt und die Präparate in Mowiol eingebettet. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz-Mikroskop indem die Anzahl an intakten und kollabierten Wachstumskegel (blind für die Versuchsbedingungen) bestimmt und in einem prozentualen Verhältnis angegeben wird. Bei Verwendung der Adaptationssubstrate werden nur Wachstumskegel berücksichtigt, die sich auf dem Streifen substrat befinden. Pro Deckglas werden mindestens 100 Axone ausgezählt.

### **Kontrollexperiment zur Untersuchung der Funktionsweise des Inhibitors**

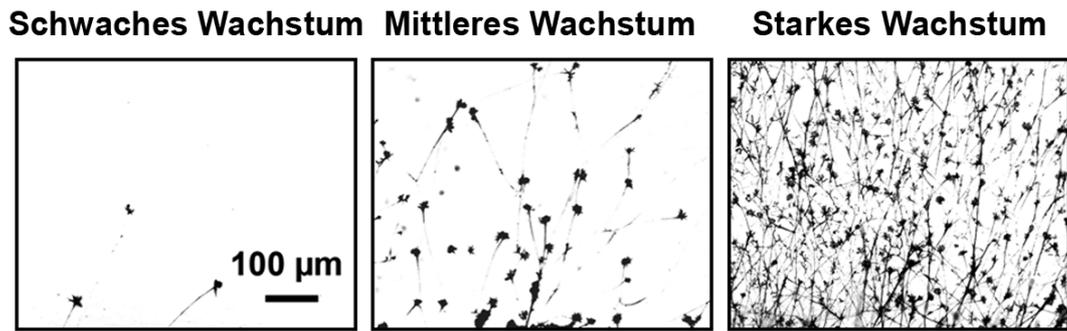
Temporale Retina Explantate werden auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern ausgelegt und über Nacht in F12-MZ-Medium kultiviert. Nach ca. 20-22 Stunden wird das Medium abgesaugt und frisches F12-MZ-Medium, das zusätzlich folgende Bestandteile enthält, zugegeben (bei den Ansätzen 3-5 erfolgt nach 20 min ein weiterer Medienwechsel für 100 min):

- |     |          |   |
|-----|----------|---|
| (1) | 20 min:  | 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc + 12 mM Pervanadat |
| (2) | 20 min:  | 0,25 µg/ml geclustertes Fc + 12 mM Pervanadat           |
| (3) | 20 min:  | 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc + Kontroll-Lösung  |
|     | 100 min: | 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc                    |
| (4) | 20 min:  | 0,25 µg/ml geclustertes Fc + 12 mM Pervanadat           |
|     | 100 min: | 12 mM Pervanadat  |
| (5) | 20 min:  | 0,25 µg/ml geclustertes Fc + 12 mM Pervanadat           |
|     | 100 min: | 12 mM Pervanadat  |

Die Fixierung, Färbung und Auswertung erfolgen wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben.

### **2.2.20 Quantitative Auswertung des Axonwachstums**

Das Axonwachstum wird auf zwei verschiedene Arten quantifiziert. Eine Methode beruht auf der subjektiven Einteilung des Wachstums in folgende Klassen: „kein Wachstum und schwaches Wachstum“, „mittleres Wachstum“ und „starkes Wachstum“ (siehe Abb. 2-2). Retinale Ganglienzell-Kulturen werden hierzu mittels der in 2.2.8 beschriebenen Methode gefärbt, am Mikroskop blind für die Versuchsbedingungen betrachtet und den einzelnen Klassen zugeteilt.



**Abb. 2-2. Beurteilung des Axonwachstums.**

Das Axonwachstum wird in die drei Klassen „kein Wachstum und schwaches Wachstum“ (links), „mittleres Wachstum“ (Mitte) und „starkes Wachstum“ (rechts) eingeteilt. Die Abbildung zeigt Phalloidin-gefärbte Axone in schwarz.

Bei der zweiten Methode wird die Fluoreszenzintensität der ausgewachsenen Axone gemessen. Bilder der Phalloidin-gefärbten Axone werden dazu mit identischer Belichtungszeit aufgenommen (5-6 Bilder pro Explantat-Streifen, Objektiv mit 10-facher Vergrößerung). Die Bilder werden im TIF-Format in MetaMorph importiert. Es erfolgt die Festlegung eines Intensitäts-Schwellenwertes, sodass die Kontur der auszumessenden Axone erfasst wird. In diesen Bereichen wird die integrierte Fluoreszenz-Intensität gemessen. Da von jedem Explantat-Streifen 5-6 Bilder aufgenommen werden, wird das arithmetische Mittel der entsprechenden Intensitäts-Werte gebildet, um jedem Streifen ein definierten Wert zuordnen zu können.

### 2.2.21 Statistische Datenanalyse

Um quantitative Daten unterschiedlicher Populationen zu vergleichen, wird die statistische Signifikanz mithilfe eines zweiseitigen Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test bestimmt. Das Signifikanz-Niveau  $\alpha$  beträgt jeweils  $\alpha = 0,05$ . Die Signifikanz wird gemäß Tab. 2-5 veranschaulicht.

**Tab. 2-5.** Statistische Datenauswertung

Signifikanz-Niveau	Darstellung
$0,05 < \alpha$	n.s. (nicht signifikant)
$0,01 < \alpha \leq 0,05$	*
$0,001 < \alpha \leq 0,01$	**
$\alpha \leq 0,001$	***



## 3 ERGEBNISSE

### Teil I:

#### Desensitivierung von Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen des Hühnchens gegenüber Ephrin-A5

Bereits publizierte Ergebnisse enthalten Hinweise darauf, dass Axone retinaler Ganglienzellen gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal Ephrin-A5 desensitivieren und resensitivieren, d.h. adaptieren können. Temporale Axone bilden in gestempelten Ephrin-A5-Gradienten eine stabile Stoppfront aus, deren Position im Gradienten durch einen Mechanismus aus Summation und Adaptation kontrolliert zu sein scheint (von Philipsborn *et al.*, 2006b; Lang *et al.*, 2008). Weitere Hinweise ergeben sich unter Anderem aus folgenden Beobachtungen:

- (1) Treffen Axone temporaler retinaler Ganglienzellen auf eine Front aus Substratgebundenem Ephrin-A5, so halten sie unmittelbar vor dieser Front an. Werden retinale Explantate hingegen direkt auf hoch konzentrierten Ephrin-A5-Oberflächen ausgelegt, so wachsen die Axone unverändert aus und reagieren nicht mehr auf gelöstes Ephrin-A5 (von Philipsborn, 2007).
- (2) Werden temporale retinale Ganglienzellen, die normalerweise hoch sensitiv gegenüber dem repulsiven Ephrin-A5-Signal sind, in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5 inkubiert, so wachsen deren Axone unverändert aus einem Explantat aus und zeigen keine Reaktion auf Substratgebundenes Ephrin-A5 mehr (von Philipsborn *et al.*, 2006b; von Philipsborn, 2007).
- (3) In sog. „Lückenassays“ wachsen temporale Axone auf einer Oberfläche mit hoher Ephrin-A5-Konzentration aus, bevor sie eine Ephrin-A5-freie Lücke erreichen. Bei einer Lückenbreite von 50-75  $\mu\text{m}$  überwachsen die Axone eine Ephrin-Front nach der Lücke.

Werden sie hingegen nach Überquerung einer Lücke von mindestens 200  $\mu\text{m}$  erneut mit Ephrin-A5 konfrontiert, so halten sie an und bilden eine Stoppfront aus (von Philipsborn, 2007).

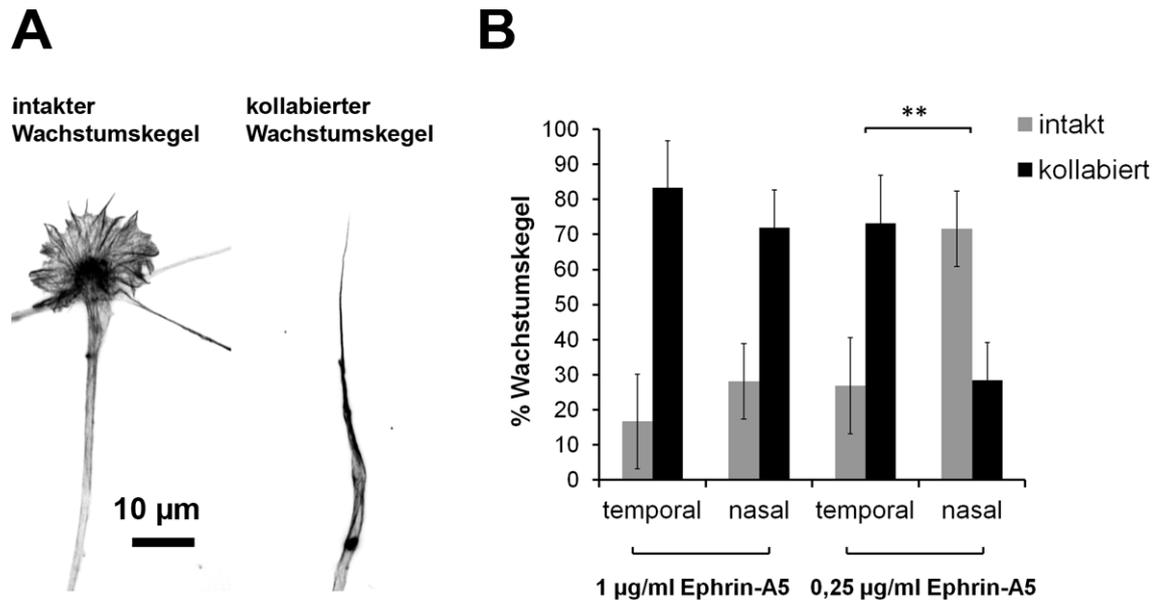
Diese Beobachtungen wurden anhand Substrat-gebundener Ephrin-A5-Muster gemacht. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll zunächst ein weniger zeit- und materialaufwändiger Assay etabliert werden, mit dem die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 untersucht werden kann. Dieses Problem wird mithilfe von Wachstumskegel-Kollaps-Assays untersucht und beinhaltet die Bestimmung einer geeigneten Ephrin-A5-Konzentration (3.1.1.), Versuche zur Desensitivierung (3.1.2.) und essenzielle Kontrollexperimente (3.1.3).

### **3.1 Desensitivierung retinaler Wachstumskegel gegenüber gelöstem Ephrin-A5**

#### **3.1.1 Ephrin-A5-vermittelter Kollaps retinaler Wachstumskegel**

Bereits veröffentlichte Experimente legen die Vermutung nahe, dass Axone retinaler Ganglienzellen des Hühnchens gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5 desensitivieren und resensitivieren können. Dieses Verhalten soll zunächst weiter untersucht und überprüft werden, ob auch eine Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 auftritt. Dies geschieht mithilfe des Wachstumskegel-Kollaps-Assays. Um zu testen, ob Wachstumskegel gegenüber gelöstem Ephrin-A5 desensitivieren können, muss zunächst eine initiale Reaktion, d.h. ein Kollaps, erfolgen. Die Wachstumskegel weisen in diesem Fall keine Lamellipodien und Filopodien mehr auf, sondern sind nur noch als Axonendigungen unter dem Mikroskop erkennbar (siehe Abb. 3-1 A).

Es stellt sich die Frage, welche Konzentration an gelöstem Ephrin-A5 zur Untersuchung des Desensitivierungsverhaltens eingesetzt werden soll. Als Grundlage zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration wurde das unterschiedliche Verhalten temporaler und nasaler Axone *in vitro* gewählt. Abb. 3-1 zeigt das Ergebnis von Kollaps-Assay-Experimenten, bei denen retinale Axone für 20 min mit 0,25  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\mu\text{g/ml}$  geclustertem Ephrin-A5/Fc behandelt wurden.



**Abb. 3-1. Ephrin-A5-vermittelter Kollaps retinaler Wachstumskegel.**

Gelöstes Ephrin-A5/Fc führt nach 20 min zu einem Kollaps bei retinalen Wachstumskegeln. Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  reagieren sowohl temporale als auch nasale Axone mit einem Kollaps. Bei einer Konzentration von 0,25  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5/Fc zeigt sich ein topografisch differenzielles Verhalten. (A) Darstellung eines intakten und eines kollabierten Wachstumskegels (Phalloidininfärbung in schwarz). (B) Quantitative Auswertung von intakten und kollabierten Wachstumskegeln. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz an kollabierten Wachstumskegeln. Jedes Experiment wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (1  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5, temporal, n=402; 1  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5, nasal, n=424; 0,25  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5, temporal, n=452; 0,25  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5, nasal, n=417). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Werden die Axone für 20 min mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5/Fc behandelt, so reagieren temporale und nasale Axone mit einem Kollaps: 71 % (nasal) bzw. 83 % (temporal) der Axone zeigen den in Abb. 3-1 A dargestellten, kollabierten Phänotyp. Wird die Ephrin-A5/Fc-Konzentration auf 0,25  $\mu\text{g/ml}$  verringert, so werden Unterschiede zwischen temporalen und nasalen Axonen deutlich: Während 74 % der temporalen Axone einen kollabierten Phänotyp zeigen, ist der Prozentsatz der kollabierten nasalen Axone auf 28 % reduziert.

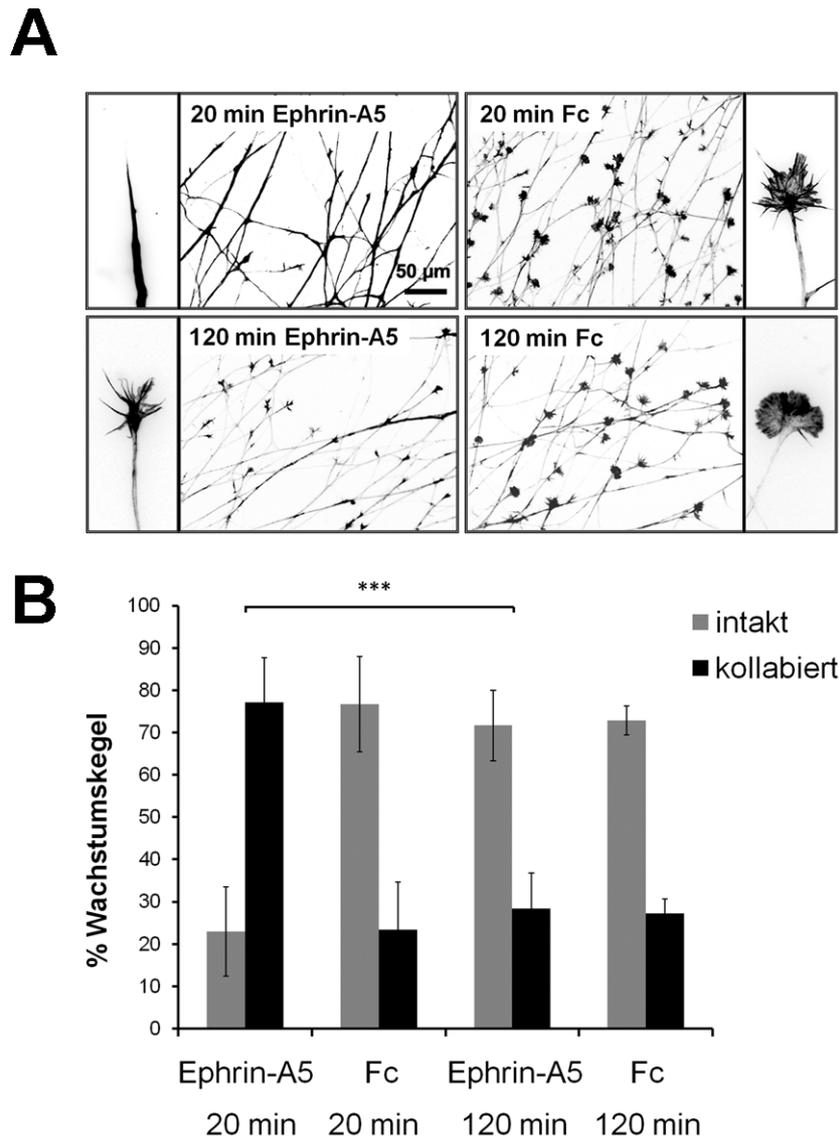
Ein Unterschied zwischen temporalen und nasalen Axonen ähnelt dem Verhalten *in vivo*: Nasale Axone terminieren im posterioren Tektum, d.h. in einem Bereich, in dem eine hohe Ephrin-A5-Konzentration vorliegt (Drescher *et al.*, 1995). Diese Axon-Population ist folglich in der Lage, solche Konzentrationen zu tolerieren. Temporale Axone bilden Terminations-Zonen im anterioren Tektum aus und werden durch das repulsive Lenkungssignal am Einwachsen in posteriore Bereiche gehindert. Da sich die Wachstumskegel bei einer Ephrin-A5/Fc-Konzentration von 0,25  $\mu\text{g/ml}$  topografisch differenziell verhalten, wird diese Konzentration als

physiologisch betrachtet und für die weiteren Versuche zur Desensitivierung gegenüber löslichem Ephrin-A5 verwendet.

### **3.1.2 Desensitivierung nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps**

Um zu untersuchen, ob Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen an gelöstes Ephrin-A5 adaptieren können, werden Kollaps-Assays mit temporalen Axonen durchgeführt und geclustertes Ephrin-A5/Fc in einer Konzentration von 0,25 µg/ml eingesetzt. Wie im vorangehenden Abschnitt aufgezeigt wurde, verhalten sich retinale Axone bei dieser Konzentration topografisch differenziell. Da nur temporale Axone mit einem Kollaps auf diese Ephrin-Konzentration reagieren, werden ausschließlich temporale Axone untersucht. Abb. 3-2 zeigt den Phänotyp (A) und die quantitative Auswertung (B) von Axonen, die 20 min und 120 min mit 0,25 µg/ml geclustertem EphrinA5/Fc behandelt wurden. Eine 20-minütige Inkubation führt zu einem Kollaps der Wachstumskegel. 77 % der Axone zeigen den kollabierten Phänotyp. Nach einer 120-minütigen Inkubation zeigen die meisten Axone einen intakten Phänotyp und nur noch 28 % sind kollabiert. Da es sich beim untersuchten Ephrin-A5-Konstrukt um eine Ephrin-A5/Fc-Chimäre handelt, werden Kontrollversuche mit einer geclusterten Fc-Lösung durchgeführt. Die Zugabe von löslichem Fc hat keinen Einfluss auf die Morphologie der Wachstumskegel.

Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Annahme, dass temporale Axone gegenüber gelöstem Ephrin-A5 desensitivieren. Auf den initialen Kollaps folgt eine Regeneration und die Wiederaufnahme des Wachstums.

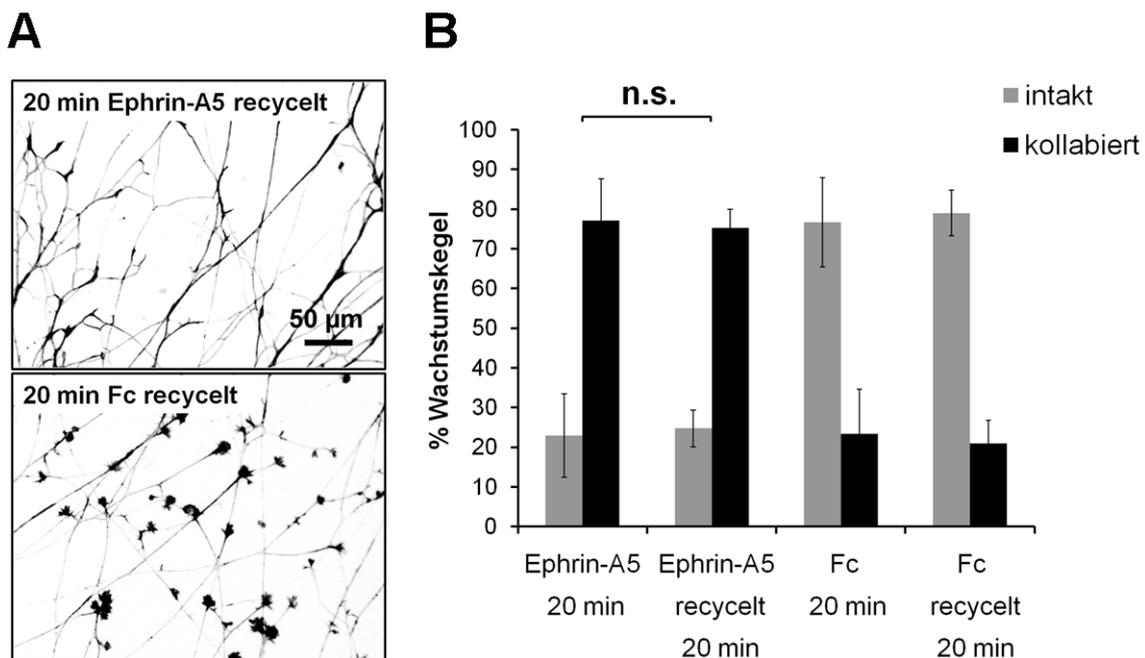


**Abb. 3-2. Desensitivierung temporaler Wachstumskegel gegenüber gelöstem Ephrin-A5.**

Gelöstes Ephrin-A5/Fc in einer Konzentration von 0,25 µg/ml führt zu einem initialen Kollaps bei temporalen retinalen Wachstumskegeln. Diese nehmen in Gegenwart von Ephrin-A5/Fc das Wachstum wieder auf und zeigen nach 120 min eine intakte Morphologie. **(A)** Darstellung von Phalloidin-gefärbten Axonen, die für 20 min, bzw. 120 min mit Ephrin-A5/Fc bzw. Fc behandelt wurden. **(B)** Quantitative Auswertung der intakten und kollabierten Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz an kollabierten Wachstumskegeln. Jedes Experiment wurde mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (Ephrin-A5, 20 min, n=663; Fc, 20 min, n=540; Ephrin-A5, 120 min, n=565; Fc, 120 min, n=689). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

### 3.1.3 Kontrollexperiment zur Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5

Für weitere Schlussfolgerungen muss zuvor die Frage beantwortet werden, ob die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem initialen, Ephrin-A5-vermittelten Kollaps nicht einer eventuellen Degradation des zugegebenen Ephrin-A5/Fc geschuldet ist. Dieser Sachverhalt wird folgendermaßen überprüft: Temporale Axone werden für 120 min in Medium inkubiert, dem Ephrin-A5/Fc zugesetzt wurde. Nach 120 min wird das Medium abgenommen und mit dem recycelten Medium ein Kollaps-Assay an einer anderen Kultur durchgeführt. Nach einer 20-minütigen Inkubation mit recyceltem Medium zeigen 75 % der Axone einen kollabierten Phänotyp. Ein signifikanter Unterschied zwischen recyceltem und frisch angesetztem Medium ist nicht festzustellen. Auch übt recyceltes Fc-Medium keinen Einfluss auf die Wachstumskegel aus (siehe Abb. 3-3); d.h. der bei der Ephrin-A5/Fc-Zugabe ausgelöste Kollaps wird nicht durch den Medienwechsel hervorgerufen.



**Abb. 3-3. Kontrollexperiment zur Stabilität von gelöstem Ephrin-A5/Fc.**

Wird Ephrin-A5/Fc-haltiges Medium nach 120 min von einer Axon-Kultur abgenommen und mit diesem Medium ein Kollaps-Assay an einer anderen Kultur durchgeführt, so führt diese Behandlung zu einem Kollaps bei temporalen Wachstumskegeln. (A) Darstellung von Phalloidin-gefärbten Axonen, die für 20 min mit recyceltem, EphrinA5/Fc- bzw. Fc-haltigen Medium inkubiert wurden. (B) Quantitative Auswertung der intakten und kollabierten Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Jedes Experiment wurde mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (Ephrin-A5, n=663; Ephrin-A5, recycelt, n=416; Fc, n=540; Fc, recycelt, n=541). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Das bedeutet, dass das zugesetzte Ephrin-A5/Fc während der 120-minütigen Versuchsdauer nicht degradiert, sondern funktionell verbleibt. Die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps erfolgt daher in Anwesenheit von aktivem Ephrin-A5/Fc.

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit können somit durch zwei Modelle erklärt werden: Einerseits ist es möglich, dass die Wachstumskegel nur auf Veränderungen der Ephrin-A5-Konzentration reagieren und nicht auf absolute Konzentrationen. In diesem Fall wäre die Wiederaufnahme des Axonwachstums in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc nicht zwingend mit einer Desensitivierung verbunden, da sich die Konzentration des Lenkungssignals in dieser Phase nicht verändert. Bereits veröffentlichte *in vitro*-Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen allerdings, dass Axone, die in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc wachsen, nicht mehr auf Substrat-gebundene Ephrin-A5-Muster reagieren (von Philipsborn *et al.*, 2006b; von Philipsborn, 2007). Daher kann dieser Erklärungsansatz ausgeschlossen werden.

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit besagt, dass die Axone gegenüber dem repulsiven Ephrin-Signal desensitivieren: Eine Ephrin-A5/Fc-Konzentration von 0,25 µg/ml löst bei temporalen Axonen nach weniger als 20 min einen initialen Kollaps der Wachstumskegel aus. Nach dem Kollaps bewirkt das gelöste Ephrin-A5/Fc eine Desensitivierung gegenüber dem repulsiven Signal.

Da der erste Erklärungsansatz, wie beschrieben, nicht zutreffend ist, kann bei der Wiederaufnahme des Axonwachstums in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc von einer Desensitivierung ausgegangen werden.

## Teil II:

### Die Dynamik des EphA3-Rezeptors bei der Desensitivierung und Resensitivierung retinaler Wachstumskegel gegenüber Ephrin-A5

Die im ersten Teil dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen gegenüber dem repulsive Lenkungssignal Ephrin-A5 desensitivieren und resensitivieren können. Über die zellulären Mechanismen, die diesen Vorgängen zugrunde liegen, ist allerdings noch nichts bekannt. Die Untersuchung dieser Mechanismen bildet den Kern der vorliegenden Arbeit und wird in den folgenden Teilen II und III adressiert.

Ein naheliegender Mechanismus, der der Desensitivierung und der Resensitivierung gegenüber einem repulsiven Lenkungssignal zugrunde liegen könnte, beruht auf der Modulation des Rezeptorlevels in der Membran der Wachstumskegel. Werden z.B. Rezeptoren, an die das Lenkungsmolekül binden kann, endocytotisch aufgenommen, so stehen keine Rezeptoren mehr zur Verfügung, die das Signal vermitteln und damit eine Reaktion auslösen können. Umgekehrt würde der Wiedereinbau von Rezeptoren in die Membran die Wachstumskegel sensitivieren. Es konnte gezeigt werden, dass die initialen Reaktionen von Hühnchen-Axonen gegenüber den Lenkungsmolekülen Ephrin-A2 und Sema3A Endocytose-abhängig sind (Fournier *et al.*, 2000; Journey *et al.*, 2002). Auch die Desensitivierung von *Xenopus*-Axonen gegenüber Netrin-1 und Sema3A ist abhängig von Endocytose. Die Desensitivierung gegenüber Sema3A geht darüber hinaus einher mit einer Verringerung des zugehörigen Rezeptorgehalts (Neuropilin-1) in der Zellmembran (Piper *et al.*, 2005).

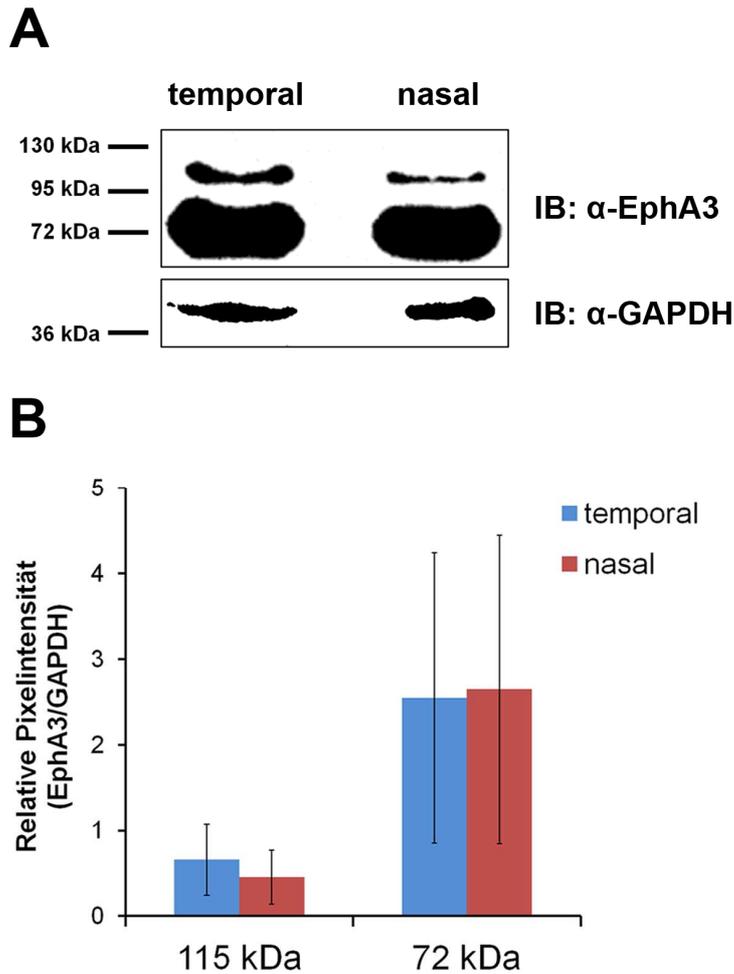
Verändern Wachstumskegel den Gehalt an transmembranen Rezeptoren, so können die Unterschiede gegebenenfalls biochemisch, mithilfe von Immunoblots, oder durch eine immunhistochemische Färbung sichtbar gemacht werden. Von allen Eph-Rezeptoren der Klasse A bindet Ephrin-A5 den Rezeptor EphA3 mit der höchsten Affinität (Monschau *et al.*, 1997; Flanagan und Vanderhaeghen, 1998). Die Isolierung und der biochemische Nachweis von EphA3 sowie dessen immunhistochemische Anfärbung beim Wachstum auf verschiedenen Ephrin-A5-Substraten ist das Thema des zweiten Teils dieser Arbeit. Abschnitt 3.2 befasst sich zunächst mit den biochemischen Analysen. Die Abschnitte 3.3 bis 3.5 zeigen die Ergebnisse der

immunhistochemischen Rezeptorfärbung. Zunächst wird dabei die Lokalisation des Rezeptors untersucht und das Färbemuster charakterisiert (3.3). Anschließend werden der Rezeptorgehalt beim Wachstum auf Adaptationssubstraten (3.4) sowie Kontrollfärbungen zur Überprüfung der Spezifität der Färbung gezeigt (3.5).

## **3.2 Biochemischer Ansatz zur Untersuchung des EphA3-Rezeptorgehaltes retinaler Wachstumskegel**

Die Frage, ob eine Veränderung der Rezeptorkonzentration bei der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 eine Rolle spielt, soll durch eine biochemische Herangehensweise beantwortet werden. Werden EphA3-Rezeptoren unter bestimmten Bedingungen abgebaut, so sind die Veränderungen unter Umständen anhand der Gelbanden nach einem Immunoblot zu erkennen. Für diesen Versuch werden EphA3-Rezeptoren aus retinalen Wachstumskegeln isoliert und mittels einer SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die Retina-Explantate werden dazu auf Laminin-Oberflächen kultiviert. Nach 20-22 Stunden werden die Explantatstreifen, auf denen sich die Zellkörper der retinalen Ganglienzellen befinden, abgenommen, sodass sich nur noch Axone und Wachstumskegel auf der Oberfläche befinden. Diese werden mit RIPA-Puffer lysiert und die EphA3-Rezeptoren durch eine Immunpräzipitation konzentriert. Um die Proteinmenge zu erhöhen werden die Lysate aus 120 Explantatkulturen, d.h. 240 Explantatstreifen, vereinigt.

Die Analyse nach der Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE und Western Blot erbringt jedoch keinen Nachweis des Rezeptors. Eine EphA3-Bande kann nicht detektiert werden. Um sicherzustellen, dass Retina-Zellen im Stadium E 6-7 EphA3-Rezeptoren exprimieren, die mit dem verwendeten Antikörper ( $\alpha$ -EphA3, L-18, Santa Cruz) detektiert werden können, werden Lysate kompletter Retinae untersucht. Dazu werden acht Retinae präpariert, entlang der temporal-nasal Achse geteilt und die Gewebehälften in Lysepuffer aufgenommen. Abb. 3-18 zeigt die Auswertung der Immunoblots nach einer dreiminütigen Belichtung des Röntgenfilms (A) und die Quantifizierung der Bandenintensität (B).



**Abb. 3-4. Isolierung von EphA3 aus Hühnchen-Retinae.**

Temporale und nasale Retinae werden lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot ausgewertet. Nach einer Röntgenfilmbelichtung sind zwei Banden bei 115 kDa und 72 kDa zu sehen. **(A)** Darstellung der EphA3-Banden und der Banden des Haushaltsproteins GAPDH nach einer dreiminütigen Belichtung des Röntgenfilms. **(B)** Quantitative Auswertung der Pixelintensitäten der gezeigten Banden. Dargestellt ist der Quotient der integrierten Pixelintensitäten aus EphA3 und GAPDH. Jedes Experiment wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt.

Das aus der Aminosäuresequenz errechnete Molekulargewicht des endogenen EphA3-Rezeptors aus dem Hühnchen (*Gallus Gallus*) beträgt ca. 110 kDa. Werden die Blotmembranen mit einem Antikörper gegen EphA3 (Santa Cruz, L-18) inkubiert und anschließend mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion ausgewertet, so zeigen sich zwei deutliche Banden bei ca. 115 kDa und 72 kDa. Es fällt auf, dass die Bande bei 72 kDa deutlich stärker ausgeprägt ist (Abb. 3-4 A). Zur Auswertung werden die integrierten Pixelintensitäten der einzelnen Banden ausgemessen. Normiert auf die Bande des Haushaltsproteins GAPDH zeigt die 72 kDa-Bande eine vier bis fünfmal höhere Intensität als die 115 kDa-Bande. Zwar ist der Stichprobenumfang klein, aber ein Vergleich der 115 kDa-Bande zwischen temporalen und nasalen Retinalysaten ergibt eine leichte Tendenz zu höheren Pixelintensitäten bei temporalen Lysaten. Der Quotient der Bandenintensität (temporal/nasal) ergibt den Wert 1,5. Die 72 kDa-Bande lässt hingegen keine Unterschiede erkennen (der Quotient liegt bei 0,9).

Das Ergebnis dieses Kontrollversuchs lässt vermuten, dass Retina-Zellen im untersuchten Stadium EphA3-Rezeptoren exprimieren, die mit der beschriebenen Methode nachgewiesen werden können. Gründe für die fehlende Detektion nach der Proteinisolierung aus retinalen Wachstumskegeln dürften demnach in einer zu geringen Sensitivität der Nachweismethode liegen. Aus diesem Grunde wird im Folgenden versucht, eventuelle Veränderungen des EphA3-Rezeptorlevels während der Desensitivierung und Resensitivierung anhand immunhistochemischer Färbungen nachzuweisen.

### **3.3 Immunhistochemische Färbung des EphA3-Rezeptors an Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen des Hühnchens**

#### **3.3.1 Vergleich zwischen oberflächenständiger und intrazellulärer Lokalisation des Rezeptors**

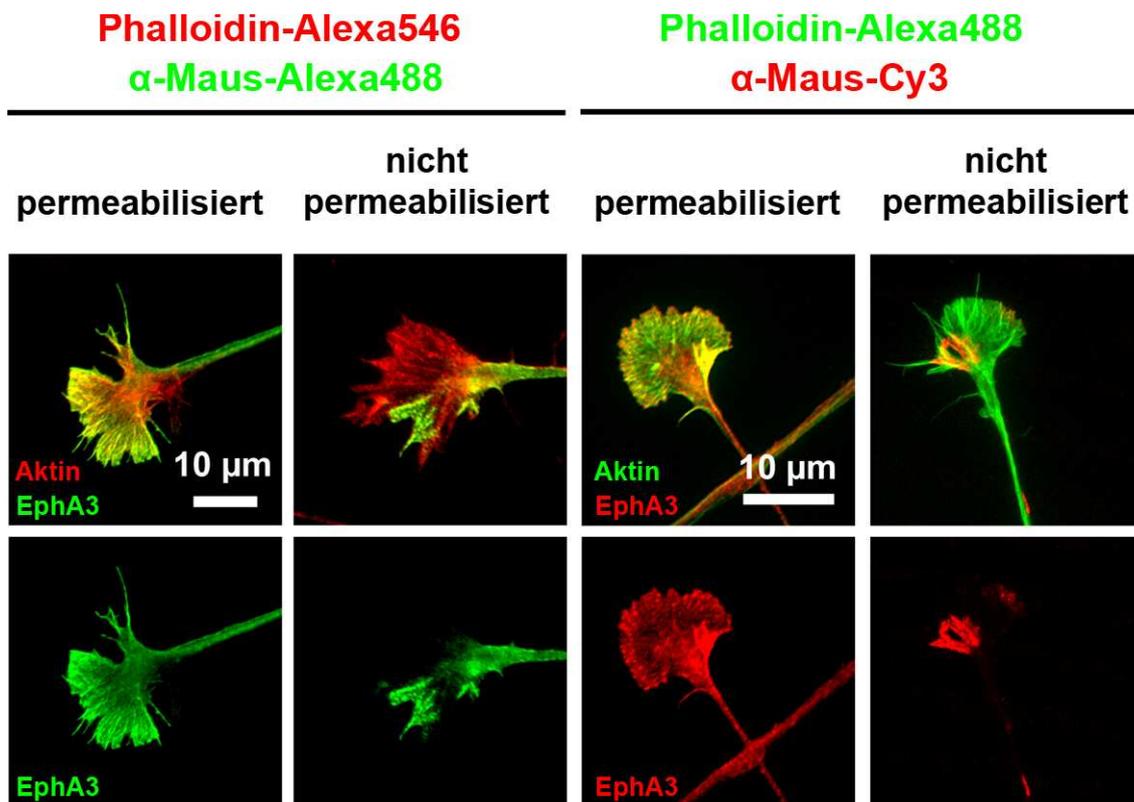
Mit der beschriebenen biochemischen Methode können aus Wachstumskegeln isolierte EphA3-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2). Demzufolge können auf diesem Weg auch keine Aussagen darüber getroffen werden, ob Wachstumskegel während der Desensitivierung ihren Gehalt an Rezeptoren verändern. Eventuelle Veränderungen am EphA3-Rezeptorgehalt sollen deshalb anhand immunhistochemischer Färbungen erfasst werden.

Zur Anfärbung wird ein monoklonaler Antikörper gegen den EphA3-Rezeptor verwendet, der von Uwe Drescher (MRC Center for Developmental Neurobiology, King's College, London) zur Verfügung gestellt wurde (Iwamasa *et al.*, 1999). Der Antikörper wurde bereits erfolgreich zur Färbung von Nervenfasern am optischen Nervaustritt eingesetzt und erkennt ein Epitop am N-terminalen Ende des Rezeptors, d.h. im extrazellulären Bereich (Hornberger, *et al.*, 1999).

Zunächst werden Färbungen an retinalen Wachstumskegeln durchgeführt, die auf Laminin-Substraten wachsen, um einen generellen Überblick über die Lokalisation des Rezeptors und die Spezifität des Antikörpers zu erhalten. Um zwischen oberflächenständiger und intrazellulärer Lokalisation des Rezeptors unterscheiden zu können, werden die Wachstumskegel vor der Färbung in einen Fall mit TritonX-100 permeabilisiert. Im anderen Fall unterbleibt die Permeabilisierung. Eine fehlende Permeabilisierung soll das Eindringen des Antikörpers ins intrazelluläre Kompartiment verhindern.

In Abb. 3-5 sind Wachstumskegel gezeigt, die mit Fluorophor-markiertem Phalloidin und dem beschriebenen Antikörper gegen EphA3 gefärbt sind. Um auszuschließen, dass der konjugierte

Fluorophor oder der Detektionskanal des Mikroskops das sichtbare Färbemuster beeinflusst, sind zwei Färbungen mit unterschiedlichen Sekundärantikörpern gezeigt. Im einen Fall handelt es sich um einen Alexa488-konjugierten  $\alpha$ -Maus-Antikörper, im anderen Fall um einen Cy3-konjugierten  $\alpha$ -Maus-Antikörper. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (ApoTome Imager Z1) und integrierter Farbkamera (AxioCam MRm CCD Farbkamera) gemacht.



**Abb. 3-5. Immunhistochemische Färbung des EphA3-Rezeptors an retinalen Wachstumskegeln.** Die Abbildung zeigt Wachstumskegel temporaler retinaler Ganglienzellen, die mit Fluorophormarkiertem Phalloidin und einem Antikörper gegen den EphA3-Rezeptor gefärbt wurden. Im einen Fall wurde Alexa546-markiertes Phalloidin und ein Alexa488-konjugierter Sekundärantikörper zur EphA3-Färbung eingesetzt (linke Hälfte der Abbildung, rot=Aktin, grün=EphA3). Im anderen Fall wurde Alexa488-markiertes Phalloidin und ein Cy3-markierter Sekundärantikörper eingesetzt (rechte Hälfte der Abbildung, rot=EphA3, grün=Aktin). Werden die Wachstumskegel permeabilisiert, so ist eine homogene Färbung des gesamten Wachstumskegels zu beobachten. Unterbleibt die Permeabilisierung, so treten EphA3-immunreaktive Patches an scheinbar zufälligen Stellen auf.

Werden die Wachstumskegel permeabilisiert, so ist eine homogene Färbung des gesamten Wachstumskegels zu beobachten. Unterbleibt die Permeabilisierung, so sind Patches an scheinbar zufälligen Stellen des Wachstumskegels zu sehen. Dies lässt zunächst vermuten, dass EphA3-Rezeptoren vor dem Einbau in die Wachstumskegelmembran, d.h. unter Umständen

während des intrazellulären Transports, homogen im Wachstumskegel verteilt sind und nach dem Einbau aggregiert vorliegen.

#### **3.3.2 Analyse der Rezeptorverteilung mittels hochauflösender Mikroskopie**

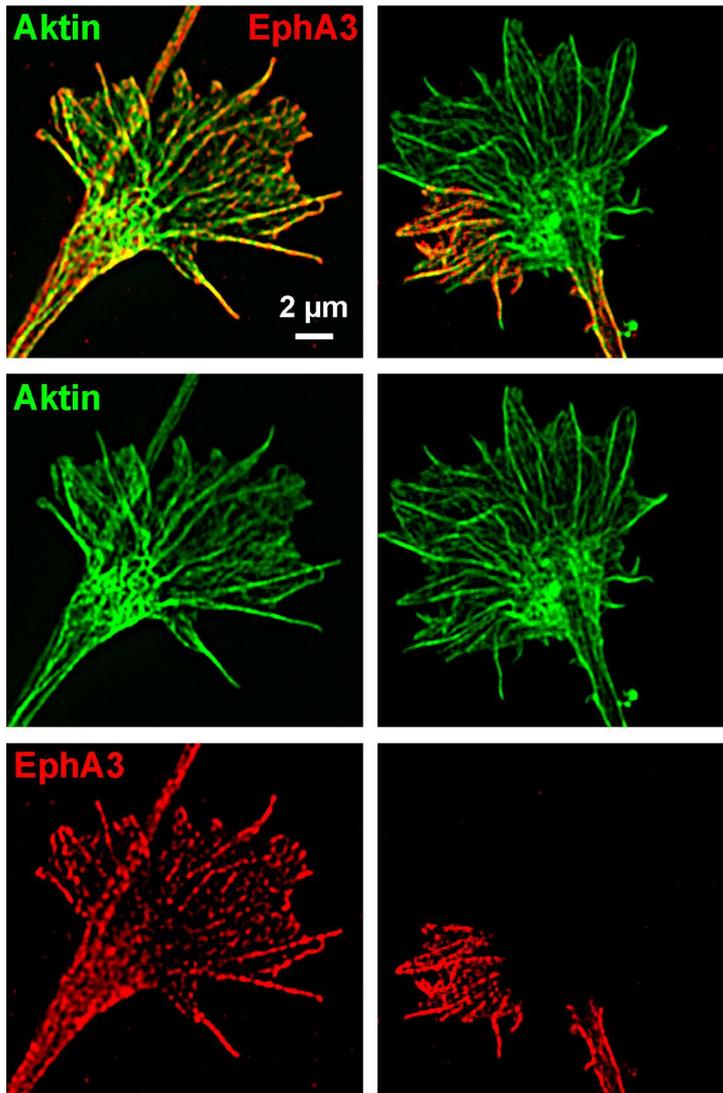
Eph-Rezeptoren liegen unter bestimmten Bedingungen in Form von Clustern in der Zellmembran vor (Wimmer-Kleikamp *et al.*, 2004; Egea, *et al.*, 2005; Himanen *et al.*, 2010). Nach der Bindung eines Ephrin-Liganden kann die Größe der sich ausbildenden Cluster die eigentliche Ephrin/Eph-Kontaktfläche übersteigen. Auch konnte gezeigt werden, dass die Clusterbildung nicht zwangsläufig einen Kontakt zwischen Rezeptor und Ligand voraussetzt (Wimmer-Kleikamp *et al.*, 2004).

In den in 3.3.1 beschriebenen Experimenten wurde beobachtet, dass die EphA3-Immunreaktivität (IR) in Form von Patches an scheinbar zufälligen Stellen des Wachstumskegels auftritt, sofern keine Permeabilisierung der Wachstumskegel erfolgt. Die Größe dieser Patches beträgt stellenweise bis zu 30 % der Wachstumskegelfläche. Bisher wurden in neuronalen Wachstumskegeln ausschließlich Cluster im Mikrometer- oder Submikrometerbereich beobachtet (Egea *et al.*, 2005; Marquardt *et al.*, 2005).

Um die Lokalisation des EphA3-Rezeptors genauer zu charakterisieren, werden gefärbte retinale Wachstumskegel durch ein Hochauflösungsmikroskopie-Verfahren untersucht. Eingesetzt wird dabei die SIM-Mikroskopie (Structured Illumination Microscopy). Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass laterale Auflösungen bis zu 100 nm erreicht werden können. Die konventionelle Mikroskopie erreicht nur ca. 200 nm (Gustafsson, 2000).

In Abb. 3-6 sind Wachstumskegel gezeigt, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und dem bereits beschriebenen Antikörper gegen EphA3 gefärbt wurden. Wie bereits dargestellt, so sind auch nach dieser Analyse Unterschiede zwischen permeabilisierten und nicht permeabilisierten Wachstumskegeln zu erkennen. Werden die Wachstumskegel permeabilisiert, so zeigt die EphA3-IR eine Färbung des gesamten Wachstumskegels. Ohne Permeabilisierung treten Patches auf. Auffällig ist, dass die EphA3-IR in beiden Fällen stark mit Aktin kolokalisiert. Das Aktin-Muster (dargestellt in grün) ist in der EphA3-IR (dargestellt in rot) deutlich wiederzuerkennen. Der gefärbte EphA3-Rezeptor wäre demnach in vielen, dicht aneinandergereihten Punkten entlang der Aktin-Fasern ausgerichtet.

permeabilisiert    nicht permeabilisiert



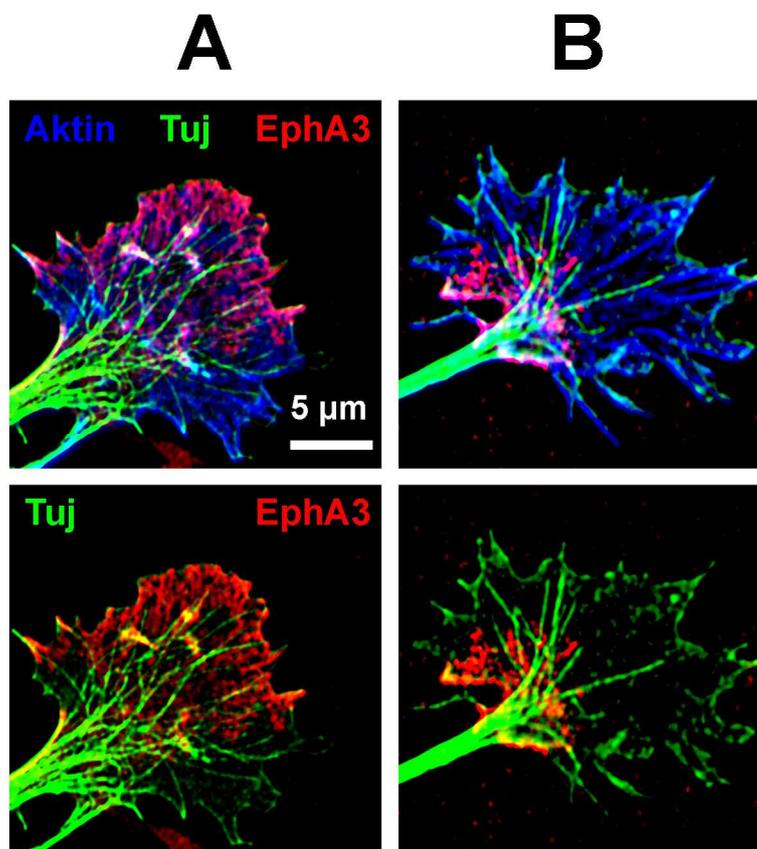
**Abb. 3-6. Untersuchung der EphA3-Färbung mittels hochauflösender SIM-Mikroskopie.**

Die Untersuchung weist eine Kolokalisation der EphA3-Färbung mit Phalloidin-gefärbten Aktin-fasern nach. Dieses Phänomen tritt sowohl nach einer Permeabilisierung als auch ohne Permeabilisierung der Wachstumskegel auf. Die Abbildung zeigt zwei Wachstumskegel, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und dem Antikörper gegen EphA3 gefärbt wurden. Zur EphA3-Detektion wurde ein Cy3-konjugierter  $\alpha$ -Maus-Antikörper verwendet (grün=Aktin, rot=EphA3). Werden die Axone permeabilisiert, so zeigt sich eine Färbung des gesamten Wachstumskegels, erfolgt keine Permeabilisierung treten Patches an scheinbar zufälligen Stellen auf. In beiden Fällen überlappen EphA3- und Phalloidin-Färbung

Die Kolokalisation eines Membranrezeptors mit Aktin, einem zentralen Bestandteil des Zytoskeletts, wurde bisher nur wenig beobachtet (Puthenveedu *et al.*, 2010). Stattdessen gibt es Hinweise darauf, dass die Diffusion von Rezeptoren in der Membran und auch die gezielte Umverteilung von axonalen Lenkungsrezeptoren entlang von Mikrotubuli erfolgt (Bouzigues *et al.*, 2007; Jaqaman *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wird auch die Verteilung der Mikrotubuli in retinalen Wachstumskegeln gemeinsam mit EphA3 untersucht. Dazu werden retinale Wachstumskegel zunächst ohne Permeabilisierung mit dem EphA3-Antikörper gefärbt. Nach erfolgter Inkubation mit dem Sekundärantikörper wird für 5 min mit TritonX-100 permeabilisiert und anschließend mit einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ 3-Tubulin (Tuj) und

Alexa647-markiertem Phalloidin gefärbt. Exemplarische Wachstumskegel sind in Abb. 3-7 dargestellt.

In Abb. A und B ist das angefärbte Aktin in blau, EphA3 in rot und Tubulin (=Tuj) in grün gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die auftretende EphA3-IR nicht mit den Tubulin-Filamenten kolokalisieren. Auch eine Orientierung der Mikrotubuli-Filamente in Richtung der Patches wird nicht beobachtet. Die Mikrotubuli liegen im Axonschaft gebündelt vor und fächern sich beim Übergang in den Wachstumskegel gewissermaßen auf. Eine spezifische Ausrichtung in eine bestimmte Richtung kann nicht gezeigt werden.



**Abb. 3-7. Lokalisation von EphA3 und Mikrotubuli in retinalen Wachstumskegeln.**

Die Anfärbung von oberflächenständigem EphA3 und  $\beta$ 3-Tubulin in retinalen Wachstumskegeln zeigt keine Kolokalisation der beiden Strukturen. In Abb. A und B sind Wachstumskegel gezeigt, die mit Alexa647-konjugiertem Phalloidin, dem EphA3-Antikörper und einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ 3-Tubulin (=Tuj) gefärbt wurden. Zur EphA3-Detektion wurde ein Cy3-konjugierter  $\alpha$ -Maus-Antikörper und zur Mikrotubuli-Detektion ein Alexa488-konjugierter  $\alpha$ -Kanninchen-Antikörper verwendet. (blau=Aktin, rot=EphA3, grün=Mikrotubuli). Die Färbungen zeigen keine Kolokalisation der EphA3-IR mit Mikrotubuli. Auch eine Orientierung der Mikrotubuli in Richtung der Patches wird nicht beobachtet.

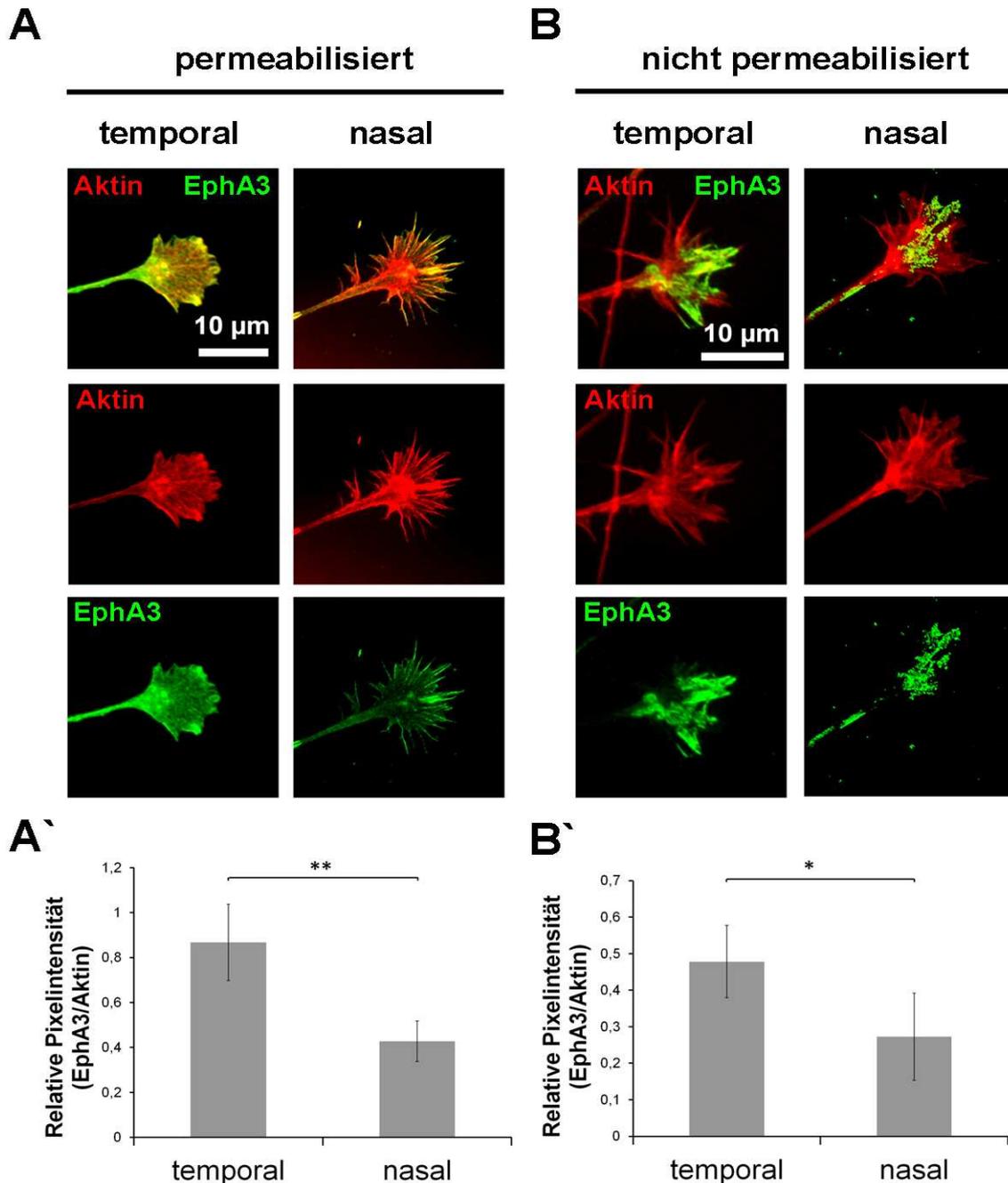
Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels hochauflösender SIM-Mikroskopie zeigen sowohl im permeabilisierten als auch im nicht permeabilisierten Fall eine Kollokalisierung der EphA3-IR mit den Phalloidin-gefärbten Aktinfasern im Wachstumskegel. Eine ähnliche Kollokalisierung mit Mikrotubuli kann nicht nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Quantitative Analyse des Rezeptorgehaltes von retinalen Wachstumskegeln

Im Hühnchen werden EphA3-Rezeptoren in einem von nasal nach temporal ansteigenden Gradienten in der Retina exprimiert (Cheng *et al.*, 1995; McLaughlin und O'Leary, 2005). Um zu testen, ob die Unterschiede im EphA3-Rezeptorgehalt *in vitro* erfasst werden können, werden temporale und nasale Axone immunhistochemisch angefärbt. Abb. 3-8 zeigt temporale und nasale Wachstumskegel, die mit Alexa546-konjugiertem Phalloidin und dem beschriebenen Antikörper gegen EphA3 gefärbt wurden. Zur EphA3-Detektion wird ein Alexa488-konjugierter  $\alpha$ -Maus-Antikörper verwendet. Um die Ergebnisse quantitativ zu erfassen wird die integrierte EphA3- und Phalloidin-Fluoreszenzintensität im Wachstumskegel gemessen. In den Diagrammen ist jeweils die auf Phalloidin normierte EphA3-Fluoreszenzintensität dargestellt.

In den Abbildungen 3-8 A und A` sind die Versuchsergebnisse nach einer Permeabilisierung der Wachstumskegel vor der Färbung gezeigt. Wie bereits in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, zeigt nach einer Permeabilisierung der gesamte Wachstumskegel eine homogene EphA3-IR. Unterschiede zwischen temporalen und nasalen Wachstumskegeln sind sowohl an der Färbung (A) als auch nach der quantitativen Auswertung (A`) zu erkennen. Nasale Wachstumskegel zeigen eine schwächere Färbung als temporalen Wachstumskegel. Der Quotient aus EphA3-Fluoreszenz und Phalloidin-Fluoreszenz ergibt bei temporalen Wachstumskegeln einen Wert von 0,87 und bei nasalen Wachstumskegeln einen Wert von 0,43.

Ähnliches wird auch für Wachstumskegel beobachtet, die vor der Färbung nicht permeabilisiert wurden (Abb. 3-8 B und B`). Die EphA3-IR zeigt die bereits beschriebenen Patches an scheinbar zufälligen Stellen des Wachstumskegels. Auch nach dieser Färbung sind Unterschiede zwischen temporalen und nasalen Wachstumskegeln erkennbar. Nasale Wachstumskegel zeigen eine schwächere Färbung als Temporalen (B). Der Quotient aus EphA3-Fluoreszenz und Phalloidin-Fluoreszenz ergibt hier bei temporalen Wachstumskegeln einen Wert von 0,48 und bei nasalen Wachstumskegeln einen Wert von 0,27 (B`).



**Abb. 3-8. Analyse des EphA3-Rezeptorgehaltes von temporalen und nasalen Wachstumskegeln.** Durch immunhistochemische Färbungen können Unterschiede im EphA3-Rezeptorgehalt von temporalen und nasalen Wachstumskegeln nachgewiesen werden. Die Färbung erfolgt dabei entweder nach einer vorhergehenden Permeabilisierung der Wachstumskegel (A und A') oder ohne Permeabilisierung (B und B') (A und B) Die Abbildungen zeigen temporale und nasale Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen, die mit Alexa546-konjugiertem Phalloidin und einem Antikörper gegen EphA3 gefärbt wurden. Zur EphA3-Detektion wird ein Alexa488-konjugierter  $\alpha$ -Maus-Antikörper verwendet (rot=Aktin, grün=EphA3). (B und B') Die Diagramme zeigen die quantitativen Auswertungen der Immunfluoreszenzen. Dargestellt ist der Quotient aus integrierter EphA3-Fluoreszenz und integrierter Phalloidin-Fluoreszenz im Wachstumskegel. Jedes Experiment wurde vier Mal unabhängig voneinander durchgeführt (A', permeabilisiert, temporal, n=38; A', permeabilisiert, nasal, n=40; B', nicht permeabilisiert, temporal, n=137; B', nicht permeabilisiert, nasal, n=68). Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt.

Die beschriebene quantitative Auswertung erfasst die Intensität der EphA3-Fluoreszenz im Wachstumskegel. Speziell im Experiment ohne Permeabilisierung der Wachstumskegel kann das Färbemuster der EphA3-IR auch auf andere Art und Weise ausgewertet werden. Da die EphA3-IR ein Patch-förmiges Muster erkennen lässt, wird die Größe dieser Patches gemessen. Auch hier werden signifikante Unterschiede zwischen der temporalen und nasalen Axonpopulation gemessen. Der Quotient aus der Fläche der Patches und der Fläche der Wachstumskegel beträgt bei temporalen Wachstumskegeln  $0,23 \pm 0,04$  und bei nasalen Wachstumskegeln  $0,13 \pm 0,039$  (temporal,  $N=4$ ,  $n=123$ ; nasal,  $N=4$ ,  $n=51$ ; Signifikanzniveau  $\alpha=0,013$ ).

Diese Versuche zeigen, dass mit dem verwendeten Antikörper Unterschiede im EphA3-Rezeptorgehalt zwischen temporalen und nasalen retinalen Wachstumskegeln auch *in vitro* erfasst werden können.

### **3.4 Analyse des EphA3-Rezeptorgehaltes von retinalen Wachstumskegeln während des Wachstums auf Adaptationssubstraten**

EphA-Rezeptoren werden in einem von nasal nach temporal ansteigenden Gradienten in der Retina exprimiert (Cheng *et al.*, 1995; McLaughlin und O'Leary, 2005). Diese Verteilung erklärt, warum nasale Axone weniger auf Substrat-gebundenes Ephrin-A5 reagieren (von Philipsborn *et al.*, 2006b): es stehen zu wenige Rezeptoren zur Verfügung, die das repulsive Signal vermitteln. Desensitivierte temporale Axone zeigen, ebenso wie nasale Axone, eine schwächere Reaktion auf Substrat-gebundenes Ephrin-A5 (von Philipsborn *et al.*, 2006b; von Philipsborn, 2007; Abschnitt 1.4 dieser Arbeit). Demzufolge wäre ein Adaptationsmechanismus denkbar, in dem temporale Axone während der Desensitivierung ihr Rezeptorniveau dem der nasalen Axone angleichen und während der Resensitivierung das ursprüngliche Rezeptorniveau wieder herstellen. Die in Abschnitt 3.3.3 vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass mit dem verwendeten Antikörper gegen EphA3 derartige Unterschiede erfasst werden können. Daher wird der EphA3-Gehalt adaptierter und nicht adaptierter temporaler Axone mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht.

Dazu werden temporale Retina-Explantate diagonal auf Adaptationssubstraten ausgelegt. Ein Teil jedes Explantats hat somit Kontakt zur Laminin-Oberfläche, der andere Teil zur Ephrin-A5/Fc-Oberfläche. Über Nacht wachsen Axone aus den Explantaten aus, die

anschließend fixiert und sowohl mit Fluorophor-markiertem Phalloidin als auch dem Antikörper gegen EphA3 gefärbt werden. Da nur die Rezeptoren in der Wachstumskegelmembran von Interesse sind, erfolgt keine Permeabilisierung vor der Färbung.

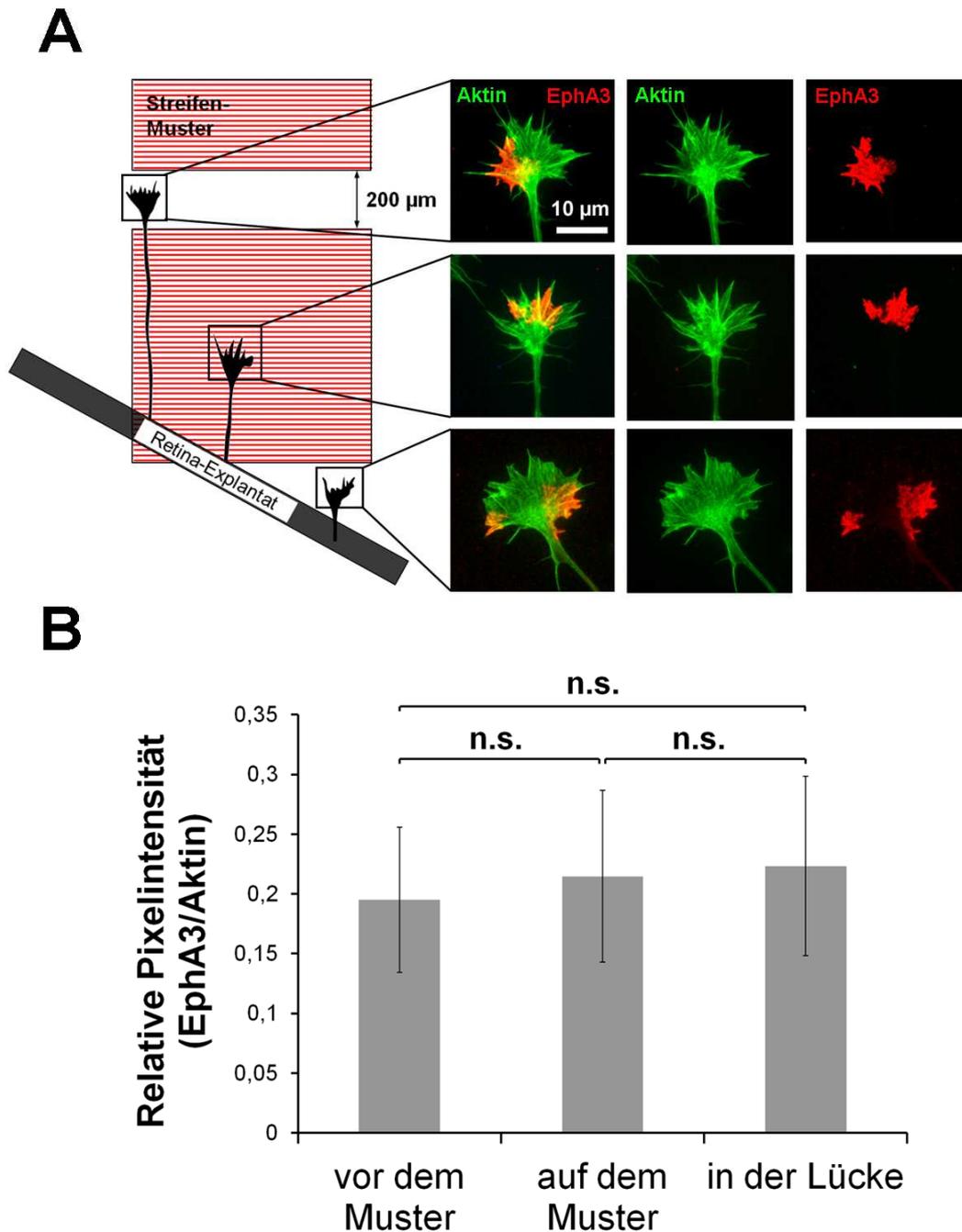
Werden Retina-Explantate auf die beschriebene Art und Weise auf der Oberfläche ausgelegt, so können drei verschiedene Arten von Wachstumskegeln unterschieden werden (siehe Abb. 3-10):

- (1) Wachstumskegel, die auf der Laminin-Oberfläche auswachsen und keinen Kontakt zum gestempelten Ephrin-A5/Fc haben.
- (2) Wachstumskegel, die auf der gestempelten Ephrin-A5/Fc-Oberfläche wachsen und sich, wie gezeigt wurde, in einem desensitivierten Zustand befinden.
- (3) Wachstumskegel, die in der mit Laminin beschichteten Lücke wachsen und gerade resensitivieren.

Die Axonpopulation, die auf der Laminin-Oberfläche auswächst, bildet eine Stoppfront aus, sobald sie das erste Mal auf gestempeltes Ephrin-A5 trifft. Diese Reaktion weist ein funktionales Ephrin-Muster nach.

Die Analyse von Axonen dieser drei Kategorien zeigt keinen Unterschied in der EphA3-IR. Sowohl unbeeinflusste Wachstumskegel, als auch desensitivierte und resensitivierende Wachstumskegel weisen eine EphA3-IR in der Membran auf. Dies ist sowohl phänotypisch (Abb. 3-9 A) als auch nach Quantifizierung der Immunfluoreszenz (Abb. 3-9 B) erkennbar. Das Diagramm im Abbildungsteil B zeigt den Quotienten aus integrierter EphA3-Fluoreszenz und integrierter Phalloidin-Fluoreszenz. Signifikante Unterschiede werden nicht detektiert.

Eine Veränderung des EphA3-Rezeptorgehaltes während der Desensitivierung und Resensitivierung kann demzufolge nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 3-9. EphA3-Rezeptorgehalt von retinalen Wachstumskegeln während des Wachstums auf Adaptationssubstraten.**

Werden unbeeinflusste, desensitivierte und resensitivierende Wachstumskegel mit dem beschriebenen EphA3-Antikörper angefärbt, so sind keine Unterschiede in der EphA3-IR zu erkennen. Die Färbung erfolgt dabei ohne eine vorhergehende Permeabilisierung der Wachstumskegel. (A) Die Abbildung zeigt das Versuchsschema und temporale Wachstumskegel, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und dem beschriebenen EphA3-Antikörper gefärbt wurden. Zur EphA3-Detektion wurde ein Cy3-konjugierter  $\alpha$ -Maus-Antikörper verwendet (grün=Aktin, rot=EphA3). (B) Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung der EphA3- und der Phalloidin-Fluoreszenz. Dargestellt ist der Quotient aus integrierter EphA3-Fluoreszenz und integrierter Phalloidin-Fluoreszenz im Wachstumskegel. Jedes Experiment wurde mindestens siebenmal unabhängig voneinander durchgeführt (vor dem Muster, N=8, n=169; auf dem Muster, N=8, n=209; in der Lücke, N=7, n=87). Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt.

### **3.5 Kontrollfärbungen zur Überprüfung der Spezifität des EphA3-Antikörpers**

#### **3.5.1 Kontrollfärbung ohne Primärantikörper**

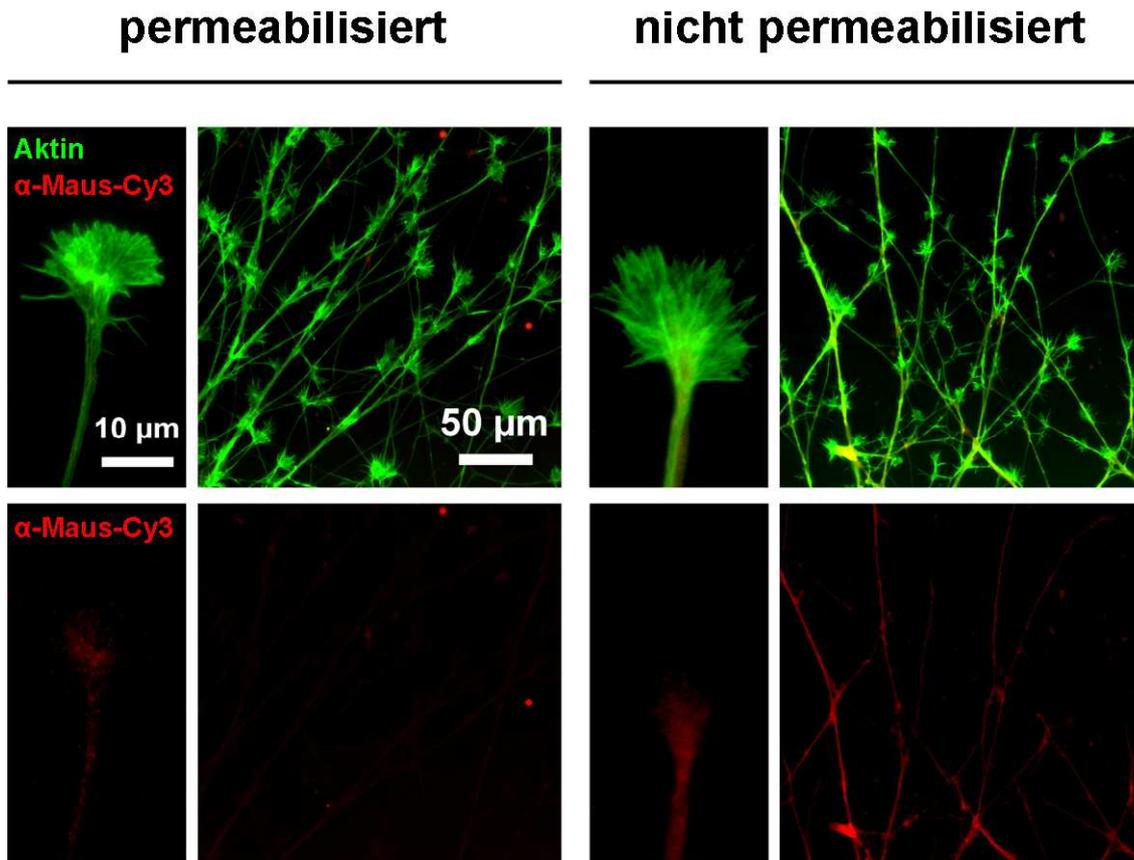
Die Anfärbung des EphA3-Rezeptors mit dem verwendeten monoklonalen Antikörper führt zu zwei wesentlichen Erkenntnissen:

- (1) Werden die retinalen Axone vor der Färbung nicht permeabilisiert, so ergibt das Färbemuster Patches an scheinbar zufälligen Stellen des Wachstumskegels.
- (2) Sowohl nach einer vorhergehenden Permeabilisierung als auch ohne Permeabilisierung ist eine deutliche Kolokalisation der EphA3-IR und der Aktin-Färbung zu sehen.

Um diese beiden, auf den ersten Blick überraschenden, Ergebnisse weiter zu überprüfen und sicherzustellen, dass die Ergebnisse der vorgestellten Quantifizierungen aussagekräftig sind, werden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt.

Eine Standardkontrolle im Rahmen jeder indirekten Immunfärbung ist die Färbung ohne den primären Antikörper. Statt einer Inkubation mit dem EphA3-Antikörper werden die Axone unter gleichen Bedingungen ausschließlich im Blockierungspuffer (1 % BSA in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper bleibt unverändert. Damit wird überprüft, ob das Färbemuster durch Artefakte des Sekundärantikörpers hervorgerufen wird.

Abb. 3-10 zeigt Axone, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und dem Sekundär-Antikörper  $\alpha$ -Maus-Cy3 gefärbt wurden.



**Abb. 3-10. Kontrollversuch zur EphA3-Antikörperfärbung ohne Primärantikörper**

Werden Axone retinaler Ganglienzellen statt mit dem EphA3-Primärantikörper in Blockierungspuffer (1 % BSA in PBS) inkubiert, so ist nach Behandlung mit einem  $\alpha$ -Maus-Cy3-Sekundärantikörper keine spezifische Färbung zu erkennen. Dieses Ergebnis tritt sowohl nach einer Permeabilisierung (links) als auch ohne Permeabilisierung (rechts) der Wachstumskegel ein und weist darauf hin, dass die beobachteten EphA3-Färbemuster nicht auf Artefakte des Sekundärantikörpers zurückzuführen sind. Die Abbildung zeigt Axone und Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und einem  $\alpha$ -Maus-Cy3-Antikörper gefärbt wurden. An Stelle einer Färbung mit dem beschriebenen EphA3-Primärantikörper erfolgte die Inkubation in 1 % BSA. Das gleiche Ergebnis tritt bei einer Färbung mit Alexa546-konjugiertem Phalloidin und einem  $\alpha$ -Maus-Alexa488-Antikörper ein. Jedes Experiment wurde zweimal unabhängig voneinander mit gleichem Ergebnis durchgeführt.

Es ist zu erkennen, dass der Sekundärantikörper keine Färbung der Wachstumskegel hervorruft. Nur eine übliche, leichte Hintergrundfluoreszenz ist erkennbar. Das gleiche Ergebnis tritt bei der Verwendung einer anderen Phalloidin/Antikörper-Kombination ein. Auch die Färbung mit Alexa546-konjugiertem Phalloidin und einem  $\alpha$ -Maus-Alexa488-Antikörper ergibt ausschließlich eine leichte Hintergrundfluoreszenz durch den Sekundärantikörper.

Daraus kann abgeleitet werden, dass das Patch-artige Färbemuster und die Kolokalisation mit Aktin nach der EphA3-Färbung scheinbar nicht auf unspezifische Effekte der beiden verwendeten Sekundärantikörper zurückzuführen sind.

#### 3.5.2 Anfärbung nicht-neuronaler Zellen

Eine weitere Möglichkeit, die bei der Interpretation der EphA3-IR in Betracht gezogen werden muss, ist eine unspezifische Bindung des primären EphA3-Antikörpers an das Aktin-Zytoskelett.

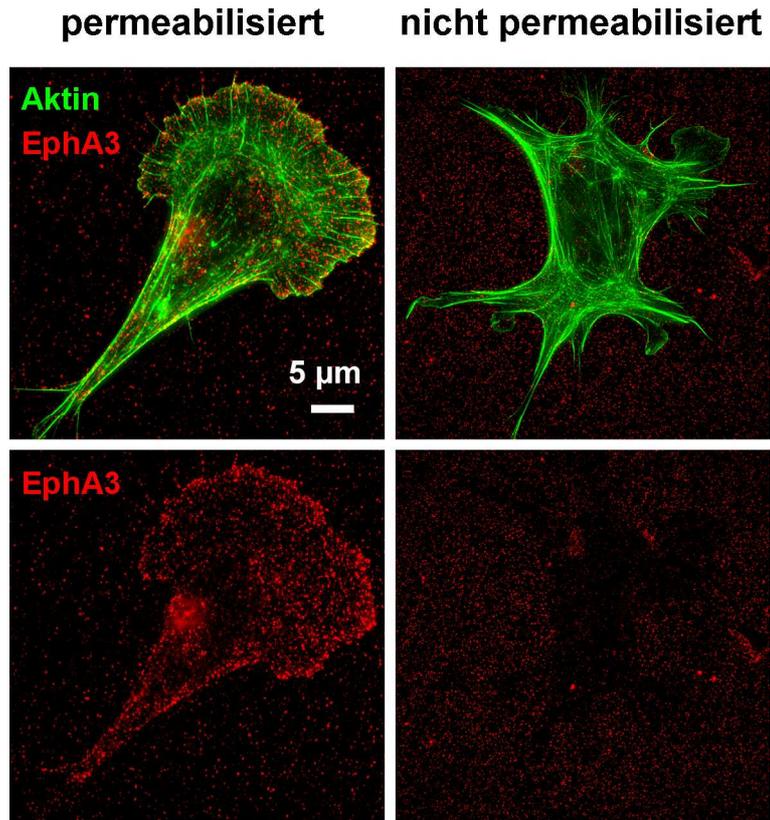
Um dies zu überprüfen werden EphA3-Färbungen an drei Zelllinien durchgeführt, bei denen eine Expression des Rezeptors bisher nicht nachgewiesen wurde. Dabei handelt es sich um embryonale Maus-Fibroblasten (MEF), Hela-Zellen und humane Epithelzellen eines Alveolarkarzinoms (B16-Zellen).

Abb. 3-11 zeigt embryonale Fibroblasten, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und dem verwendeten EphA3-Antikörper gefärbt wurden. Zur EphA3-Detektion wurde ein Cy-3-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Im linken Abbildungsteil (permeabilisiert) ist ein migrierender Fibroblast dargestellt, der sich durch die Ausbildung großer Lamellipodien auszeichnet. Diese Struktur ist hinsichtlich der Organisation des Aktin-Zytoskeletts mit einem Wachstumskegel vergleichbar (Ridley *et al.*, 2003; Lowery und Van Vactor, 2009). Die Färbung mit dem EphA3-Antikörper lässt keine Aktinfasern erkennen. Zwar ist eine Anreicherung der in rot dargestellten EphA3-Färbung im Lamellipodium zu beobachten, aber eine Kolo-kalisation mit den auftretenden Aktinfasern bzw. eine unspezifische Färbung anderer definierter zellulärer Strukturen kann nicht gezeigt werden. Weder nach einer Permeabilisierung der Zellen noch im unpermeabilisierten Zustand. Das gleiche Ergebnis wird auch nach Anfärbung von Hela- und B16-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Eine unspezifische Bindung des primären EphA3-Antikörpers an das Aktin-Zytoskelett scheint demzufolge unwahrscheinlich.

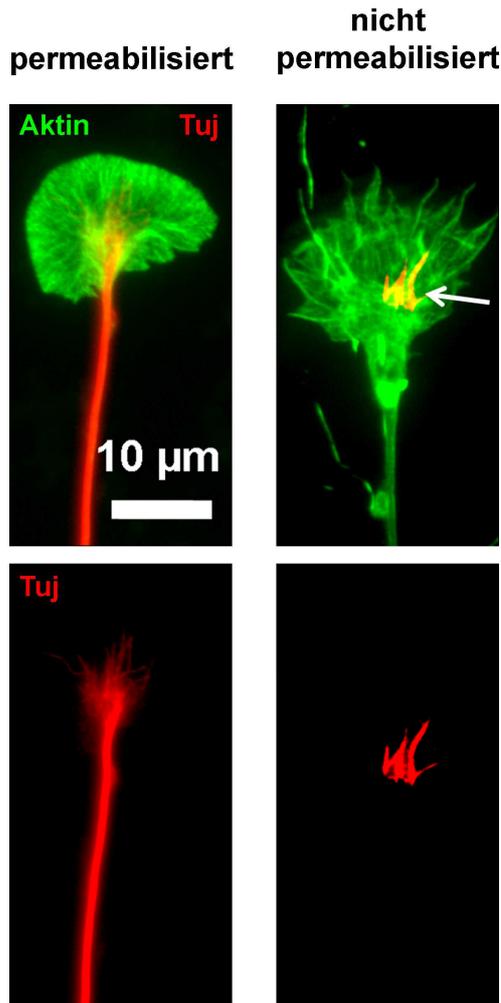
**Abb. 3-11. EphA3-Färbung an nicht-neuronalen Zellen.**

Werden embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) mit dem EphA3-Antikörper gefärbt, so ist keine Färbung der Aktin-fasern oder anderer definierter zellulärer Strukturen zu erkennen. Dieses Ergebnis tritt sowohl nach einer Permeabilisierung (links) als auch ohne Permeabilisierung (rechts) der Zellen ein und deutet daraufhin, dass der EphA3-Antikörper nicht unspezifisch an Aktin-fasern des Zytoskeletts bindet. Die Abbildung zeigt MEFs, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und dem beschriebenen EphA3-Antikörper gefärbt wurden. Zur EphA3-Detektion wurde ein  $\alpha$ -Maus-Cy3-Antikörper eingesetzt (grün=Aktin, rot=EphA3). Die Färbungen wurden jeweils zweimal unabhängig voneinander mit gleichem Ergebnis durchgeführt. Entsprechende Ergebnisse wurden mit HeLa- und B16-Zellen erzielt (Daten nicht gezeigt).

**3.5.3 Färbung mit einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ 3-Tubulin (Tuj)**

Die in dieser Arbeit untersuchten retinalen Ganglienzellkulturen wurden vor den jeweiligen Färbungen fixiert. Die Fixierung erfolgte in einer Lösung aus 4 % PFA, 0,33 M Saccharose und 0,1 % Glutaraldehyd. Eine Fixierung in Glutaraldehyd kann morphologisch sichtbare Schäden an Wachstumskegelmembranen hervorrufen. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen Löcher in Membranen von Zebrafisch- und Goldfisch-Wachstumskegeln nach einer Fixierung in 2 % Glutaraldehyd (Bastmeyer, nicht publizierte Ergebnisse). Demzufolge wird überprüft, ob das Patch-förmige Muster nach einer EphA3-Färbung durch Membranschäden hervorgerufen wird, die ein Eindringen des Antikörpers ins Zellinnere ermöglichen.

Dieser Test wird mit einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ 3-Tubulin (Tuj) durchgeführt. In Abb. 3-13 sind zwei Wachstumskegel dargestellt, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und dem beschriebenen Tubulin-Antikörper gefärbt wurden (Sekundärantikörper:  $\alpha$ -Kanninchen-Cy3).



**Abb. 3-12. Kontrollfärbung mit einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ 3-Tubulin (Tuj).** Die Anfärbung von Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen mit einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ 3-Tubulin zeigt nach vorhergehender Permeabilisierung (links) eine Tubulinfärbung im Axonschaft. Beim Übergang in den Wachstumskegel fächern sich die Mikrotubuli auf. Erfolgt keine Permeabilisierung (rechts) so treten Patches an unterschiedlichen Stellen des Wachstumskegels auf. Die Abbildung zeigt Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen, die mit Alexa488-konjugiertem Phalloidin und einem polyklonalen Antikörper gegen neuronales  $\beta$ 3-Tubulin (Tuj) gefärbt wurden. Zur Tubulin-Detektion wurde ein  $\alpha$ -Kanninchen-Cy3-Antikörper verwendet. Das gleiche Ergebnis tritt bei einer Färbung mit Alexa546-konjugiertem Phalloidin und einem  $\alpha$ -Kanninchen-Alexa488-Antikörper ein. Die Färbungen wurden zweimal unabhängig voneinander mit gleichem Ergebnis durchgeführt.

Werden die Wachstumskegel permeabilisiert, so ist eine deutliche Tubulin-Färbung im Axonschaft zu erkennen. Beim Übergang des Axons in den Wachstumskegel fächern sich die Mikrotubuli auf. Erfolgt keine Permeabilisierung, so treten auch nach der Tubulin-Färbung Patches an verschiedenen Stellen des Wachstumskegels auf. Diese sind, nach einer ersten Einschätzung, kleiner als die EphA3-Patches. Das gleiche Ergebnis tritt bei der Verwendung einer anderen Phalloidin/Antikörper-Kombination ein: Auch die Färbung mit Alexa546-konjugiertem Phalloidin und einem  $\alpha$ -Kanninchen-Alexa488-Antikörper zeigt Patches im Wachstumskegel.

Es ist demzufolge nicht auszuschließen, dass das beschriebene Patch-artige EphA3-Färbemuster durch Schädigungen der Wachstumskegelmembran hervorgerufen wird, die ein Eindringen des Antikörpers in intrazelluläre Bereiche ermöglichen.

Zusammenfassend können bisher folgende Schlüsse gezogen werden:

Sowohl bereits publizierte Ergebnisse, als auch die vorgestellten Ergebnisse im ersten Teil dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen des Hühnchens gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal Ephrin-A5 desensitivieren und resensitivieren können. Ein möglicher Mechanismus, der diesen beiden Phänomenen zugrunde liegen könnte, beruht auf der Modulation des Rezeptorlevels: Reduzieren Wachstumskegel während der Desensitivierung ihren Gehalt an Eph-Rezeptoren, kann das repulsive Signal nicht mehr vermittelt werden. Die Frage, ob dieser Mechanismus bei der Adaptation gegenüber Ephrin-A5 eine Rolle spielt, konnte durch biochemische Analysen des EphA3-Rezeptors nicht beantwortet werden. Immunhistochemische Untersuchungen deuten daraufhin, dass sich die EphA3-Rezeptormenge während der Desensitivierung und der Resensitivierung nicht ändert. Allerdings bleiben Unklarheiten bezüglich der Spezifität der EphA3-Färbung bestehen. Zwar können mit dem verwendeten Antikörper Unterschiede im Rezeptorgehalt zwischen temporalen und nasalen Wachstumskegeln erfasst werden, jedoch beziehen sich diese Unterschiede auf Aktin-assoziierte Färbungen, die auch im permeabilisierten Zustand sichtbar sind. Nach einer Rezeptorfärbung ohne Permeabilisierung treten Patches an zufälligen Stellen des Wachstumskegels auf, die zumindest teilweise durch Membranschäden hervorgerufen werden könnten.

### Teil III:

## Untersuchung des molekularen Mechanismus der Desensitivierung und Resensitivierung gegenüber Ephrin-A5 bei Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen mithilfe pharmakologischer Inhibitoren

In Teil II der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen während der Adaptation gegenüber Ephrin-A5 ihren Gehalt an EphA3-Rezeptoren verändern. Immunhistochemische Färbungen deuten daraufhin, dass ein solcher Mechanismus bei der Desensitivierung und der Resensitivierung keine Rolle spielt. Desensitivierte und resensitivierende Wachstumskegel scheinen keine Unterschiede hinsichtlich des EphA3-Rezeptorgehaltes aufzuweisen (siehe Abschnitt 3.4).

Um die bisherigen Ergebnisse weiter zu festigen und um zu untersuchen, welche zellulären Mechanismen bei der Adaptation eine Rolle spielen, werden zusätzlich Versuche mit pharmakologischen Inhibitoren durchgeführt. Mithilfe dieser Hemmstoffe werden intrazelluläre Signalwege blockiert, die bei Adaptationsvorgängen eine Rolle spielen könnten. Verändern Axone retinaler Ganglienzellen nach Zugabe eines spezifischen Inhibitors ihr Adaptationsverhalten, so ist eine Beteiligung des untersuchten Signalweges an Desensitivierungs- oder Resensitivierungsvorgängen wahrscheinlich. Eingesetzt werden dabei Dynasore zur Blockierung der Dynamamin-vermittelten Endocytose, Anisomycin (AIM) zur Hemmung der lokalen Proteinsynthese und Peroxovanadat (Pervanadat) als Inhibitor zellulärer Protein-Tyrosin-Phosphatasen. Diese Inhibitoren wurden bereits erfolgreich bei retinalen *Xenopus*-Axonen oder Zelllinien eingesetzt (Castan *et al.*, 1999; Piper *et al.*, 2005; Piper *et al.*, 2006; Macia *et al.*, 2006). Auch konnte eine Beteiligung der adressierten Signalwege an Reaktionen gegenüber axonalen Lenkungssignalen nachgewiesen werden (Fournier *et al.*, 2000; Journey *et al.*, 2002; Ming, *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2005; Shintani *et al.*, 2006).

In Abschnitt 3.6 ist zunächst die Untersuchung der Dynamamin-vermittelten Endocytose bei der Desensitivierung gegenüber gelöstem (3.6.1) und Substrat-gebundenem (3.6.2) Ephrin-A5

gezeigt. Abschnitt 3.7 beschäftigt sich mit der lokalen Proteinsynthese durch den Einsatz von AIM und in Abschnitt 3.8 erfolgt die Untersuchung der Inhibition zellulärer Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

## **3.6 Einfluss der Endocytose auf die Adaptation retinaler Wachstumskegel**

### **3.6.1 Endocytose bei der Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5**

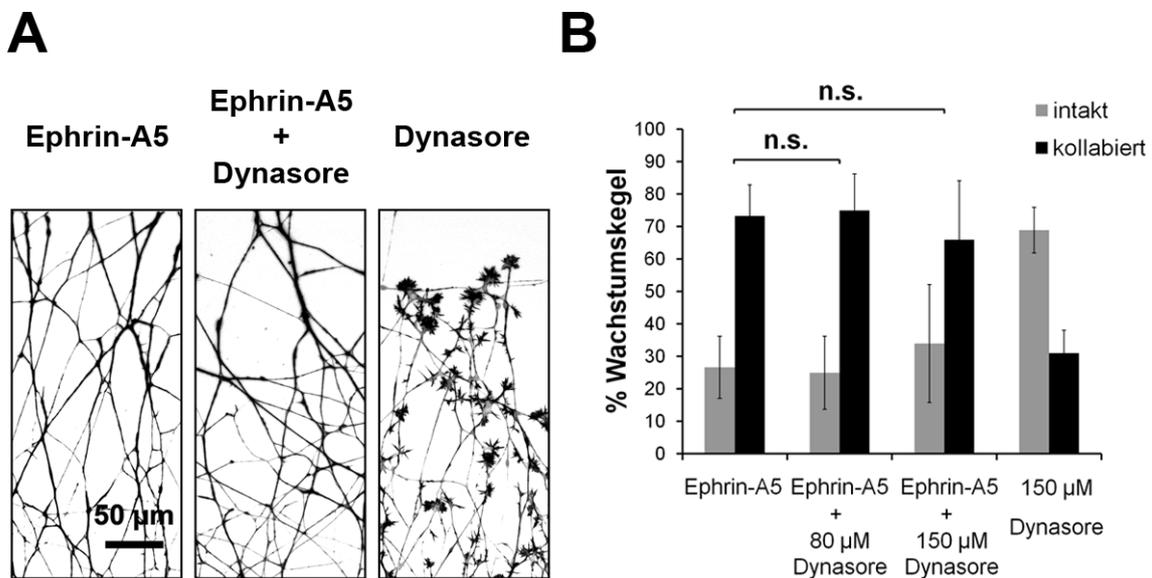
Die zellulären Mechanismen, die der Desensitivierung und der Resensitivierung gegenüber Ephrin-A5 zugrunde liegen, sind noch völlig unbekannt. Ein vorstellbarer Mechanismus beruht auf der Modulation des Rezeptorlevels in der Wachstumskegelmembran. Die im zweiten Teil dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Wachstumskegel während der Desensitivierung und der Resensitivierung ihren Gehalt an oberflächenständigen EphA3-Rezeptoren nicht verändern. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die initialen Reaktionen von Hühnchen-Axonon gegenüber den Lenkungsmolekülen Ephrin-A2 und Sema3A, und auch die Desensitivierung von *Xenopus*-Axonon gegenüber Netrin-1 abhängig von Endocytose-Mechanismen sind (Fournier *et al.*, 2000, Journey *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2005).

Um diesen scheinbaren Widerspruch weiter zu untersuchen, wird der Einfluss der Endocytose auf die Adaptation retinaler Wachstumskegel auch durch pharmakologische Inhibition bestimmt. Dies geschieht mithilfe des Inhibitors Dynasore, der die Aktivität der GTPasen Dynamin1 und Dynamin2 blockiert (Macia *et al.*, 2006; Kirchhausen *et al.*, 2008). Dynamine sind für die Abschnürung von endocytotischen Vesikeln während der Clathrin-vermittelten Endocytose verantwortlich (Takei *et al.*, 2005; Doherty und McMahon, 2009).

Soll der Einfluss der Endocytose auf die Desensitivierung retinaler Wachstumskegel untersucht werden, muss zunächst geprüft werden, ob nach der Inkubation mit dem Inhibitor Veränderungen an der initialen Reaktion auftreten. Um dies zu testen werden Kollaps-Assays mit geclustertem Ephrin-A5/Fc, bei gleichzeitiger Zugabe von 80  $\mu$ M oder 150  $\mu$ M Dynasore durchgeführt. Treten Veränderungen am Ephrin-A5-vermittelten Kollaps auf, so sind die Wiederaufnahme des Wachstums nach Zugabe des Inhibitors und die Kontrollsituation nicht vergleichbar.

Im Gegensatz zu anderen Lenkungsmolekülen ist der Ephrin-A5-vermittelte Kollaps von temporalen Wachstumskegeln unabhängig von Clathrin-vermittelter Endocytose. Für dieses

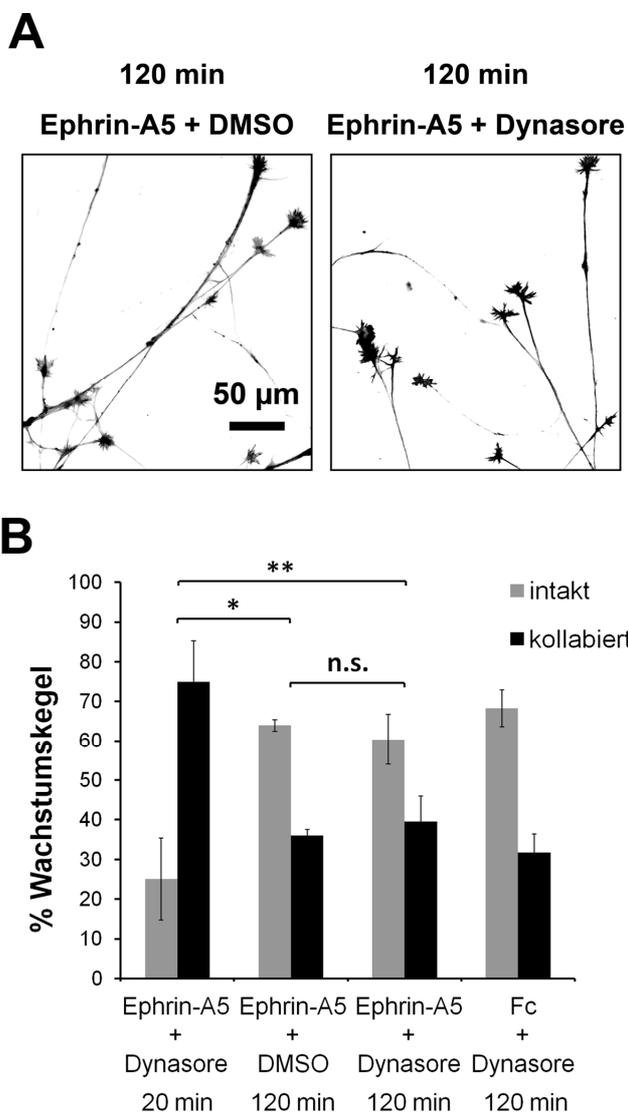
Experiment werden temporale Axone zunächst 30 min in F12-MZ-Medium mit 80  $\mu$ M/150  $\mu$ M Dynasore vorinkubiert. Anschließend wird das Medium abgenommen und neues Medium, das zusätzlich zum Inhibitor 0,25  $\mu$ g/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc enthält für 20 min zugegeben. Nach der Fixierung und Phalloidininfärbung zeigen die Axone einen kollabierten Phänotyp. Morphologische Unterschiede zur Kontrollsituation, in der DMSO statt Dynasore verwendet wird, sind nicht zu erkennen (Abb. 3-13 A). Auch die quantitative Auswertung (Abb. 3-13 B) zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle (73 % kollabierter Wachstumskegel) und den Ansätzen, in denen Dynasore zugegeben wurde (80  $\mu$ M Dynasore: 75 % kollabierter Wachstumskegel, 150  $\mu$ M Dynasore: 65 % kollabierter Wachstumskegel).



**Abb. 3-13. Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf den Ephrin-A5-vermittelten Kollaps.** Dynasore beeinflusst den initialen Ephrin-A5-vermittelten Kollaps nicht. **(A)** Darstellung von Phalloidin-gefärbten Axonen nach einem Ephrin-A5/Fc-vermittelten Kollaps. Die Zugabe von Dynasore führt zu keiner morphologischen Veränderung. **(B)** Quantitative Auswertung der intakten und kollabierten Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Jedes Experiment wurde mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 100 Wachstumskegel ausgezählt (Ephrin-A5, n=521; Ephrin-A5+80  $\mu$ M Dynasore, n=473; Ephrin-A5+150  $\mu$ M Dynasore, n=491; 150  $\mu$ M Dynasore, n=518). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Da der initiale Ephrin-A5-vermittelte Kollaps unabhängig von Clathrin-vermittelter Endocytose ist, kann nun gefragt werden, ob die Wiederaufnahme des Wachstums nach dem Kollaps, d.h. die Fähigkeit gegenüber dem Lenkungssignal zu desensitivieren, vom Inhibitor beeinflusst wird. Um dies zu überprüfen werden temporale Axone für 30 min in F12-MZ-Medium, das zusätzlich 150  $\mu$ M Dynasore enthält, vorinkubiert. Anschließend wird das Medium abgesaugt und neues

Medium, das zusätzlich zum Inhibitor 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc enthält, zugegeben. Nach 120 min werden die Axone fixiert und mit Alexa Fluor488 Phalloidin gefärbt. Abb. 3-14 ist zu entnehmen, dass sich die Wiederaufnahme des Wachstums nach Zugabe von 150 µM Dynasore nicht signifikant von der Kontrollsituation unterscheidet. Nach 120 min zeigen 60 % der Wachstumskegel einen intakten Phänotyp. Wird DMSO statt Dynasore zugegeben zeigen 64 % einen intakten Phänotyp. Sowohl nach Zugabe von DMSO als auch nach Zugabe von Dynasore zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der 20-minütigen Inkubation mit Ephrin-A5 und der 120-minütigen Inkubation.



**Abb. 3-14. Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5.**

Dynasore verhindert nicht die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps. (A) Darstellung von Axonen, die für 120 min in Medium mit 0,25 µg/ml Ephrin-A5/Fc+DMSO oder 0,25 µg/ml Ephrin-A5/Fc+150 µM Dynasore inkubiert wurden (Phalloidininfärbung in schwarz). (B) Quantitative Auswertung der intakten und kollabierten Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (Ephrin-A5+Dynasore, 20 min, N=3, n=355; Ephrin-A5+DMSO, 120 min, N=2, n=219; Ephrin-A5+Dynasore, 120 min, N=4, n=457; Fc+Dynasore, 120 min, N=2, n=233). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Diese Experimente zeigen, dass die Desensitivierung von retinalen Wachstumskegeln des Hühnchens gegenüber gelöstem Ephrin-A5 nicht von Clathrin-vermittelter Endocytose abhängig ist. Die Wiederaufnahme des Wachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps unterscheidet sich nach Zugabe des Inhibitors Dynasore nicht von der Kontrollsituation.

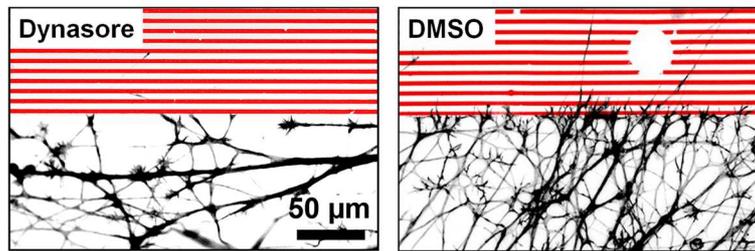
#### **3.6.2 Endocytose bei der Adaptation gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5**

Ephrin-A5 liegt *in vivo* in Membran-gebundener Form vor. Daher beschreiben Experimente, in denen Ephrin-A5 gelöst angeboten wird, die biologische Realität nur unzureichend. Ihr Vorteil liegt zwar in der einfacheren, weitaus weniger zeitaufwändigen Durchführung und dem geringeren Bedarf an Verbrauchsmaterialien, jedoch stehen *in-vitro*-Systeme, die es erlauben, Ephrin-A5 fest an einer Oberfläche zu verankern der *in-vivo*-Situation näher. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit stets beide Formen der Adaptation untersucht - die Adaptation gegenüber löslichem Ephrin-A5 und die Adaptation gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.

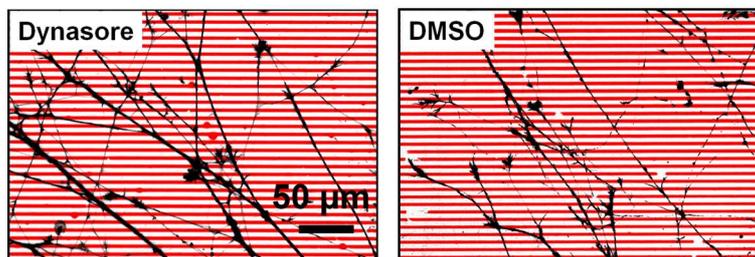
Die Tatsache, dass die initiale Reaktion und die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 nicht von Clathrin-vermittelter Endocytose abhängig sind, schließt nicht aus, dass die Reaktionen gegenüber Substrat-verankertem Ephrin-A5 Clathrin-vermittelte Endocytose erfordern.

Um dies zu testen, wird das Verhalten retinaler Wachstumskegel auf den in 2.2.6 beschriebenen Adaptationssubstraten untersucht. Abb. 3-15 zeigt, dass sowohl die initiale Reaktion auf Substrat-gebundenes Ephrin-A5/Fc, als auch die Fähigkeit auf hohen Ephrin-A5/Fc-Konzentrationen auszuwachsen, nicht von Clathrin-vermittelter Endocytose beeinflusst werden. Das Auswachsen auf hohen Ephrin-A5-Konzentrationen wird als Indiz für eine Desensitivierung gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal gewertet. Zwar lässt dieses Wachstum noch nicht zwangsläufig auf eine Desensitivierung schließen, aber in vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass temporale Axone nach dem Auswachsen auf Ephrin-Substraten in der Lage sind, eine Ephrin-Front nach 50-75 µm breiten Lücken zu ignorieren. Solche Ephrin-Fronten würden normalerweise, bei einem Auswachsen auf Laminin, eine Stoppreaktion auslösen (von Philipsborn, 2007; siehe Abschnitt 1.4). Das zeigt, dass sich die Axone nach dem Auswachsen auf dem Ephrin-Muster tatsächlich in einem desensitvierten Zustand befinden.

## A Initiale Reaktion



## B Auswachsverhalten



**Abb. 3-15. Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf die initiale Reaktion und das Auswachsverhalten gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.**

Die Zugabe von Dynasore beeinflusst weder die initiale Stopp-Reaktion noch das Auswachsverhalten von temporalen Axonen gegenüber Substrat-gebundenem EphrinA5/Fc. (A) Darstellung von Axonen, die auf einer Laminin-Oberfläche ausgewachsen sind und frontal auf ein gestempeltes Ephrin-A5/Fc-Muster treffen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt (Dynasore, 80  $\mu$ M, n=5, Stoppreaktionen: 5; Dynasore, 150  $\mu$ M, n=3, Stoppreaktionen: 2; DMSO, n=3, Stoppreaktionen: 3). (B) Darstellung von Axonen, die unmittelbar auf einem gestempelten Ephrin-A5/Fc-Muster ausgewachsen sind. Jedes Experiment wurde mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt (Dynasore, 80  $\mu$ M, n=9, Axonwachstum auf Ephrin-A5/Fc in sieben Fällen; Dynasore, 150  $\mu$ M, n=7, Axonwachstum auf Ephrin-A5/Fc in fünf Fällen; DMSO, n=4, Axonwachstum auf Ephrin-A5 in drei Fällen).

Die Retina-Explantate wurden über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert, dem entweder Dynasore oder DMSO zugegeben wurde. Die Phalloidin gefärbten Axone sind in schwarz dargestellt, das in einer Konzentration von 8  $\mu$ g/ml geclustert gestempelte Ephrin-A5/Fc in rot.

Werden temporale Retina-Explantate vor das gestempelte Adaptationssubstrat gelegt, sodass die Axone auf Laminin auswachsen und frontal auf das Ephrin-A5/Fc-Muster auftreffen (A), so halten sie vor dem Muster an und bilden eine Stoppfront aus - unabhängig davon, ob dem Medium Dynasore oder DMSO zugegeben wurde. Werden die Retina-Explantate stattdessen unmittelbar auf dem Muster ausgelegt (B), so wachsen die Axone auch bei inhibierter Endocytose auf den hohen Ephrin-A5/Fc-Konzentrationen aus. Ein Unterschied zur Kontrollsituation ist nicht festzustellen. Ein verringertes Auswachsen oder eine veränderte Wachstumsgeschwindigkeit wird nicht beobachtet. Die Axone überwachsen nach einer

Inkubation über Nacht bei inhibierter Endocytose die gleiche Strecke wie im nicht inhibierten Fall.

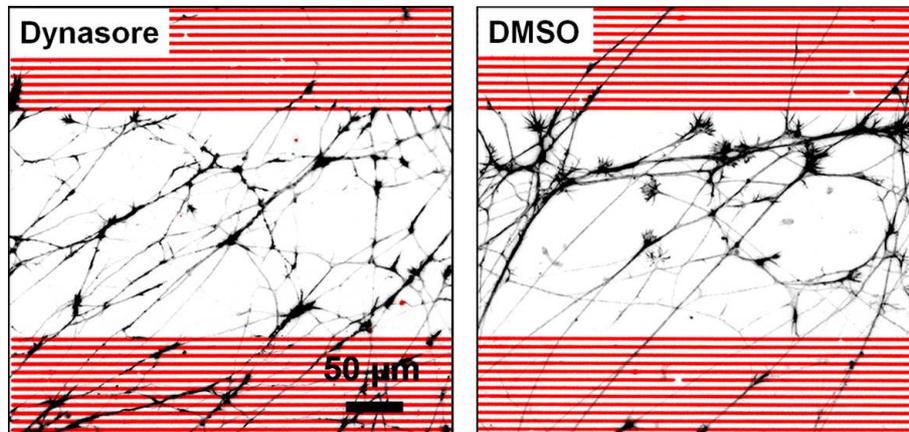
Um die Ergebnisse zu bestätigen werden die Experimente in identischer Art und Weise zusätzlich mit einem weiteren Inhibitor der Clathrin-vermittelten Endocytose durchgeführt. Dabei handelt es sich um Monodansylcadaverin (MDC). Dieser Inhibitor blockiert das aktive Zentrum einer Transglutaminase, die für die Ausbildung der endocytotischen Vesikel essenziell ist (Ray und Samanta, 1996; Schütze *et al.*, 1999). MDC inhibiert in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Desensitivierung von *Xenopus*-Axonen gegenüber den Lenkungsmolekülen Sema3A und Netrin-1 (Piper *et al.*, 2005).

Analog zu den Ergebnissen, die mit dem Inhibitor Dynasore erzielt wurden, kann auch nach Zugabe von MDC keine Veränderung der initialen Reaktion und des Auswachsverhaltens beobachtet werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche verdeutlichen demzufolge, dass die Clathrin-vermittelte Endocytose auch bei der initialen Reaktion und der Fähigkeit, auf hohen Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Konzentrationen auszuwachsen, keine Rolle spielt.

Um die Abhängigkeit der Resensitivierung von Clathrin-vermittelter Endocytose zu untersuchen, werden temporale Retina-Explantate ebenfalls auf Adaptationssubstraten ausgelegt. Bei nicht inhibierter Endocytose wachsen die Axone auf den hohen Ephrin-A5/Fc-Konzentrationen aus. Überwachsen sie anschließend eine Ephrin-freie Lücke, so resensitivieren sie in Abhängigkeit der Lückenbreite: Nach Überwachsen einer 200  $\mu\text{m}$  breiten Lücke, bilden die Axone eine Stoppfront aus, sobald sie erneut auf Substrat-gebundenes Ephrin treffen (siehe 1.4). Wird dem Medium nach Auslegen des Retina-Explantats 150  $\mu\text{M}$  Dynasore zugegeben, so ändert sich an diesem Verhalten nichts. Abb. 3.16 zeigt, dass temporale Axone auch bei inhibierter Clathrin-vermittelter Endocytose nach Überquerung der 200  $\mu\text{m}$ -Lücke eine Stoppfront ausbilden, sobald sie erneut auf Ephrin treffen. Ein Unterschied zur Kontrollsituation ist nicht festzustellen.

## Resensitivierung



**Abb. 3-16. Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf die Resensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.**

Die Abbildung zeigt Axone, die auf mit Ephrin-A5/Fc gestempelten Adaptationssubstraten ausgewachsen sind und eine 200 µm breite Lücke überquert haben. Die Zugabe von 150 µM Dynasore beeinflusst das Verhalten der Axone nicht. Die Axone halten nach Überquerung der Lücke an und bilden eine Stoppfront aus, sobald sie erneut auf Ephrin-A5/Fc treffen. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt (Dynasore, n=5, Stoppreaktion nach der Lücke in fünf Fällen; DMSO, n=2, Stoppreaktion nach der Lücke in zwei Fällen). Die Phalloidin gefärbten Axone sind in schwarz dargestellt, das in einer Konzentration von 8 µg/ml geclustert gestempelte Ephrin-A5/Fc in rot.

Das gleiche Ergebnis wird nach Zugabe von 10 µM MDC erzielt.

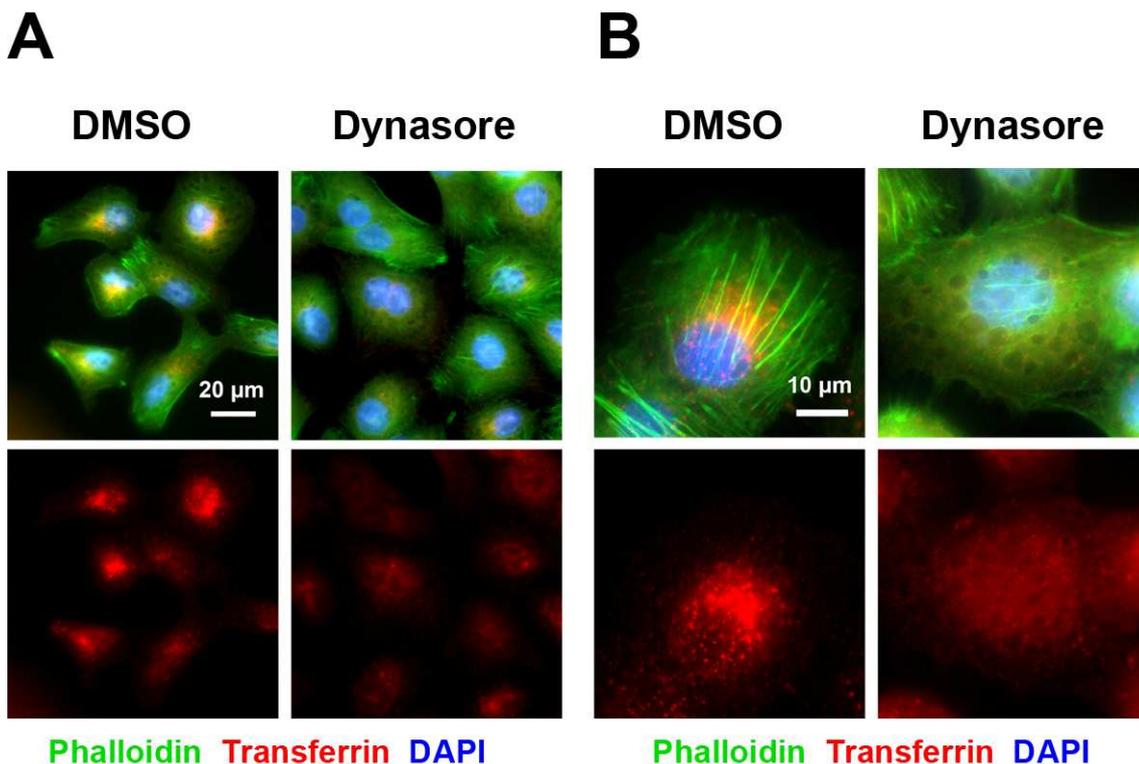
Zusammenfassend kann folglich gezeigt werden, dass eine Zugabe von Dynasore oder MDC scheinbar keinen Einfluss auf die initiale Reaktion, die Desensitivierung und die Resensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5 ausübt. Eine Beteiligung der Clathrin-vermittelten Endocytose an den genannten Phänomenen ist nicht nachzuweisen.

### 3.6.3 Untersuchung der Funktionalität des Inhibitors Dynasore

Die in Teil II und in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse deuten an, dass Wachstumskegel retinaler Ganglienzellaxone des Hühnchens ihren Gehalt an EphA3-Rezeptoren während der Adaptation nicht verändern. Sowohl die initialen Reaktionen gegenüber gelöstem und Substrat-gebundenem Ephrin-A5/Fc, als auch die Wiederaufnahme des Wachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps und das Auswachsen auf hohen Ephrin-A5-Konzentrationen gehen nicht mit der Endocytose von EphA3-Rezeptoren einher. Dies steht teilweise im Widerspruch zu einer Studie der Arbeitsgruppe von Steve McLoon aus dem Jahr 2002: Journey *et al.* konnten nach der Behandlung mit Ephrin-A2 einen Anstieg der Rac1-Aktivität in

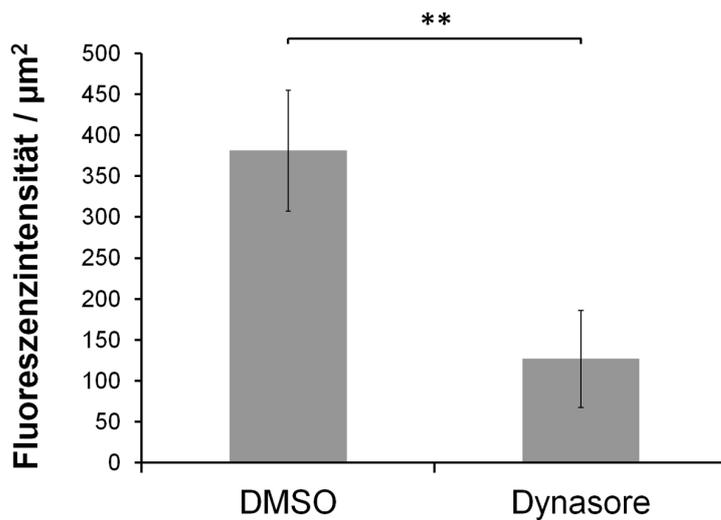
Hühnchen-Wachstumskegeln beobachten. Rac1 wurde als Auslöser der Endocytose und diese als Voraussetzung für einen Ephrin-vermittelten Kollaps identifiziert.

Um die in diesem Kapitel erzielten Ergebnisse weiter zu unterstützen, wird die Funktionalität des eingesetzten Inhibitors Dynasore in einem separaten Experiment überprüft. Dafür wird ein Transferrin-Assay durchgeführt. Transferrin ist ein Glycoprotein, das bei Wirbeltieren für den Eisentransport verantwortlich ist und von Zellen durch Clathrin-vermittelte Endocytose aufgenommen wird (Hanover *et al.*, 1984; Ehrlich *et al.*, 2004). Um zu prüfen, ob Dynasore die Clathrin-vermittelte Endocytose in dem verwendeten F12-Medium unterdrückt, werden A594-Zellen in F12-Medium kultiviert und Fluorophor-markiertes Transferrin zugegeben. Abb. 3-17 zeigt A594-Zellen, die für 10 min mit 20 µg/ml Alexa Fluor546-konjugiertem Transferrin inkubiert wurden. In einer Versuchsreihe wurde zusätzlich 80 µM Dynasore zugegeben, in der anderen Versuchsreihe ein entsprechendes Volumen an DMSO.



**Abb. 3-17. Transferrin-Assay zur Untersuchung der Funktionalität des Inhibitors Dynasore.** Dynasore unterdrückt die endocytotische Aufnahme von Alexa Fluor546-konjugiertem Transferrin. (A) Darstellung von A594-Zellen, die für 10 min mit Transferrin inkubiert, und zusätzlich entweder mit DMSO oder Dynasore behandelt wurden. (B) Vergrößerte Darstellung des kernnahen Somas einer A594-Zelle, die für 10 min mit Transferrin inkubiert, und zusätzlich entweder mit DMSO oder Dynasore behandelt wurde. Grün: Phalloidin; Rot: Transferrin; Blau: DAPI

Bei Zugabe von DMSO ist eine deutliche rote Färbung des Transferrin-Konjugates im Soma zu erkennen. Wird stattdessen 80  $\mu\text{M}$  Dynasore zugegeben ist ein spezifisches rotes Signal nicht zu sehen. Diese Unterschiede spiegeln sich auch quantitativ wieder: Werden die integrierten Fluoreszenz-Intensitäten des Alexa Fluor546-konjugierten Transferrins ausgemessen, so zeigen sich Unterschiede in beiden Ansätzen (Abb. 3-18).



**Abb. 3-18. Quantitative Auswertung des Transferrin-Assays.**

Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Transferrin-Intensität pro Zellfläche in Abhängigkeit des zugegebenen Reagenzes und repräsentiert damit das Ausmaß der Transferrin-Endocytose. Jedes Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 30 Zellen ausgewertet (DMSO,  $n=102$ ; Dynasore,  $n=97$ ). Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt.

Die Intensität der Transferrin-Fluoreszenz ist nach Zugabe von Dynasore im Vergleich zur Kontrollsituation signifikant reduziert. Eventuell nicht-endocytiertes Transferrin, das an die Rezeptoren der Zellmembran gebunden ist, wurde vor der Fixierung durch einen sauren Waschschrift entfernt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das rote Signal tatsächlich von endocytisiertem Transferrin herrührt.

Dieser Versuch zeigt, dass Dynasore in einer Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  die Endocytose unterdrückt und in F12-Medium funktional ist.

### **3.7 Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Adaptation retinaler Wachstumskegel**

#### **3.7.1 Lokale Proteinsynthese bei der Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5**

In Studien der Arbeitsgruppen von Christine Holt und Mu-Ming Poo wurde festgestellt, dass die initiale Reaktion und die Resensitivierung von *Xenopus*-Neuronen gegenüber den Lenkungsmolekülen Netrin-1 und Sema3A von lokaler Proteinsynthese abhängig ist (Ming *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wird der Einfluss der lokalen Proteinsynthese im Wachstumskegel auch für die Adaptation gegenüber Ephrin-A5 untersucht.

In ihrer Dissertation konnte Anne von Philipsborn bereits zeigen, dass der initiale Ephrin-A5-vermittelte Kollaps von temporalen retinalen Wachstumskegeln des Hühnchens unabhängig von lokaler Proteinsynthese ist. Auch die Resensitivierung scheint von lokaler Proteinsynthese nicht beeinflusst zu sein: Werden retinale Explantate auf Lückenmustern ausgelegt, so bilden die Axone auch nach Zugabe der Inhibitoren AIM und Cycloheximid eine Stoppfront aus, wenn sie nach Überqueren einer 200 µm breiten Lücke erneut auf Substrat-gebundenes Ephrin-A5/Fc treffen (von Philipsborn, 2007).

Die Tatsache, dass die initiale Reaktion und die Resensitivierung unabhängig von lokaler Proteinsynthese sind, schließt nicht aus, dass die lokale Proteinsynthese im Wachstumskegel für den Prozess der Desensitivierung eine Rolle spielt. Um dies zu überprüfen werden Kollaps-Assays mit geclustertem Ephrin-A5/Fc, bei gleichzeitiger Zugabe von 40 µM AIM, durchgeführt. AIM inhibiert eine Peptidyl-Transferase, die für die Ausbildung von Peptidbindungen während der Proteinsynthese verantwortlich ist. Die Konzentration von 40 µM wurde bereits in vorangegangenen Studien erfolgreich zur Inhibition verwendet. Zudem zeigen Wachstumskegel bis zu vier Stunden nach 40 µM AIM-Zugabe keine veränderte Morphologie und auch eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit ist bei dieser Konzentration nicht zu beobachten (Campbell und Holt, 2001; von Philipsborn 2007).

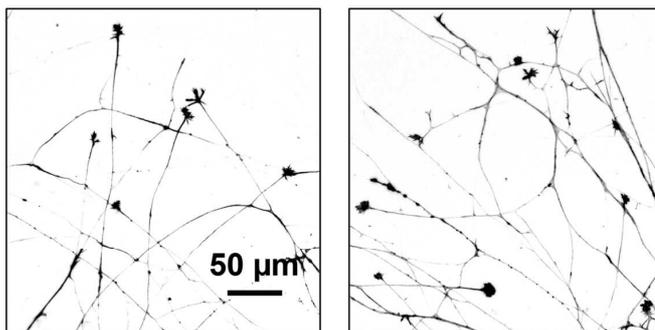
Temporale Wachstumskegel werden zunächst für 30 min in AIM-enthaltendem Medium präinkubiert. Anschließend wird das Medium abgesaugt und frisches Medium, das 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc und AIM (bzw. DMSO) enthält, für die in Abb. 3-19 angegebenen Zeitspannen zugegeben.

Wie bereits von Anne von Philipsborn gezeigt werden konnte, verhindert AIM den Ephrin-A5-vermittelten Kollaps nach 20 min nicht (Abb. 3-19 B). Auch die Wiederaufnahme des

Wachstums unterscheidet sich nicht signifikant von der Kontrollsituation: Bei Zugabe von Ephrin-A5/Fc und AIM zeigen 48 % der Wachstumskegel nach 120 min einen intakten Phänotyp. Wird DMSO statt AIM zugegeben sind 52 % der Wachstumskegel intakt. Sowohl bei Zugabe von DMSO als auch bei Zugabe von AIM zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der 20-minütigen Inkubation mit Ephrin-A5/Fc und der 120-minütigen Inkubation: Nach 20 min zeigen 24 % der Wachstumskegel einen intakten Phänotyp, gegenüber 48 %, bzw. 52 % nach 120 min. Es fällt auf, dass das Ausmaß der Desensitivierung unter Kontrollbedingungen in diesem Experiment geringer ist, als in den zuvor beschriebenen Experimenten. Nach der 120-minütigen Inkubation in 0,5 % DMSO (v/v) zeigen nur 48 % der Wachstumskegel einen intakten Phänotyp.

# A

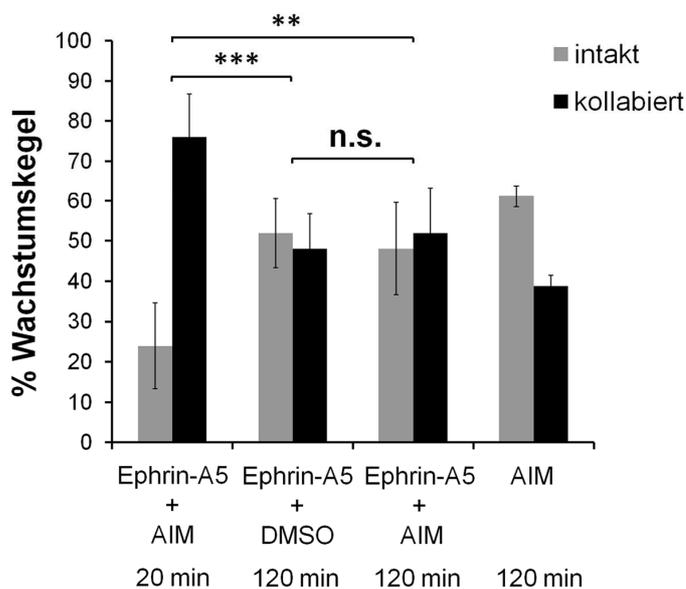
120 min Ephrin-A5 + DMSO    120 min Ephrin-A5 + AIM



**Abb. 3-19. Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf den initialen Kollaps und die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5.**

AIM verhindert weder den initialen Ephrin-A5-vermittelten Kollaps noch die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach dem Kollaps. (A) Darstellung von Axonen, die für 120 min in Medium mit 0,25 µg/ml Ephrin-A5/Fc+DMSO oder 0,25 µg/ml Ephrin-A5/Fc+40 µM AIM inkubiert wurden (Phalloidin-färbung in schwarz). (B) Quantitative Auswertung der intakten und kollabierten Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Jedes Experiment wurde mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (Ephrin-A5+AIM, 20 min, n=672; Ephrin-A5+DMSO, 120 min, n=447; Ephrin-A5+AIM, 120 min, n=1196; AIM, 120 min, n=407). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

# B

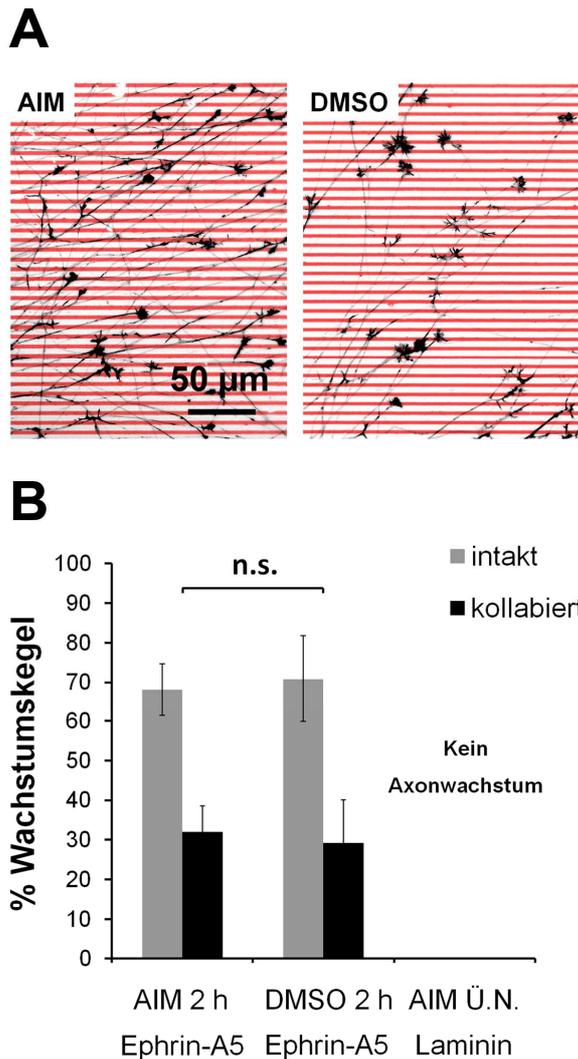


Dieses Experiment verdeutlicht folgenden Sachverhalt: Die Wiederaufnahme des Wachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps unterscheidet sich bei inhibierter Proteinsynthese nicht vom unbeeinflussten Fall. Das legt den Schluss nahe, dass die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 nicht von lokaler Proteinsynthese abhängig ist.

#### **3.7.2 Lokale Proteinsynthese bei der Desensitivierung gegenüber Substratgebundenem Ephrin-A5**

Um den Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Desensitivierung gegenüber Substratgebundenem Ephrin-A5 zu untersuchen, werden die in 2.2.6 beschriebenen Adaptationssubstrate verwendet und temporale Retina-Explantate unmittelbar auf dem gestempelten Muster ausgelegt. Wie bereits in 3.6.2 erklärt wurde, wird das Auswachsen auf hohen Ephrin-A5-Konzentrationen normalerweise als Indiz für eine Desensitivierung gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal gewertet. Allerdings kann die Fähigkeit, auf hohen Ephrin-A5-Konzentrationen auszuwachsen, in diesem Fall nicht zur Beantwortung der Frage, ob die lokale Proteinsynthese einen Einfluss auf die Desensitivierung ausübt, herangezogen werden. Eine Inkubation über Nacht in AIM-enthaltendem Medium verhindert generell das Auswachsen der Axone. Aus diesem Grund wird ein alternatives Experiment durchgeführt: Temporale Retina-Explantate werden auf Adaptationssubstraten ausgelegt und in F12-MZ-Medium ohne AIM inkubiert, um ein Auswachsen der Axone auf dem Ephrin-A5-Substrat zu ermöglichen. Die desensitvierten Axone werden anschließend für 2 h in Medium inkubiert, dem 40 µM AIM zugegeben wurde, um zu überprüfen ob sich Veränderungen am Desensitivierungsverhalten zeigen. Abb. 3-20 zeigt die Morphologie (A) und die quantitative Auswertung (B) von intakten und kollabierten Wachstumskegeln, die während des Versuchs auf dem Adaptationssubstrat wuchsen.

Die Auswertung zeigt, dass für zwei Stunden zugegebenes AIM keinen Einfluss auf desensitvierte Axone ausübt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen, in denen AIM zugegeben wurde und der DMSO-Kontrolle ist nicht festzustellen: Nach zweistündiger Zugabe von AIM zeigen 68 % der Wachstumskegel auf dem Ephrin-Substrat eine intakte Morphologie. Bei Zugabe von DMSO zeigen 71 % eine intakte Morphologie. Die Funktionalität des Inhibitors wird überprüft, indem Retina-Explantate unmittelbar nach der Präparation in AIM-enthaltendem Medium inkubiert werden. Eine derartige Behandlung verhindert ein Auswachsen der Axone.



**Abb. 3-20. Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.** Desensitivierte Axone, die auf hohen Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Konzentrationen wachsen, werden durch die zweistündige Zugabe von AIM nicht beeinflusst. **(A)** Darstellung von Axonen nach zweistündiger Inkubation mit 40  $\mu\text{M}$  AIM oder DMSO. Die Phalloidininfärbung ist in schwarz dargestellt, das geclustert gestempelte Ephrin-A5/Fc in rot. **(B)** Quantitative Auswertung intakter und kollabierter Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Wird AIM über Nacht (Ü.N.) zugegeben, so wachsen keine Axone aus. Jedes Experiment wurde fünfmal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (AIM, 2h, Ephrin-A5,  $n=576$ ; DMSO, 2 h, Ephrin-A5,  $n=946$ ). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Ein Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Aufrechterhaltung der Desensitivierung retinaler Wachstumskegel kann in diesem Fall nicht nachgewiesen werden.

### 3.8 Einfluss der Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen auf die Desensitivierung retinaler Wachstumskegel

#### 3.8.1 Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5

Eph-Rezeptoren gehören zur Gruppe der Rezeptortyrosin-Kinasen (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998; Klein, 2004). Charakteristisch für diese Rezeptoren ist die Dimerisierung

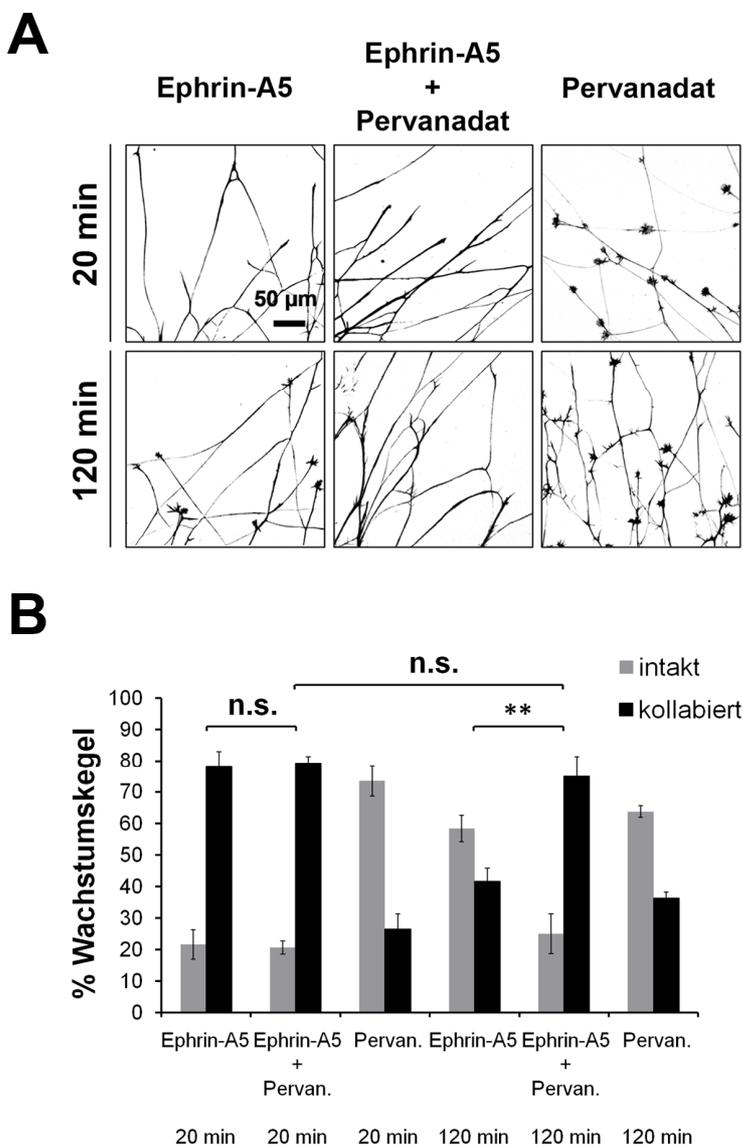
(bzw. Oligomerisierung) nach Bindung ihres Liganden und eine wechselseitige Tyrosin-Phosphorylierung der intrazellulären Rezeptordomäne. An die phosphorylierten Tyrosin-Reste binden cytoplasmatische Adapterproteine, die das Signal intrazellulär weiterleiten.

Eine Möglichkeit, die Sensitivität gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal Ephrin-A5 zu regulieren, bestünde darin, in dessen intrazelluläre Signalkaskade einzugreifen. Damit würde die Bindung des Liganden an die Rezeptoren normal funktionieren und auch die Anzahl an Rezeptoren in der Membran bliebe unverändert. Allerdings könnte das spezifische Signal intrazellulär nicht mehr korrekt weitergeleitet, und eine Reaktion demzufolge nicht mehr ausgelöst werden. In der Arbeitsgruppe von Andrew Stoker konnte 1999 gezeigt werden, dass retinale Ganglienzellen des Hühnchens die transmembrane Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor Typ O (PTPRO, vormals CRYP-2) exprimieren und diese sowohl in Zellkörpern als auch in Axonen und Wachstumskegeln vorliegt (Ledig *et al.*, 1999). Diese Phosphatase ist in der Lage, Eph-Rezeptoren zu dephosphorylieren und deren Signaltransduktion zu unterbinden: Wird PTPRO in retinalen Ganglienzellen überexprimiert, so verlieren temporale Axone die Sensitivität gegenüber Ephrin-A2 und überwachsen Ephrin-A2-Streifen im Streifenassay. Nach Überexpression einer dominant-negativen Mutante beginnen nasale Axone auf Substratgebundenes Ephrin-A2 zu reagieren (Shintani *et al.*, 2006). Damit ist ein Beispiel gegeben, wie die Sensitivität von retinalen Axonen durch die Modulation der Signalkaskade reguliert werden kann.

Um zu untersuchen, ob Modulationen der intrazellulären Signalkaskade eine Rolle bei der Adaptation gegenüber dem Lenkungssignal Ephrin-A5 spielen, wird mit dem Phosphatase-Inhibitor Peroxovanadat (Pervanadat) gearbeitet. Pervanadat inhibiert Protein-Tyrosin-Phosphatasen irreversibel durch die Oxidation des katalytischen Cystein-Restes im aktiven Zentrum des Enzyms (Huyer *et al.*, 1997). Spielt beispielsweise eine Dephosphorylierung der Eph-Rezeptoren und die damit verbundene Blockierung der intrazellulären Signalweiterleitung eine Rolle bei der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5, so können retinale Axone nach Inhibition der Phosphatasen nicht mehr gegenüber dem Lenkungssignal desensitivieren.

Der Einfluss von Dephosphorylierungs-Ereignissen bei der Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5 wird in Kollaps-Assays untersucht. Temporale Axone werden für 20 min oder 120 min in Medium inkubiert, dem 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc und entweder 12 µM Pervanadat oder eine Kontroll-Lösung zugegeben werden. Pervanadat-Konzentrationen von 10 µM und 12 µM wurden bereits erfolgreich zur Inhibition der Insulin-vermittelten Lipogenese bei Ratten eingesetzt (Fantus *et al.*, 1989; Castan *et al.*, 1999). Abb. 3-21 zeigt die Auswirkungen der Pervanadat-Zugabe auf die Morphologie (A) und die Kollaps-Rate (B)

temporalen Wachstumskegel. Die Zugabe von 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat hat keinen Einfluss auf die initiale Reaktion gegenüber löslichem Ephrin-A5/Fc. Temporale Wachstumskegel reagieren mit einem Kollaps auf das zugegebene Lenkungsmolekül. Ein Vergleich nach 120 Minuten zeigt jedoch signifikante Unterschiede: Im Experiment ohne Inhibitor-Zugabe nehmen temporale Axone das Wachstum in Gegenwart von Ephrin-A5/Fc wieder auf. Nach 120 min zeigen 58 % der Wachstumskegel einen intakten Phänotyp. Wird dem Medium zusätzlich Pervanadat zugegeben, so ist dieser Anteil auf 25 % verringert. Ein signifikanter Unterschied zwischen der 20-minütigen (79 % kollabierte Wachstumskegel) und der 120-minütigen (75 % kollabierte Wachstumskegel) Inkubation ist unter diesen Bedingungen nicht mehr festzustellen.



**Abb. 3-21. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf den initialen Kollaps und die Desensitivierung gegenüber gelöstem Ephrin-A5.**

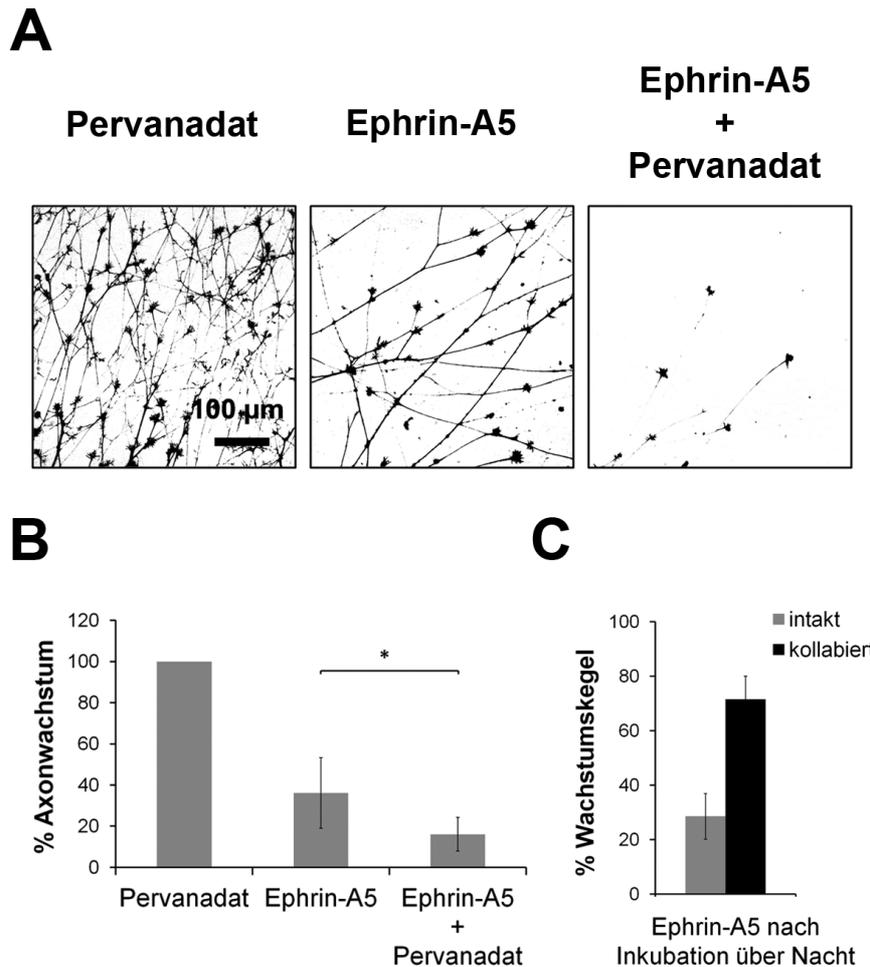
Eine Zugabe von 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat verhindert die Wiederaufnahme des Axonwachstums in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5. (A) Darstellung von Axonen, die für 20 min oder 120 min in Medium inkubiert wurden, dem 0,25  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5/Fc+Kontroll-Lösung oder 0,25  $\mu\text{g/ml}$  Ephrin-A5/Fc +12  $\mu\text{M}$  Pervanadat zugegeben wurden (Phalloidin-färbung in schwarz). (B) Quantitative Auswertung der intakten und kollabierten Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Jedes Experiment wurde sechsmal unabhängig voneinander durchgeführt. Pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (Ephrin-A5, 20 min, n=656; Ephrin-A5+Pervan., 20 min, n=792; Pervan., 20 min, n=749; Ephrin-A5, 120 min, n=711; Ephrin-A5+Pervan., 120 min, n=656; Pervan., 120 min, n=760). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Pervanadat verhindert demzufolge durch die Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps.

Die Vermutung, dass intrazelluläre Dephosphorylierungen die Adaptation gegenüber gelöstem Ephrin-A5 beeinflussen, wird zusätzlich in einem weiteren Experiment überprüft. Werden Retina-Explantate auf mit Laminin beschichteten Deckgläsern ausgelegt und über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert, das 0,25-0,5 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc enthält, so können Axone an das repulsive Signal adaptieren und auswachsen. Dieses Verhalten ist vergleichbar mit der Beobachtung, dass retinale Axone auf hohen Substrat-gebundenen Ephrin-A5/Fc-Konzentrationen auswachsen können, wenn sie unmittelbar nach dem Verlassen des Explantatstreifens damit konfrontiert werden (von Philipsborn, 2007; siehe Abschnitt 1.4.). Es stellt sich die Frage, ob die Zugabe von Pervanadat und eine damit verbundene Inhibition der Dephosphorylierung, Veränderungen am Axonwachstum hervorruft. Abb. 3 22 zeigt Axone, die in Medium ausgewachsen sind, dem Pervanadat, Ephrin-A5/Fc oder ein Kombination dieser Moleküle zugegeben wurde.

Die Zugabe von 12 µM Pervanadat ins Kulturmedium führt zu keiner Veränderung des Auswachsverhaltens, verglichen mit dem Wachstum in nativem F12-MZ-Medium (Abb. 3-22 A). Für eine Quantifizierung des Axonwachstums (Abb. 3-22 B) wird die Fluoreszenz-Intensität der Phalloidin-gefärbten Axone ausgemessen. Der ermittelte Wert nach alleiniger Zugabe von Pervanadat wird als 100 % definiert (Positivkontrolle). Wird dem Medium 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc ohne Pervanadat zugegeben, so wachsen temporale Axone aus dem Explantat aus. Allerdings ist das Wachstum gegenüber der Positivkontrolle deutlich reduziert. Die Auswertung der Phalloidin-Intensitäten ergibt einen Wert von 36 %. Wird dem Kulturmedium sowohl geclustertes Ephrin-A5/Fc als auch Pervanadat zugegeben, so zeigt sich ein signifikant verringertes Axonwachstum gegenüber dem Versuchsansatz ohne Pervanadat (16 % gegenüber 36 %).

Um beim Auswachsen in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc von einem adaptiven Verhalten ausgehen zu können, muss sichergestellt sein, dass das zugegebene Ephrin-A5/Fc während der gesamten Versuchszeit seine Funktionalität behält. Dies wird durch folgendes Experiment überprüft: Retina-Explantate werden über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert, dem 0,25 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc zugegeben wird. Das Medium wird am darauffolgenden Tag abgenommen und eine zweite temporale Axonkultur für 20 min in diesem Medium inkubiert. Abb. 3-22 C zeigt, dass die Wachstumskegel mit einem Kollaps auf diese Behandlung reagieren. Das bedeutet, dass das zugegebene Ephrin-A5/Fc während der gesamten Versuchsdauer nicht degradiert, sondern funktionell verbleibt und einen Kollaps auslösen kann.



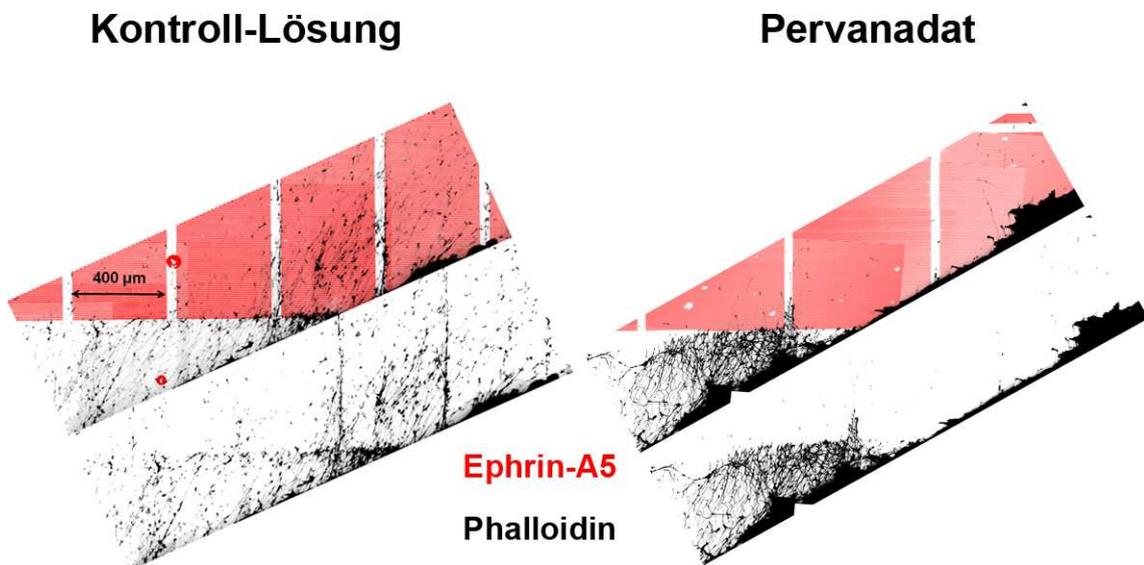
**Abb. 3-22. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf das Axonwachstum in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5.**

Die Anwesenheit von 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat im Kulturmedium während der gesamten Kulturzeit führt zu einem verringerten Axonwachstum in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc. (A) Darstellung von Axonen, die in Gegenwart von 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat oder 0,25  $\mu\text{g/ml}$  geclustertem Ephrin-A5/Fc oder 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat+0,25  $\mu\text{g/ml}$  geclustertem Ephrin-A5/Fc ausgewachsen sind (Phalloidin-färbung in schwarz). (B) Quantitative Auswertung der Fluoreszenz-Intensität Phalloidin-gefärbter Axone. Der ermittelte Wert bei Zugabe von 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat wird als 100 % definiert. Pro Deckglas wurden zwei Explantatstreifen ausgelegt und die Mittelwerte aus beiden Streifen gebildet. Jedes Experiment wurde mindestens fünfmal durchgeführt (Pervanadat, n=5; Ephrin-A5, n=5; Ephrin-A5+Pervanadat, n=6). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt. (C) Quantitative Auswertung eines Kollaps-Assays mit über Nacht inkubiertem Kulturmedium, das 0,25  $\mu\text{g/ml}$  geclustertes Ephrin-A5/Fc enthält. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Das Experiment wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche zeigen demzufolge, dass sowohl die Wiederaufnahme des Axonwachstums in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc als auch das Auswachsen in Ephrin-A5/Fc-haltigem Medium nach der Zugabe von Pervanadat, d.h. also nach Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen, unterdrückt sind.

### 3.8.2 Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf die Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5

Temporale retinale Axone wachsen aus Explantaten aus, die auf hohen Ephrin-A5-Konzentrationen ausgelegt werden. Wie in den Abschnitten 1.4 und 3.6.2 erläutert, kann dieses Verhalten als Desensitivierung gegenüber diesem Lenkungssignal gewertet werden. An dieser Stelle wird deshalb zunächst untersucht, ob sich das Wachstum auf hohen Ephrin-A5-Konzentrationen nach Zugabe von Pervanadat verändert. Temporale Retina-Explantate werden für dieses Experiment diagonal auf ein gestempeltes Ephrin-A5/Fc-Substrat gelegt, sodass ein Teil des Explantats Kontakt zur Laminin-Oberfläche, der andere Teil zur Ephrin-A5/Fc-Oberfläche hat. Abb. 3-23 zeigt, dass Axone nach Zugabe einer Kontroll-Lösung aus dem kompletten Explantat-Streifen auswachsen, sowohl auf der Laminin-Oberfläche als auch auf den hohen Ephrin-A5/Fc-Konzentrationen. Die auf Laminin ausgewachsenen Axone bilden eine Stopppfront aus, sobald sie das erste Mal mit dem Ephrin-Substrat konfrontiert werden. Nach der Phosphatase-Inhibition durch Pervanadat ändert sich am Wachstum auf Laminin nichts, allerdings verlieren die Axone die Fähigkeit, auf dem gestempelten Ephrin-A5/Fc-Substrat zu wachsen.



**Abb. 3-23. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf das Axonwachstum auf Substrat-gebundenem Ephrin-A5-Mustern.**

Die Anwesenheit von 12 µM Pervanadat im Kulturmedium verhindert das Auswachsen von temporalen Axonen auf gestempelten Ephrin-A5/Fc-Substraten. Die Abbildung zeigt das Axonwachstum aus einem Retina-Explantatstreifen, der diagonal auf ein gestempeltes Ephrin-A5/Fc-Substrat gelegt wurde. Die Retina-Explantate wurden über Nacht in F12-MZ-Medium inkubiert, dem entweder 12 µM Pervanadat oder eine Kontroll-Lösung zugegeben wurde. Die Phalloidin-gefärbten Axone sind in schwarz dargestellt, das in einer Konzentration von 8 µg/ml geclustert gestempelte Ephrin-A5/Fc in rot.

Um die Ergebnisse quantitativ zu erfassen, wird das Axonwachstum aus den diagonal aufgelegten Retina-Explantaten, gemäß Kapitel 2.2.20, in drei Kategorien eingeteilt:

- (1) kein Wachstum, schwaches Wachstum
- (2) mittleres Wachstum
- (3) starkes Wachstum

In Tabelle 3-1 ist der prozentuale Anteil der Experimente wiedergegeben, in denen die drei Wachstumskategorien auftreten.

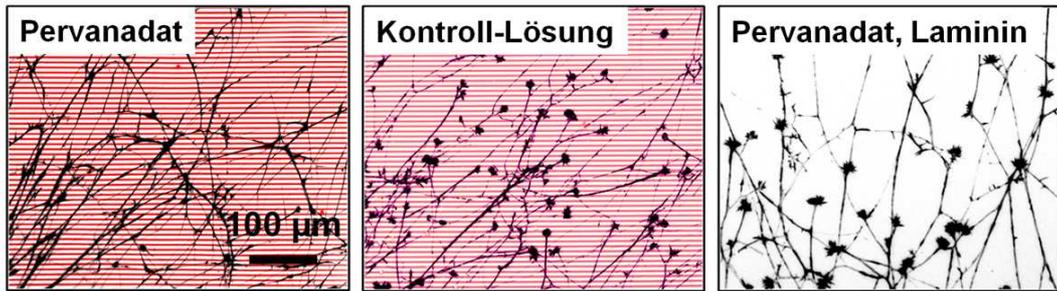
**Tab. 3-1.** Bewertung des Axonwachstums in Anwesenheit von Pervanadat - Temporale Retina-Explantate werden diagonal auf ein gestempeltes Adaptationssubstrat gelegt und das Axonwachstum auf der Laminin- und der Ephrin-A5/Fc-Oberfläche beurteilt. Angegeben ist der prozentuale Anteil an Experimenten, in denen die Wachstumskategorien auftreten (Pervanadat, n=46; Kontroll-Lösung, n=28).

Wachstumskategorie	Laminin-Substrat		Ephrin-A5-Substrat	
	Kontroll-Lösung	Pervanadat	Kontroll-Lösung	Pervanadat
kein Wachstum, schwaches Wachstum	0 %	10,9 %	3,6 %	44,4 %
mittleres Wachstum	10,7 %	21,7 %	17,8 %	33,3 %
starkes Wachstum	89,3 %	67,4 %	78,6 %	22,2 %

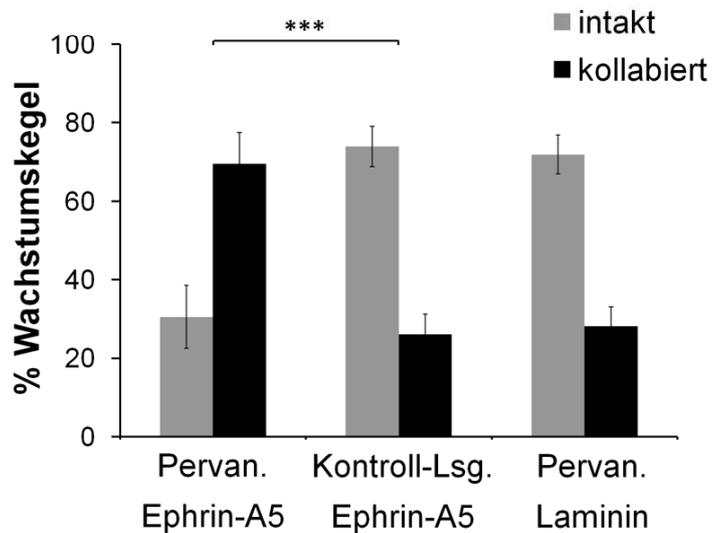
Die Auswertung verdeutlicht den Effekt, dass temporale Axone nach Zugabe von Pervanadat die Fähigkeit verlieren, auf hohen Ephrin-A5/Fc-Konzentrationen zu wachsen.

Ein Versuchsansatz, mit dem diese Beobachtung weiter unterstützt werden soll, wurde bereits zur Untersuchung der lokalen Proteinsynthese (siehe 3.7.2) herangezogen. Temporale Retina-Explantate werden auf gestempelten Adaptationssubstraten ausgelegt, sodass die Axone auf den hohen Ephrin-A5/Fc-Konzentrationen auswachsen. Am darauffolgenden Tag wird das Kulturmedium abgenommen und neues Medium, das entweder 12  $\mu$ M Pervanadat oder eine Kontroll-Lösung enthält für 30 min zugegeben. Abb. 3-24 zeigt die Morphologie (A) und die quantitative Auswertung (B) der Wachstumskegel, die sich während der 30-minütigen Inkubation auf dem Ephrin-A5/Fc-Substrat befanden. Die Kontroll-Lösung beeinflusst das Axonwachstum nicht. 74 % der Wachstumskegel zeigen einen intakten Phänotyp. Wird stattdessen Pervanadat zugegeben, so zeigen nur 31 % der Wachstumskegel eine intakte Morphologie, während 69 % kollabiert sind. Die Zugabe von Pervanadat ändert am Wachstum auf einer Laminin-Oberfläche nichts.

A



B



**Abb. 3-24. Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf die Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5.**

Desensitivierte Axone, die auf hohen Ephrin-A5-Konzentrationen wachsen, zeigen nach Zugabe von 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat einen kollabierten Phänotyp. (A) Darstellung von Axonen nach 30-minütiger Inkubation mit 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat. Die Phalloidin-färbung ist in schwarz dargestellt, das geclustert gestempelte Ephrin-A5/Fc in rot. (B) Quantitative Auswertung intakter und kollabierter Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Jedes Experiment wurde viermal unabhängig voneinander durchgeführt und pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (Pervanadat, Ephrin-A5, n=488; Kontroll-Lösung, Ephrin-A5, n=705; Pervanadat, Laminin, n=459). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Dieses Experiment zeigt, dass die Zugabe von Pervanadat und eine damit verbundene Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5/Fc spielt.

### 3.8.3 Einfluss der Phosphatase-Inhibition auf das Verhalten retinaler Axone im Streifenassay mit Ephrin-A2

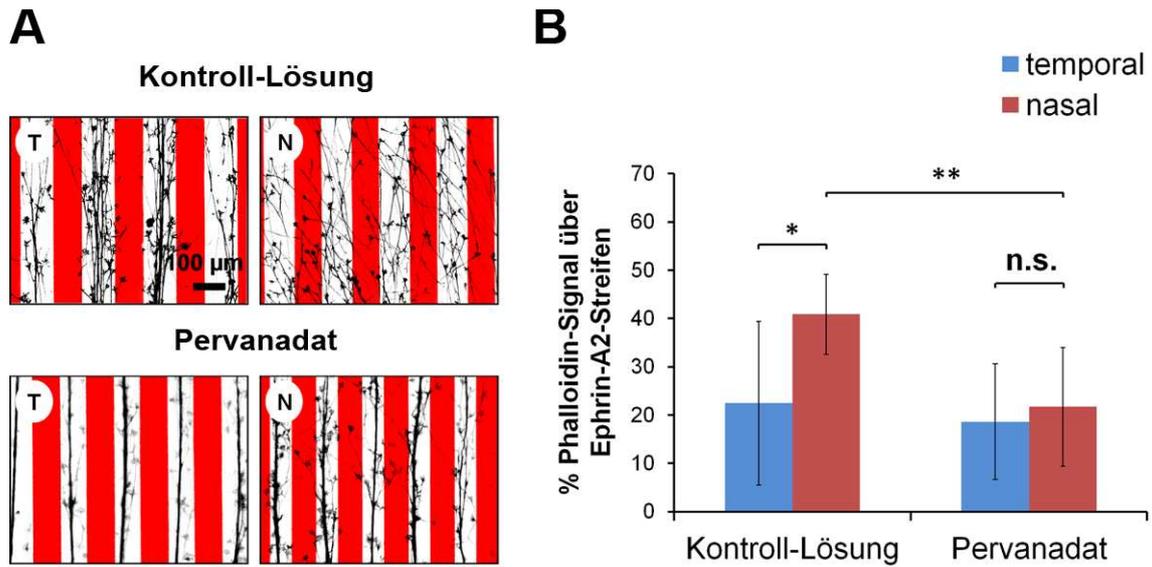
Die bisher in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind konsistent mit der Idee, dass die Modulation der Ephrin-A5-Signalkaskade einen zentralen Beitrag zur Adaptation leistet. Allerdings lassen die durch Pervanadat hervorgerufenen Effekte nicht zwingend auf einen Adaptationsmechanismus schließen. Tyrosin-Phosphatasen sind ein essenzieller Bestandteil von Rezeptortyrosin-Kinase-Signalkaskaden. Binden Liganden-Dimere an die zugehörigen Rezeptor-Dimere, kommt es zur wechselseitigen Tyrosin-Phosphorylierung der intrazellulären Rezeptordomäne. Um den Rezeptor nicht in einem konstitutiv aktiven Zustand zu belassen, d.h. um das Signal zu terminieren, kann die Tyrosin-Phosphorylierung wieder entfernt werden. Diese Aufgabe übernehmen Tyrosin-Phosphatasen. Aus dieser Überlegung ergibt sich die Konsequenz, dass die bisher beobachteten Effekte durch zwei Modelle erklärt werden können:

- (1) Pervanadat beeinflusst die adaptive Modulation des Ephrin-A5-Signals ohne einen generellen Effekt auf die Signaltransduktion auszuüben.
- (2) Pervanadat beeinflusst nicht die Adaptation sondern die Signaltermination und sensitiviert die Rezeptoren. Die Rezeptoren werden gewissermaßen in ihrem aktiven Zustand „eingefroren.“

Im ersten Fall würde die durch Ephrin-A5 initiierte Signaltransduktionskaskade normal funktionieren. Allein die Modulation des Signals wäre nach Zugabe von Pervanadat unterbunden. Im zweiten Fall hätte Pervanadat einen Einfluss auf die direkte Signaltransduktion und nicht auf einen adaptiven Mechanismus.

Um sich diesem Problem in einem ersten Schritt anzunähern, wird untersucht, ob Pervanadat einen Einfluss auf das Entscheidungsverhalten von Axonen retinaler Ganglienzellen gegenüber Ephrinen ausübt. Es werden Streifenassays mit geclustertem Ephrin-A2/Fc durchgeführt und sowohl temporale als auch nasale Retina-Explantate auf diesen Streifenteppichen ausgelegt. Dem Medium wird unmittelbar nach Auslegen der Explantate entweder 12  $\mu$ M Pervanadat oder eine Kontroll-Lösung zugegeben.

Abb. 3-25 zeigt das Verhalten (A) und die quantitative Auswertung (B) des Axonwachstums auf Ephrin-A2/Fc-Streifenteppichen.



**Abb. 3-25. Verhalten retinaler Axone in Streifenassays mit Ephrin-A2 nach Zugabe des Inhibitors Pervanadat.**

Pervanadat erhöht die Sensitivität nasaler Axone gegenüber Substrat-gebundenem, geclustertem Ephrin-A2/Fc. (A) Darstellung von temporalen (T) und nasalen (N) Axonen auf einer Streifen-Oberfläche, die aus 8 µg/ml geclustertem Ephrin-A2/Fc hergestellt wurde. Nach Zugabe von 12 µM Pervanadat vermeiden nasale Axone die Ephrin-A2/Fc-Streifen. Bei temporalen Axonen zeigt sich keine Veränderung. Die Phalloidin-Färbung ist in schwarz dargestellt, das geclustert gestempelte Ephrin-A2/Fc in rot. (B) Quantitative Auswertung des Axonwachstums. Die Y-Achse zeigt den Anteil des axonalen Phalloidin-Signals in % an, der mit dem Signal des geclusterten Ephrin-A2/Fc überlappt. Die blauen Balken zeigen die Werte der temporalen Axonpopulation, die roten Balken die Werte der nasalen Population. Pro Oberfläche werden zwei Explantatstreifen ausgelegt. Pro Explantatstreifen wird eine Aufnahme ausgewertet und der Mittelwert aus beiden Werten gebildet (Kontroll-Lösung, temporal, n=7; Kontroll-Lösung, nasal, n=6; Pervanadat, temporal, n=12; Pervanadat, nasal, n=13). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test durchgeführt.

Wird eine Kontroll-Lösung zugegeben, so zeigen retinale Axone ein topografisch differenzielles Verhalten: Temporale Axone vermeiden die Ephrin-A2/Fc-Streifen und wachsen ausschließlich auf der Laminin-Oberfläche zwischen den Streifen. Nasale Axone zeigen keine Präferenz. Nach Zugabe des Inhibitors sind Veränderungen am Wachstumsverhalten der nasalen Axone erkennbar. Während die temporale Axonpopulation das Wachstum auf den Ephrin-A2/Fc-Streifen weiterhin vermeidet, reagieren nach Zugabe von Pervanadat auch nasale Axone auf die Ephrin-Streifen (Abb. 3.25 A). Zur quantitativen Auswertung wird der Anteil des axonalen Phalloidin-Signals ausgemessen, der mit dem Signal der Ephrin-Streifen überlappt. Nach Zugabe der Kontroll-Lösung überlappen 22 % der temporalen Axone mit den Ephrin-Streifen. Nasale Axone zeigen eine Überlappung von 41 %, was auf ein gleichmäßiges Wachstum auf der gesamten Oberfläche hindeutet. Da die Ephrin-Streifen und die mit Laminin überschichteten Zwischenstreifen die gleiche Breite haben, ist bei gleichmäßigem Wachstum im Idealfall eine Überlappung von 50 % zu erwarten. Nach Zugabe des Inhibitors ändert sich der Wert der

temporalen Axone nicht signifikant (18 % statt 22 %). Der Wert der nasalen Axone ist auf 21 % (statt vorher 41 %) verringert.

Diese Versuche bestätigen die Ergebnisse, die Shintani *et al.*, 2006 in Überexpressionsstudien mit dominant-negativen PTPRO-Konstrukten erzielen konnten. Eine Konzentration von 12  $\mu$ M Pervanadat reproduziert das Verhalten bei genetischer Ausschaltung der Protein-Tyrosin-Phosphatase PTPRO. Da der ursprüngliche und hier durchgeführte Streifenassay die primäre Reaktion von Wachstumskegeln auf axonale Lenkungssignale untersucht (Vielmetter *et al.*, 1990), könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Pervanadat zumindest teilweise die Signaltermination beeinflusst. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass auch im Streifenassay Adaptationseffekte eine Rolle spielen.

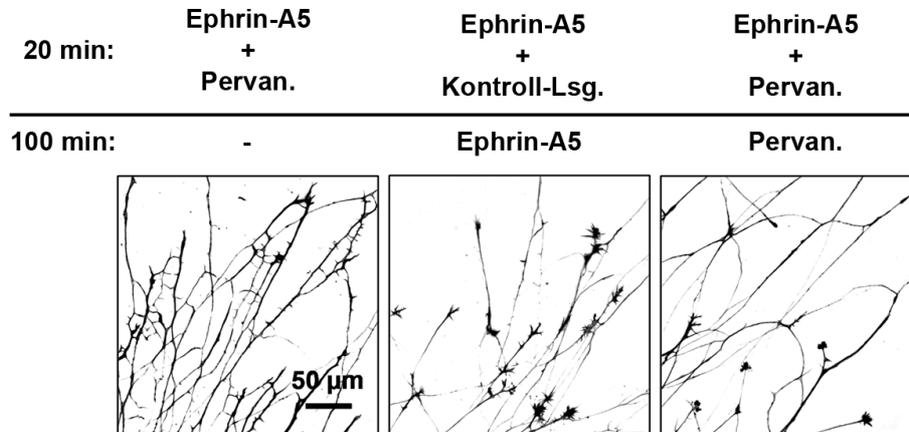
#### **3.8.4 Kontrollexperiment zur Funktionsweise des Inhibitors Pervanadat**

Die Ergebnisse, die in den vorgestellten Streifenassay-Versuchen mit Ephrin-A2 erzielt wurden, deuten darauf hin, dass der Phosphatase-Inhibitor Pervanadat einen Einfluss auf die Signaltermination von Rezeptortyrosin-Kinasen ausüben könnte. Diese Vermutung wird in einem weiteren Experiment untersucht.

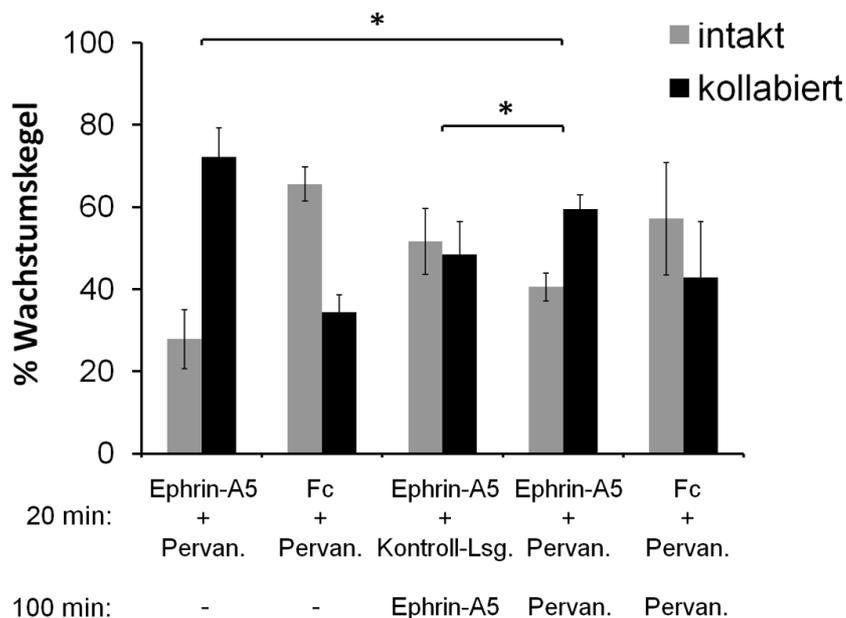
Um unterscheiden zu können, ob Pervanadat die adaptive Modulation des Ephrin-A5-Signals oder eher die Signaltermination von Rezeptortyrosin-Kinasen beeinflusst, wird folgender Versuchsansatz gewählt: Temporale Axone werden für 20 min in Medium inkubiert, das 0,25  $\mu$ g/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc und 12  $\mu$ M Pervanadat enthält. Anschließend wird das Medium gewechselt und neues Medium mit 12  $\mu$ M Pervanadat, allerdings ohne Ephrin-A5/Fc, für 100 min zugegeben. Beeinflusst Pervanadat nicht die primäre Signaltransduktion gegenüber Ephrin-A5, so ist zu erwarten, dass temporale Axone das Wachstum während der 100-minütigen Inkubationsdauer rasch wieder aufnehmen, da kein Ephrin-A5-Signal mehr vorhanden ist. Wird der Rezeptor hingegen in einem konstitutiv aktiven Zustand eingefroren, so könnte eine Wiederaufnahme des Wachstums nicht stattfinden, da die Signalkaskade selbst bei fehlendem Liganden aktiv wäre.

Abb. 3-26 zeigt die Morphologie (A) und die quantitative Auswertung (B) der Wachstumskegel.

**A**



**B**



**Abb. 3-26. Kontrolleexperiment zur Wirkungsweise des Phosphatase-Inhibitors Pervanadat.**

Nach einem durch Ephrin-A5/Fc und Pervanadat vermittelten Kollaps nehmen temporale Axone das Wachstum in Gegenwart von Pervanadat wieder auf. Allerdings in verringertem Maße, verglichen mit einer 120-minütigen Inkubation in Ephrin-A5/Fc-haltigem Medium. (A) Darstellung von Axonen, die 20 min und anschließend 100 min mit den angegebenen Medien inkubiert wurden (Phalloidin-färbung in schwarz). (B) Quantitative Auswertung der intakten und kollabierten Wachstumskegel. Die grauen Balken zeigen den Prozentsatz intakter Wachstumskegel an, die schwarzen Balken den Prozentsatz kollabierter Wachstumskegel. Pro Experiment wurden mindestens 100 Axone ausgezählt (20 min Ephrin-A5+Pervanadat, N=4, n=456; 20 min Fc+Pervanadat, N=4, n=517; 20 min Ephrin-A5+Kontroll-Lsg./100 min Ephrin-A5, N=4, n=438; 20 min Ephrin-A5+Pervanadat/100 min Pervanadat, N=5, n=533; 20 min Fc+Pervanadat/100 min Pervanadat, N=4, n=593). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die statistische Auswertung wurde mit dem Student's t-Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt.

Die 20-minütige Zugabe von geclustertem Ephrin-A5/Fc und Pervanadat führt zunächst zu einem initialen Kollaps. Während der anschließenden Inkubation in Pervanadat-haltigem Medium nehmen die Axone das Wachstum wieder auf. Ein signifikanter Unterschied nach der 20-minütigen Inkubation mit Ephrin-A5/Pervanadat und der anschließenden 100-minütigen Inkubation mit Pervanadat ohne Ephrin-A5/Fc ist festzustellen. Allerdings nehmen die Axone das Wachstum nicht in dem Maße wieder auf, wie es im Kontrollexperiment der Fall ist: Nach 120-minütiger Inkubation in Ephrin-A5-haltigem Medium zeigen 52 % der Wachstumskegel eine intakte Morphologie. Im beschriebenen Experiment sind 41 % der Wachstumskegel intakt.

Die in den Abschnitten 3.8.1 und 3.8.2 vorgestellten Effekte sind demzufolge nicht ausschließlich auf einen rein adaptiven Mechanismus zurückzuführen. Sie scheinen zum Teil in einer konstitutiven Aktivität der Eph-Rezeptoren begründet zu sein, die durch die Unterbindung der Signal-terminierenden Aktivität der Phosphatase PTPRO verursacht sein könnte.

Zusammenfassend können aus den Ergebnissen des dritten Teils der vorliegenden Arbeit folgende Schlüsse gezogen werden:

Mithilfe pharmakologischer Inhibitoren wurde versucht, die anhand immunhistochemischer Färbungen in Teil II vorgestellten Ergebnisse weiter zu unterstützen. Diese legen die Vermutung nahe, dass Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen des Hühnchens während der Adaptation gegenüber Ephrin-A5 ihre Oberflächenkonzentration an Eph-Rezeptoren nicht verändern. Die Behandlung mit dem Endocytose-Inhibitor Dynasore bestätigt diese Ergebnisse. Sowohl die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps, als auch das Axonwachstum auf hohen Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Konzentrationen und die Resensitivierung in Adaptationssubstraten sind nach der Dynasore-Zugabe unverändert. Die Untersuchung weiterer vorstellbarer Mechanismen ergab, dass auch die lokale Proteinsynthese im Wachstumskegel keinen Einfluss auf die genannten Phänomene ausübt.

Experimente mit dem Phosphatase-Inhibitor Pervanadat zeigten jedoch deutliche Effekte. Die Behandlung mit dem Inhibitor verhinderte sowohl die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps, als auch das Wachstum auf hohen Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Konzentrationen. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine Modulation der intrazellulären Ephrin-A5-Signalkaskade das Phänomen der Adaptation beeinflusst. Allerdings konnte nicht eindeutig aufgeklärt werden, inwieweit der Inhibitor einen Einfluss auf die adaptive Modulation des Ephrin-Signals ausübt und inwieweit er die primäre Signaltransduktion der Rezeptortyrosin-Kinasen beeinflusst.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Adaptation während der axonalen Lenkung von retinalen Ganglienzellen

Der Begriff „Adaptation“ wird in der vorliegenden Arbeit als „Veränderung der Antwort auf ein definiertes Signal, in Abhängigkeit der Signalstatistik“ definiert (Borst *et al.*, 2005). Mit Signalstatistik sind räumliche und zeitliche Mittelwerte eines veränderlichen Signals gemeint. Signale werden über Sensoren, z.B. Oberflächenrezeptoren in der Zellmembran, detektiert, intrazellulär verarbeitet und in spezifischer Weise beantwortet. Die Veränderung dieser Antwort, d.h. die Adaptation, vergrößert demzufolge den dynamischen Bereich des jeweiligen Sensors und gewährleistet eine effizientere Reaktion auf bestimmte Signale.

Das Phänomen der Adaptation wird in vielen biologischen Systemen beobachtet. Im Auge tritt die sog. Hell-Dunkel-Adaptation auf. Damit können auch bei verschiedenen Helligkeiten Reize effizient wahrgenommen werden (Govardovskii *et al.*, 2000; Fain *et al.*, 2001). Auch bei der bakteriellen Chemotaxis ist das Phänomen der Adaptation bekannt. Das Wechselspiel aus Methylierung und Demethylierung eines MCP-Rezeptors (**M**ethy-akzeptierendes **C**hemotaxis-**P**rotein) führt bei *E. coli* zur kontinuierlichen Sensitivierung und Desensitivierung gegenüber chemotaktisch aktiven Signalen. Dieser Mechanismus erlaubt die stetige Detektion von Konzentrationsunterschieden und demzufolge in chemotaktisch aktiven Gradienten das Auslesen der Gradientenrichtung (Prinzip eines Differenzialdetektors) (Koshland, 1980; Alon *et al.*, 1999). Der Differenzialdetektor ermöglicht das Auslesen der direktionalen Gradienten-Information und damit eine Bewegung zur Quelle oder Senke des gradiert verteilten Moleküls.

Auch während der axonalen Lenkung zeigt sich ein adaptives Verhalten von Axonen gegenüber attraktiven und repulsiven Signalen. Analog zum Mechanismus bei der bakteriellen Chemotaxis, zeigen Rückenmarksneurone aus *Xenopus* abwechselnde Phasen der Desensitivierung und Resensitivierung gegenüber den Faktoren Netrin-1 und BDNF (Ming *et al.*, 2002).

Im retinotektalen System, d.h. im engeren Sinne während des Aufbaus einer topografischen Projektion, scheinen Adaptationsvorgänge jedoch kontraintuitiv. Beim Einwachsen von retinalen Axonen ins optische Tektum oder den *Colliculus superior* werden die Wachstumskegel mit einem System aus unterschiedlich ausgerichteten, repulsiv wirkenden Ephrin- und Eph-Gradienten konfrontiert (McLaughlin und O'Leary, 2005). Die gradiert verteilte Information wird von den einwandernden Wachstumskegeln mithilfe der zugehörigen Rezeptoren beantwortet. Gradienten übermitteln essenzielle positionelle und direktionale Informationen und sind demzufolge ideal geeignet, um einen für jeden Wachstumskegel spezifischen Projektionsort zu definieren. Die retinalen Axone wachsen beim Aufbau der topografischen Projektion nicht zur Quelle oder Senke der Gradienten, sondern halten an spezifischen Positionen an, um Verknüpfungen mit tektalen Zielzellen auszubilden. Die positionelle Gradienten-Information muss daher effektiv ausgelesen werden. Wie soll ein Wachstumskegel diese Information allerdings auslesen, wenn er seine Sensitivität gegenüber den dafür nötigen Molekülen verändert?

Trotz dieser Überlegung existieren Hinweise auf adaptive Verhaltensweisen von Wachstumskegeln im retinotektalen System: *In vitro*-Experimente aus den Arbeitsgruppen von Friedrich Bonhoeffer und Martin Bastmeyer zeigen, dass Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen an spezifischen Positionen in Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Gradienten anhalten (Rosentreter *et al.*, 1998; von Philipsborn *et al.*, 2006b). Dabei wird beobachtet, dass die Wachstumskegel weiter in den Gradienten einwachsen, wenn sie vor dem Gradienten auf einem Plateau des repulsiven Signals gewachsen sind (Rosentreter *et al.*, 1998). Dieses Verhalten deutet auf eine Desensitivierung gegenüber dem Positions-Signal des Lenkungsmoleküls hin.

Bei genauer Untersuchung lässt sich ein Modell konstruieren, das die Adaptation der Axone beinhaltet und mit der Ausbildung der topografischen Projektion dennoch vereinbar ist:

Das Kennzeichen retinotektaler Verbindungen ist eine topografisch organisierte Punkt-zu-Punkt-Verbindung von Axonen retinaler Ganglienzellen mit deren Zielzellen im optischen Tektum. Die Zielfindung der Axone im Tektum kann durch die Lenkung in Richtung eines Potenzialminimums erklärt werden (Gierer, 1981). Ein von posterior nach anterior ansteigender EphA-Rezeptorgradient im optischen Tektum lenkt besonders nasale Axone durch die repulsive Interaktion mit Ephrin-A-Molekülen (*reverse signaling*) ins posteriore Tektum (Rashid *et al.*, 2005). Der von anterior nach posterior ansteigende Ephrin-A-Gradient verhindert andererseits durch ein repulsives *forward signaling* das Einwachsen temporaler Axone in posteriore Bereiche (Cheng *et al.*, 1995; Drescher *et al.*, 1995). Abhängig vom Eph/Ephrin-Besatz der

Axone, d.h. ihrer Herkunft aus der Retina, balancieren sich die repulsiven Signale zwischen Axonen und tektalen Zellen und auch die Signale zwischen einzelnen Axonfasern an bestimmten Stellen aus (Gebhardt *et al.*, 2012). In diesen Bereichen entstehen die einzelnen Terminationszonen. Ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Computermodell zur Entstehung der retinotektalen Verbindung zeigt, dass eine korrekte topografische Projektion entsteht, wenn die Wachstumskegel gegenüber dem *forward signaling* und dem *reverse signaling* in gleicher Weise adaptieren. In diesem Fall projizieren die retinalen Axone an ihre korrekten Stellen im Zielgebiet (Friebel, 2010; Fiederling, 2012).

Eine Adaptation gegenüber dem Ephrin-A-vermittelten *reverse signaling* würde auch Sinn ergeben. Aufgrund des von posterior nach anterior ansteigenden EphA-Rezeptorgradienten im Tektum müssen retinale Axone eine Schwelle erhöhter EphA-Konzentration überwachen, um ins Zielgebiet zu gelangen. Da EphA-Rezeptoren durch die Bindung an axonale Ephrine ein repulsives Signal auslösen (Rashid, 2005; Gebhardt *et al.*, 2012), ist zunächst nicht zu verstehen, wie die Axone überhaupt ins Zielgebiet gelangen. Eine Desensitivierung gegenüber dem *reverse signaling* würde ein Überwachen der EphA-Schwelle und damit ein Einwachsen ins optische Tektum erklären.

Das beschriebene Beispiel zeigt, dass die Modulation der Sensitivität von retinalen Wachstumskegeln gegenüber den an der Topografie-Entstehung beteiligten Molekülen durchaus einen wertvollen Beitrag zur Ausbildung der retinotektalen Projektion leisten kann. Die Untersuchung dieser Mechanismen liefert möglicherweise entscheidende Einblicke in die Ausbildung einer topografischen Projektion.

### **4.2 Verwendete *in vitro*-Systeme zur Untersuchung des Adaptationsverhaltens**

In dieser Arbeit wird die Adaptation von Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen des Hühnchens untersucht. Das Hühnchen (*Gallus Gallus*) ist ein beliebtes Modellsystem zur Aufklärung zellulärer Mechanismen bei der Entstehung retinotektaler Verbindungen. Die Ausbildung der retinotektalen Projektion beginnt ca. 30 Stunden nach der Befruchtung des Eies und ist mit dem Schlüpfen des Embryos abgeschlossen. Axone retinaler Ganglienzellen wachsen ab dem Embryonalstadium E 2-3 (HH-Stadium 17-20) aus der Retina aus und beginnen ca. am 6. Embryonaltag (HH-Stadium 29) mit der Ausbildung von Verknüpfungen im optischen Tektum (Thanos und Mey, 2001). Sowohl das Auge als auch das optische Tektum

sind in diesem Zeitraum bereits sehr prominent ausgeprägt und erreichen Größen von mehreren Millimetern (Abb. 1-7). Retinale Ganglienzellen lassen sich leicht explantieren und kultivieren.

Das Adaptationsverhalten wird gegenüber gelöstem und Substrat-gebundenem Ephrin-A5 untersucht. Versuche mit gelöstem Ephrin-A5 haben den Vorteil, dass sie weniger zeitaufwändig und darüber hinaus kostengünstiger durchzuführen sind. Die eingesetzten Ephrin-A5-Mengen sind gegenüber dem Substrat-gebundenem Ansatz weitaus geringer (75 ng statt ca. 1,5 µg pro Experiment). Ebenso entfällt bei der Untersuchung von gelöstem Ephrin-A5 der aufwändige Stempelvorgang, mit dem das Protein an der Oberfläche verankert wird. Andererseits muss bedacht werden, dass eine Reaktion gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5 eher der biologischen Realität entspricht. Ephrine der Klasse A sind *in vivo* durch einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998; Kullander und Klein, 2002). Sie entfalten ihre Wirkung nicht durch Sekretion und Diffusion zu den Zielzellen - dies wäre mit dem löslichen Versuchsansatz vergleichbar -, sondern lokal begrenzt an die Zelloberfläche gebunden. Diese Situation wird durch die Verankerung der Ephrin-Moleküle an ein Substrat simuliert. Allerdings gilt es zu berücksichtigen, dass die Wachstumskegel mit einer undefinierten Substrat-gebundenen Proteinkonzentration konfrontiert werden. Beim Stempelvorgang des µCP werden die PDMS-Quader zwar mit einer definierten Proteinlösung beschichtet (8 µg/ml geclustertes Ephrin-A5/Fc), doch welche Ephrin-Konzentration an die Oberfläche bindet, kann nicht vorausgesagt werden.

Da beide Versuchsansätze Vorteile in sich bergen, werden in dieser Arbeit stets beide Formen der Adaptation untersucht.

Die Adaptation gegenüber gelöstem Ephrin-A5 wird in Kollaps Assay-Experimenten, anhand der Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps, beurteilt. Die Zugabe von 1 µg/ml Ephrin-A5/Fc ins Zellkulturmedium löst bei retinalen Axonen einen Kollaps der Wachstumskegel aus. Diese Beobachtung bestätigt Ergebnisse früherer Studien, in denen sowohl gelöstes Ephrin-A5/Fc (Wahl *et al.*, 2000) als auch Ephrin-A5-transfizierte Membranen (Drescher *et al.*, 1995) oder Ephrin-A5-beschichtete Latexbeads (Weinl *et al.*, 2003) einen Kollaps bei retinalen Wachstumskegeln hervorriefen. Um das Adaptationsverhalten in einem Konzentrationsbereich zu untersuchen, der unter Umständen physiologisch von Bedeutung ist, wird die Konzentration von 0,25 µg/ml gewählt. Unter diesen Bedingungen reagieren nur temporale Axone mit einem Kollaps, während nasale Axone intakt bleiben (Abb. 3-1). Dieses Verhalten ähnelt dem Verhalten *in vivo*: Nasale Axone terminieren im posterioren Tektum, in dem hohe Ephrin-A5-Konzentrationen vorliegen (Drescher *et al.*, 1995; Goodhill und Richards, 1999). Sie scheinen das repulsive Signal in gewissem Umfang

tolerieren zu können. Temporale Axone hingegen werden von hohen Ephrin-Konzentrationen am Einwachsen in posteriore Bereiche des Tektums gehindert und eine Reaktion gegenüber diesem Lenkungssignal ist demzufolge zu erwarten.

Nach einem initialen Ephrin-A5-vermittelten Kollaps nehmen temporale Axone das Wachstum in Gegenwart von Ephrin-A5 wieder auf. Nach einer zweistündigen Inkubation in Ephrin-A5/Fc-haltigem Medium zeigen ca. 72 % der Wachstumskegel einen intakten Phänotyp, gegenüber 23 % nach einer 20-minütigen Inkubation. (Abb. 3.2). Die Funktionalität des zugegebenen Ephrin-A5/Fc wurde durch einen Kontrollversuch nachgewiesen: Ephrin-A5/Fc-haltiges Medium, mit dem eine Axonkultur für zwei Stunden inkubiert wurde, löst einen Kollaps an einer neuen Axonkultur aus. Fc-haltiges Medium führt unter gleichen Bedingungen allerdings nicht zu einem Kollaps (Abb. 3.3). Das zeigt, dass der Kollaps tatsächlich durch Ephrin-A5/Fc ausgelöst wird und dieses während des Versuchs seine Funktionalität behält. Die Wiederaufnahme des Axonwachstums erfolgt daher in Gegenwart von aktivem Ephrin-A5/Fc.

Eine Wiederaufnahme des Axonwachstums in Gegenwart von aktivem Ephrin-A5/Fc ist grundsätzlich noch kein Beweis für ein adaptives Verhalten, d.h. eine Desensitivierung. Es muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Reaktion von Axonen retinaler Ganglienzellen auf chemotaktische Signale durch das Prinzip eines Differenzialdetektors beschrieben wird. In diesem Fall würde ein Wachstumskegel nur auf Konzentrationsunterschiede reagieren und nicht auf absolute Konzentrationen. Ein solcher Mechanismus ermöglicht bei *E. coli* beispielsweise die Bewegung zur Quelle oder Senke eines chemotaktischen Gradienten (Koshland, 1980; Alon *et al.*, 1999). Wird dieses Modell für die Migration eines Wachstumskegels zugrunde gelegt, so könnte der Ephrin-A5-vermittelte Kollaps durch die Konzentrationsänderung bei der Zugabe, und die Wiederaufnahme des Wachstums in Gegenwart des repulsiven Signals durch fehlende Konzentrationsunterschiede erklärt werden. Da sich während der Wiederaufnahme des Wachstums die Konzentration des Lenkungssignals nicht verändert sondern konstant bleibt, ist ein adaptives Verhalten nicht zwingend erforderlich. Bereits veröffentlichte *in vitro*-Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen allerdings, dass Axone, die in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc wachsen, nicht mehr auf Substrat-gebundene Ephrin-A5-Muster reagieren (von Philipsborn *et al.*, 2006b; von Philipsborn, 2007). In diesen Versuchen werden retinale Axone, in Anwesenheit von gelöstem Ephrin-A5, mit einem Konzentrationsunterschied konfrontiert, in dem sie auf ein Substrat-gebundenes Muster auftreffen. Auf diese Unterschiede wird jedoch nicht mehr reagiert. Das bedeutet, dass dem Wachstum in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5 tatsächlich ein adaptives Verhalten zugrunde liegt. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass temporale retinale

Wachstumskegel gegenüber dem repulsiven Ephrin-A5-Signal desensitivieren, wenn sie nach einem Kollaps das Wachstum in dessen Gegenwart wieder aufnehmen.

Das Adaptationsverhalten gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5 wird anhand des Axonwachstums auf Adaptationssubstraten untersucht. In ihrer Doktorarbeit konnte Anne von Philipsborn zeigen, dass Axone eine Stoppfront ausbilden, wenn sie auf einer Laminin-Oberfläche auswachsen und frontal auf ein gestempeltes, streifenförmiges Ephrin-A5-Muster treffen. Werden retinale Explantate hingegen direkt auf hoch konzentrierten Ephrin-A5-Mustern ausgelegt, so wachsen die Axone unverändert aus (von Philipsborn, 2007). Analog zur Wiederaufnahme des Wachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps, ist das Auswachsen auf hohen Ephrin-Konzentrationen per se noch kein Beweis für eine Adaptation. Wird das Prinzip des Differenzialdetektors zugrunde gelegt, so wäre das Auswachsen auch ohne ein adaptives Verhalten, aufgrund des fehlenden Konzentrationsunterschiedes, möglich. Allerdings existieren Hinweise, dass die Axone nach dem Auswachsen in einem desensitivierten Zustand vorliegen:

- (1) Axone, die auf Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Mustern wachsen, reagieren nicht mehr auf eine Zugabe von gelöstem Ephrin-A5 (von Philipsborn, 2007).
- (2) Axone, die auf Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Mustern wachsen, überwachen Lücken im Muster, die eine Breite von 50-75  $\mu\text{m}$  haben und reagieren nicht auf eine nachfolgende Ephrin-A5-Front (von Philipsborn, 2007).

In beiden Fällen werden die Axone mit einem Konzentrationsunterschied konfrontiert. Im ersten Fall durch die Zugabe von gelöstem Ephrin-A5, im zweiten Fall durch eine Substrat-gebundene Ephrin-Front nach der Lücke. In beiden Fällen wird auf den herbeigeführten Konzentrationsunterschied nicht reagiert. Diese beiden Experimente verdeutlichen, dass Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen, die auf Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Mustern wachsen, tatsächlich gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal desensitiviert sind. Das Auswachsen auf diesen Mustern wird in der vorliegenden Arbeit folglich als Desensitivierung, bzw. als ein adaptives Verhalten gewertet.

### **4.3 Die Dynamik des EphA3-Rezeptors bei der Adaptation retinaler Wachstumskegel gegenüber Ephrin-A5**

#### **4.3.1 Biochemische Untersuchung des EphA3-Rezeptorgehalts**

Die Untersuchung der zellulären Mechanismen, die der Adaptation gegenüber Ephrin-A5 zugrunde liegen, bildet den Kern dieser Arbeit. Ein vorstellbarer Mechanismus beruht in diesem Zusammenhang auf der Modulation des Rezeptorlevels in der Wachstumskegelmembran. Stehen weniger Eph-Rezeptoren für die Signalübermittlung zur Verfügung, so führt dies zu einer Desensitivierung gegenüber dem repulsiven Signal - eine Erhöhung des Rezeptorgehalts würde hingegen zu einer Sensitivierung führen. Hinweise, dass ein derartiger Mechanismus unter Umständen von Bedeutung sein könnte, stammen aus der Arbeitsgruppe von Christine Holt in Cambridge. Piper *et al.*, 2005 konnten nachweisen, dass die Adaptation von retinalen *Xenopus*-Axonen gegenüber den Lenkungssignalen Sema3A und Netrin-1 abhängig von Endocytose-Mechanismen ist. Die Desensitivierung geht einher mit einer Verringerung des zugehörigen Rezeptorgehalts (Neuropilin-1 und DCC) in der Zellmembran. Während der anschließenden Resensitivierung erfolgt der Wiedereinbau des Rezeptors in die Membran (Piper *et al.*, 2005).

Um zu untersuchen, ob auch die Adaptation von retinalen Hühnchen-Wachstumskegeln gegenüber Ephrin-A5 mit einer Veränderung des Rezeptorgehalts verbunden ist, wird zunächst ein biochemischer Ansatz verfolgt. Dabei werden Retina-Explantate auf Laminin-Oberflächen ausgelegt um ein Auswachsen der Axone zu gewährleisten. Nach ca. 20-22 Stunden werden die Explantatstreifen, und damit die Zellkörper der ausgewachsenen Axone, entfernt. Die Wachstumskegel werden lysiert und die Lysate mittels Immunoblot ausgewertet.

Ziel des Versuches war es, den EphA3-Rezeptorgehalt von retinalen Wachstumskegeln zu bestimmen, die in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5 wachsen. Ein Vergleich mit unbeeinflussten Wachstumskegeln sollte Aufschluss darüber geben, ob desensitivierte Wachstumskegel einen veränderten Rezeptorgehalt aufweisen. Die Analyse des EphA3-Rezeptors wurde gewählt, weil EphA3 der bevorzugte Bindungspartner für den verwendeten Ephrin-A5-Liganden ist (Monschau *et al.*, 1997; Flanagan und Vanderhaeghen, 1998). Allerdings ließ sich der Rezeptor selbst beim Wachstum in nativem Kulturmedium nicht mittels des beschriebenen Verfahrens nachweisen. Um die Rezeptormenge zu erhöhen, wurden die Lysate aus insgesamt 120 Explantatkulturen, d.h. 240 Explantatstreifen, vereinigt und versucht, EphA3 durch eine Immunpräzipitation zu konzentrieren. Auch diese Maßnahmen erbrachten keinen Nachweis. Die Möglichkeit, dass bei der Abnahme der Explantatstreifen auch Axone

und Wachstumskegel von der Oberfläche entfernt wurden, konnte durch die Betrachtung der Oberflächen mithilfe eines Durchlicht-Mikroskops nach der Abnahme ausgeschlossen werden.

Um sicherzustellen, dass die verwendeten retinalen Ganglienzellen nach der Präparation EphA3-Rezeptoren enthalten, wurden komplette temporale und nasale Retinahälften lysiert und versucht, EphA3-Rezeptoren hieraus zu bestimmen. Die Analyse der Immunoblots nach Inkubation mit einem  $\alpha$ -EphA3-Antikörper ergab jeweils zwei Banden bei ca. 72 kDa und 115 kDa. Das Auftreten einer Bande bei 115 kDa entspricht, unter Berücksichtigung natürlicher Schwankungen, dem Molekulargewicht des nicht modifizierten EphA3-Rezeptors beim Hühnchen von 110 kDa. Ferner wurde in einer früheren Studie ein ähnliches Ergebnis erzielt: nach der Lyse von E 8-Retinae (HH-Stadium 34) des Hühnchens bestimmten Connor *et al.*, 1998 den EphA3-Rezeptor zu 116 kDa. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die detektierte Bande bei ca. 115 kDa dem intakten EphA3-Protein entspricht.

Dass bei der Detektion des EphA3-Rezeptors mehrere Gelbanden auftreten ist keine ungewöhnliche Beobachtung. Stubbs *et al.*, 2000 nutzten zum EphA3-Nachweis aus *Wallaby*-Retinae denselben Antikörper, der auch in den hier beschriebenen biochemischen Experimenten verwendet wurde (Santa Cruz, L-18). In diesen Versuchen wurden ebenfalls zwei Gelbanden detektiert, wobei eine unspezifische Bande durch die Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers erklärt wird.

Die Ergebnisse der biochemischen Analyse legen den Schluss nahe, dass der EphA3-Rezeptor in Retina-Lysaten mithilfe der vorgestellten Methode nachgewiesen werden kann. Ein weiteres Argument, das diese These unterstützt, ist die Tendenz zu höheren Banden-Intensitäten bei temporalen Retina-Lysaten. Dies entspricht der seit langem anerkannten, differenziellen EphA3-Expression in der Retina (Cheng *et al.*, 1995; McLaughlin und O`Leary, 2005). Die fehlende Detektion nach der Proteinisolierung aus retinalen Wachstumskegeln liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit am zu geringen Protein- bzw. Rezeptorgehalt, der aus den ausgewachsenen Axonen und Wachstumskegeln isoliert werden kann. Eine einfache Schätzung festigt diese Vermutung: wird davon ausgegangen, dass in jedem Wachstumskegel ca. 500 Rezeptormoleküle exprimiert werden und ca. 1500 Axone pro Explantatstreifen auswachsen, so könnte man bei einem Molekulargewicht des Rezeptors von 110-115 kDa eine Rezeptormenge von ungefähr 30 fg pro Explantatstreifen isolieren. Damit wären ca. 3000 Retinastreifen erforderlich, um eine Rezeptormenge im Bereich von 100 pg zu isolieren. Proteinmengen in dieser Größenordnung können mithilfe des hier verwendeten Immunoblots nachgewiesen werden.

### 4.3.2 Immunhistochemische Untersuchung des EphA3-Rezeptorgehaltes

Da der EphA3-Rezeptorgehalt von retinalen Wachstumskegeln mit dem beschriebenen biochemischen Verfahren nicht bestimmt werden konnte, wurde ein alternativer Ansatz verfolgt. Mithilfe immunhistochemischer Färbungen sollte versucht werden, eventuelle Unterschiede im Rezeptorgehalt zu erfassen. Die Idee des Versuchs war, retinale Explantate auf Adaptationssubstraten auszulegen und die retinalen Zellen mit einem Antikörper gegen den EphA3-Rezeptor zu färben. Ein Vergleich von Wachstumskegeln, die auf dem Muster wachsen (= desensitiviert), mit solchen, die sich gerade in einer 200 µm breiten Lücke befinden (= im Stadium der Resensitivierung), sollte Aufschluss über Unterschiede im Rezeptorgehalt geben.

Zur Färbung wurde ein Antikörper verwendet, der bereits in vorangegangenen Studien erfolgreich eingesetzt wurde. Es handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen den EphA3-Rezeptor aus dem Hühnchen, der in der Arbeitsgruppe von Hideaki Tanaka (Kumamoto University Graduate School of Medical Science, Japan) hergestellt, und dem Institut von Uwe Drescher (MRC Center for Developmental Neurobiology, King`s College, London) zur Verfügung gestellt wurde (Iwamasa *et al.*, 1999). Zur Herstellung des Antikörpers wurden weibliche BALB/c-Mäuse mit einem rekombinanten EphA3-Konstrukt immunisiert. Das Konstrukt bestand aus der extrazellulären Rezeptordomäne, die an den Fc-Teil eines humanen Antikörpers gekoppelt war. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch Färbungen an EphA3-, EphA4-, Ephrin-A5- und Ephrin-A2-transfizierten HEK293 Zellen überprüft (Hornberger *et al.*, 1999). Es zeigte sich keine Kreuzreaktivität des EphA3-Antikörpers zu den nahe verwandten Mitgliedern der Eph- und Ephrin-Familie. Die Anfärbung von Nervenfasern am optischen Nerv Austritt zeigte darüber hinaus eine differenzielle EphA3-Färbung von temporalen gegenüber nasalen Fasern (Hornberger *et al.*, 1999).

Um das geplante Experiment zuverlässig durchführen zu können, war es zunächst notwendig, die Spezifität und die Sensitivität des Antikörpers auch in unserem System zu überprüfen. Die Färbung retinaler Wachstumskegel auf einem Laminin-Substrat ergab dabei zwei wesentliche Erkenntnisse:

- (1) Werden die fixierten Wachstumskegel vor der Färbung permeabilisiert, so zeigt sich eine homogene Färbung des gesamten Wachstumskegels. Erfolgt keine Permeabilisierung, sind Patches an scheinbar zufälligen Stellen zu erkennen. Dies ist sowohl nach der Analyse mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 3-5) als auch nach Analyse mittels hochauflösender SIM zu beobachten (Abb. 3-6).

- (2) Das Färbemuster des EphA3-Rezeptors kolokalisiert, sowohl nach einer Permeabilisierung als auch ohne Permeabilisierung, stark mit Phalloidin-gefärbten Aktinfasern (Abb. 3-6). Eine Kolokalisation der EphA3-Färbung mit Mikrotubuli kann nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-7).

Eine Permeabilisierung der fixierten Wachstumskegel bewirkt die spätere Anfärbung von intrazellulärem und zellmembranständigem Rezeptor. Ohne Permeabilisierung wird ausschließlich der oberflächenständige Rezeptor erfasst, da die Zellmembran intakt bleiben sollte und der Antikörper an ein extrazelluläres Rezeptor-Epitop bindet. Die beschriebenen Beobachtungen lassen zunächst vermuten, dass EphA3-Rezeptoren möglicherweise entlang von Aktinfasern transportiert werden und nach dem Einbau in die Membran aggregiert auftreten. Dies scheint überraschend, da ein vesikulärer Proteintransport meist entlang axonaler Mikrotubuli erfolgt (Grafstein und Forman, 1980; Hirokawa, 1997; Hirokawa *et al.*, 1998). Studien aus den Jahren 2007 und 2011 zeigen darüber hinaus eine Mikrotubuli-abhängige Bewegung von Rezeptoren in der Membran. Jaqaman *et al.*, 2011 konnten eine Diffusion des CD36-Rezeptors entlang Mikrotubuli-Bahnen im Zellcortex beobachten. Bouzigues *et al.*, 2007 zeigen, dass die Umverteilung von GABA-Rezeptoren in Wachstumskegeln von Rückenmarksneuronen abhängig von Rezeptor-Mikrotubuli-Verknüpfungen ist. Eine Kolokalisation des EphA3-Rezeptors mit neuronalen Mikrotubuli konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden. Dennoch erscheint die beobachtete Kolokalisation mit Aktinfasern sinnvoll. In migrierenden Wachstumskegeln ist der Anteil an F-Aktin in der P- und T-Zone am höchsten, während der Gehalt zur C-Zone hin abnimmt. Mikrotubuli hingegen formen dichte, parallele Bündel im Axonschaft und ragen nur vereinzelt in die P-Zone des Wachstumskegels hinein (Forscher und Smith, 1988; Dent und Gertler, 2003). Das bedeutet, der überwiegende Teil des Wachstumskegels ist Aktin-reich, während sich Mikrotubuli vorwiegend im Axonschaft und in der Übergangzone zwischen Axonschaft und Wachstumskegel befinden. Ein Rezeptortransport innerhalb des Wachstumskegels und auch eine Diffusion des Rezeptors in der Membran würde demzufolge entlang der Aktinfasern Sinn ergeben, da diese weitaus prominenter ausgeprägt sind als Mikrotubuli. Darüber hinaus liegen Aktinfilamente im Wachstumskegel gebündelt und gleichermaßen orientiert vor. Die Aktinbündel sind polarisiert und es kann ihnen ein definiertes (+)-Ende und ein (-)-Ende zugeordnet werden. Eine solche Orientierung wäre für einen gerichteten Transport im Wachstumskegel von Vorteil.

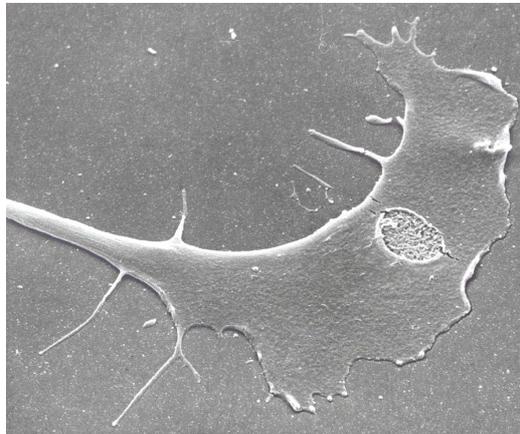
Hinweise auf einen Aktin-vermittelten Vesikel- und Organell-Transport wurden in diversen Studien erbracht. Speziell für den Transport über kurze Distanzen wurde hierzu MyosinV als notwendiges Motorprotein identifiziert (Desnos *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Puthenveedu *et al.*, 2010). Auffällig ist, dass bei den in dieser Arbeit gezeigten Färbungen nahezu das gesamte

Aktinnetzwerk (bzw. bei Färbung ohne Permeabilisierung nur bestimmte Teilbereiche) vollständig mit dem Rezeptor dekoriert zu sein scheint. Bisherige Beobachtungen lassen hingegen nur vereinzelt punktförmige Transportvesikel erkennen. Zwar zeigt die Auswertung der Immunfärbungen mittels SIM (Abb. 3-6), dass die EphA3-IR auch im vorliegenden System aus einer Aneinanderreihung einzelner Punkte besteht, aber die ungewöhnlich hohe Punktedichte auf den Phalloidin-gefärbten Aktinfasern lässt Zweifel an der Spezifität der Färbung aufkommen.

Um sich diesem Problem anzunähern, wurde überprüft, ob der verwendete EphA3-Antikörper unspezifisch an Aktin bindet. Dazu wurden drei nicht-neuronale Zelltypen, bei denen eine Expression des EphA3-Rezeptors nicht nachgewiesen wurde (MEFs, Hela-Zellen, B16-Zellen), mit dem verwendeten Antikörper gefärbt. Nach einer Permeabilisierung der fixierten Zellen ist eine leichte unspezifische Färbung im Lamellipodium zu erkennen. Eine definierte Färbung der Aktinfasern wird hingegen nicht beobachtet. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass zwischen den untersuchten Zelllinien und migrierenden Wachstumskegeln Unterschiede in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts bestehen. Migrierende Wachstumskegel weisen Filopodien mit stark gebündelten Aktinfasern auf (Lowery und Van Vactor, 2009), die in stationären, nicht-neuronalen Zellen in dieser Form nicht auftreten (Ballestrem *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde in der Darstellung der Versuchsergebnisse ein migrierender Fibroblast gezeigt (Abb. 3-11), der hinsichtlich der Aktinorganisation mit einem Wachstumskegel vergleichbar ist (Ridley *et al.*, 2003; Lowery und Van Vactor, 2009). Da jedoch nicht nur migrierende Zellen betrachtet wurden, ist nicht vollständig auszuschließen, dass die fehlende Färbung der Aktinfasern bei MEFs, Hela- und B16-Zellen in einer unterschiedlichen Aktin-Organisation begründet ist. Ein unspezifischer Anteil der Färbung kann demzufolge nicht abschließend widerlegt werden.

Die zweite Beobachtung, die die EphA3-Rezeptorfärbung erkennen lässt, ist das Auftreten von Patches an scheinbar zufälligen Stellen des Wachstumskegels, sofern keine Permeabilisierung vor der Färbung erfolgt. Dass Eph-Rezeptoren in Form von Clustern in der Zellmembran vorliegen, ist ein Phänomen, das häufig beobachtet wurde (Wimmer-Kleikamp *et al.*, 2004; Egea *et al.*, 2005; Himanen *et al.*, 2010). Nach der Bindung eines Ephrin-Liganden kann die Größe der sich ausbildenden Cluster die eigentliche Ephrin/Eph-Kontaktfläche übersteigen. Auch setzt die Clusterbildung nicht zwangsläufig einen Kontakt zwischen Rezeptor und Ligand voraus (Wimmer-Kleikamp *et al.*, 2004). Die Frage ist, ob die in dieser Arbeit aufgetretenen Patches den bereits beobachteten Clustern entsprechen. Auffällig erscheint in diesem Zusammenhang die Größe der EphA3-Patches, die bis zu 30 % der gesamten Wachstumskegelfläche betragen können. Die beispielsweise in den Studien von Egea *et al.*,

2005 und Marquardt *et al.*, 2005 beobachteten Cluster besitzen hingegen nur Größen im Sub-Mikrometer-Bereich. Aufgrund dieser Unterschiede wurde die Spezifität der Färbung in einem weiteren Experiment untersucht. Die Färbung mit einem Antikörper gegen neuronales  $\beta$ -Tubulin zeigt, dass das Auftreten der Patches ein artifizielles Färbemuster darstellt. Für die Kontrollfärbung wurden die Wachstumskegel nicht permeabilisiert. Da Tubulinfasern, im Gegensatz zum zellmembranständigen EphA3-Rezeptor, keinen Kontakt zum extrazellulären Raum besitzen, war in diesem Fall keine Färbung zu erwarten. Abb. 3-12 zeigt jedoch, dass nach der Inkubation mit einem  $\alpha$ - $\beta$ Tubulin-Antikörper Patches auftreten. Diese Patches sind zwar kleiner als die EphA3-Patches, jedoch scheint es nach diesem Ergebnis wahrscheinlich, dass die Antikörper trotz fehlender Permeabilisierung ins Zellinnere vordringen. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der verwendeten Fixierungsmethode liegen. Vor den Färbungen wurden die Wachstumskegel in einer Lösung aus 4 % PFA + 0,33 M Saccharose + 0,1 % Glutaraldehyd fixiert. Speziell eine Fixierung in Glutaraldehyd kann sichtbare Schäden an Wachstumskegelmembranen hervorrufen. Abb. 4-1 zeigt beispielhaft einen retinalen Goldfisch-Wachstumskegel nach einer Fixierung in 2 % Glutaraldehyd (M. Bastmeyer, unveröffentlichte Ergebnisse). Es ist ein deutliches Loch erkennbar.



**Abb. 4-1. Retinaler Goldfisch-Wachstumskegel nach Fixierung mit 2 % Glutaraldehyd.**

Die Abbildung zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines retinalen Goldfisch-Wachstumskegels nach Fixierung mit 2 % Glutaraldehyd. Es ist ein deutliches Loch im Wachstumskegel zu erkennen (Bastmeyer, unveröffentlichte Ergebnisse).

Zwar ist die in dieser Arbeit verwendete Glutaraldehyd-Konzentration 20-fach niedriger, jedoch ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten EphA3-Patches durch Schädigungen der Wachstumskegelmembran hervorgerufen wurden. Dadurch wäre das Eindringen des

Antikörpers ins Zellinnere und eine ektopische Bindung an Wachstumskegel-spezifische Komponenten möglich.

Obwohl die beobachteten Patches als eventuelles Färbeartefakt identifiziert wurden, besteht die Möglichkeit einer spezifischen Färbung außerhalb der Patches. Aufgrund der hohen Intensität der Patch-Färbung, wäre diese u.U. nicht leicht sichtbar. Daher, und aufgrund der Tatsache, dass der EphA3-Rezeptor mit dem verwendeten Antikörper bereits erfolgreich angefärbt werden konnte (Hornberger *et al.*, 1999), wurden Versuche zur Bestimmung des EphA3-Gehalts von retinalen Wachstumskegeln unternommen. Zur Kontrolle der Sensitivität des Antikörpers wurden temporale und nasale Wachstumskegel gefärbt und die integrierte EphA3- und Aktin-Fluoreszenzintensität im gesamten Wachstumskegel bestimmt. Für die quantitative Auswertung wurde die EphA3-Fluoreszenz auf den für Aktin ermittelten Wert normiert. Dadurch sollten Fehler vermieden werden, die durch Überlagerung mehrerer Wachstumskegel oder von Wachstumskegeln und Axonen entstehen. Bei diesem Experiment zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Axonpopulationen (sowohl nach einer Permeabilisierung als auch ohne Permeabilisierung der Wachstumskegel), der der gradierten Rezeptorverteilung *in vivo* entspricht (Abb. 3-8) (Cheng *et al.*, 1995; McLaughlin und O'Leary, 2005). Das Verhältnis zwischen temporaler und nasaler EphA3-Fluoreszenz zeigt in etwa einen doppelt so hohen Wert für temporale Axone (permeabilisiert: 2,04; unpermeabilisiert 1,74). Dieser Wert liegt unter dem von Reber *et al.*, 2004 durch *in situ*-Hybridisierung bestimmten Wert (ca. 2,5). Allerdings sind diese Ergebnisse nur begrenzt vergleichbar: Reber *et al.*, 2004 untersuchten nicht den EphA3-Rezeptor, sondern die kumulative Verteilung von EphA4, EphA5 und EphA6. Desweiteren bezieht sich der von Reber ermittelte Wert auf den Vergleich der extremen Retina-Bereiche, d.h. den am weitesten temporal und den am weitesten nasal gelegenen Bereich. In dieser Arbeit wurde hingegen nur zwischen temporal und nasal unterschieden, jedoch keine weitere Einteilung hinsichtlich des Ursprungsortes vorgenommen. Auch untersuchten Reber *et al.*, 2004 nicht die Protein- sondern die RNA-Verteilung der Rezeptoren durch *in situ*-Hybridisierung.

Mit dem verwendeten Antikörper konnten Unterschiede im Rezeptorgehalt von temporalen und nasalen Wachstumskegeln ermittelt werden. Zusätzlich zu einer eventuellen unspezifischen Färbung tritt folglich ein spezifischer Anteil der Färbung auf. Deshalb kann der Antikörper zur Untersuchung des Rezeptorgehalts von desensitvierten und resensitivierenden Wachstumskegeln verwendet werden. Nasale Wachstumskegel reagieren nicht auf Substrat-gebundene Ephrin-A5-Gradienten (von Philippsborn *et al.*, 2006). Es würde folglich Sinn

ergeben, dass temporale Wachstumskegel während der Desensitivierung ihr Rezeptorniveau dem der Nasalen angleichen und während der Resensitivierung das ursprüngliche Niveau wieder herstellen. Der Vergleich von desensitivierten und resensitivierenden Wachstumskegeln zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen beiden Axonpopulationen. Dieses Ergebnis legt zunächst den Schluss nahe, dass ein Adaptationsmechanismus, der auf der Modulation des Rezeptorlevels beruht, unwahrscheinlich ist. In diesem Punkt würde sich die Adaptation gegenüber Ephrin-A5 von der Adaptation gegenüber Sema3A unterscheiden. Die Desensitivierung und Resensitivierung gegenüber Sema3A ist mit einer Verringerung bzw. Erhöhung des Neuropilin-1-Gehalts in der Wachstumskegelmembran verbunden (Piper *et al.*, 2005). Allerdings bleiben bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Färbungen Zweifel an der Spezifität der Rezeptorfärbung bestehen, die weitere Untersuchungen erfordern. Das Patch-artige Auftreten des Rezeptors wurde als artifizielles Färbemuster identifiziert. Ein weiterer Aspekt, der berücksichtigt werden muss, ist, dass mit dem verwendeten Antikörper nur der EphA3-Rezeptor untersucht werden kann. Es erfolgt keine Färbung weiterer Rezeptoren der EphA-Familie (Hornberger *et al.*, 1999). Zwar stellt EphA3 den bevorzugten Bindungspartner für den Ephrin-A5-Liganden dar, jedoch werden in der Hühnchen-Retina auch EphA4, EphA5 und EphA6 exprimiert (McLaughlin and O'Leary, 2005). Es muss folglich die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass sich eventuelle Veränderungen des Rezeptorlevels auf andere Rezeptoren auswirkt. Aus den genannten Gründen wurde versucht, die erzielten Ergebnisse durch Experimente mit pharmakologischen Inhibitoren weiter zu festigen.

## **4.4 Der molekulare Mechanismus der Adaptation von retinalen Wachstumskegeln gegenüber Ephrin-A5**

### **4.4.1 Einfluss der Endocytose auf die Adaptation gegenüber Ephrin-A5**

Die Frage, ob retinale Wachstumskegel während der Adaptation ihren Rezeptorgehalt verändern, konnte durch immunhistochemische Färbungen nicht zweifelsfrei beantwortet werden. Deshalb wurden zusätzlich Versuche mit pharmakologischen Endocytose-Inhibitoren durchgeführt, um die erzielten Ergebnisse weiter zu unterstützen. Eingesetzt wurde der Inhibitor Dynasore zur Blockierung der GTPasen Dynamin1 und Dynamin2 (Macia *et al.*, 2006; Kirchhausen *et al.*, 2008). Dynamine sind für die Abschnürung von endocytotischen Vesikeln während der Clathrin-vermittelten Endocytose verantwortlich (Takei *et al.*, 2005; Doherty und McMahon, 2009). Die Untersuchung der Adaptation gegenüber Substrat-gebundenen Ephrin-A5 erfolgte zusätzlich mit dem Inhibitor MDC. Dieser inhibiert das aktive Zentrum einer

Transglutaminase, die für die Ausbildung der endocytotischen Vesikel benötigt wird (Ray und Samanta, 1996; Schütze *et al.*, 1999). Spielt die Endocytose von Eph-Rezeptoren eine Rolle bei der Adaptation gegenüber Ephrin-A5, so sollten nach einer Inhibitorzugabe Veränderungen am De- und Resensitivierungsverhalten auftreten. Ein Vorteil dieser Herangehensweise liegt u.a. darin, dass alle exprimierten Eph-Rezeptoren erfasst werden und nicht nur EphA3, das durch die Immunhistochemie gezielt untersucht wurde.

Die durchgeführten Experimente zeigen zunächst, dass die Clathrin-vermittelte Endocytose keinen Einfluss auf die initiale Reaktion gegenüber Ephrin-A5 ausübt - weder gegenüber gelöstem (Abb. 3-13), noch gegenüber Substrat-gebundenem (Abb. 3-15) Ephrin-A5. Dieses Ergebnis steht teilweise im Widerspruch zu vorhergehenden Studien. Journey *et al.*, 2002 konnten einen Anstieg der Rac1-Aktivität in Hühnchen-Wachstumskegeln nach drei- bis fünfminütiger Inkubation mit den gelösten Lenkungsmolekülen Ephrin-A2 und Sema3A beobachten. Dieser Anstieg war mit einer drastischen Erhöhung der Dextran-Endocytose verbunden und wurde als Voraussetzung für den Ephrin-A2- bzw. Sema3A-vermittelten Kollaps identifiziert. Fournier *et al.*, 2000 zeigen darüber hinaus eine erhöhte Dextran-Endocytose nach Stimulation mit gelöstem Ephrin-A5. Allerdings bestehen Unterschiede in den jeweiligen Versuchsdurchführungen. Journey *et al.*, 2002 arbeiteten mit einer Ephrin-A2/Fc-Konzentration von 1 µg/ml während in den vergleichbaren Experimenten der vorliegenden Arbeit 0,25 µg/ml Ephrin-A5/Fc verwendet wurde. Abb. 3-1 zeigt, dass eine Konzentration von 1 µg/ml Ephrin-A5/Fc einen Kollaps bei temporalen und nasalen Wachstumskegeln hervorruft. Da dies nicht dem topografisch differenziellen Verhalten *in vivo* entspricht, wird diese Konzentration nicht als physiologisch angesehen. Es besteht die Möglichkeit, dass die mit dem Ephrin-A2-vermittelten Kollaps einhergehende Endocytose aufgrund der höheren Ephrin-Konzentration auftritt, die - wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte - *in vitro* veränderte Reaktion bei retinalen Wachstumskegeln hervorruft. Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass Journey *et al.*, 2002 keine unmittelbare Abhängigkeit des Ephrin-A2-vermittelten Kollaps von der Endocytose nachweisen. Es wird stets die Abhängigkeit von Rac1 untersucht, das letztendlich als Stimulator der Endocytose identifiziert werden konnte. Die Dextran-Endocytose geht mit dem Kollaps einher, ob sie allerdings direkt von ihm abhängt bleibt unbeantwortet. Auch sind konzentrationsabhängige Effekte des Ephrin-A2-Liganden auf retinale Ganglienzellaxonen (Hansen *et al.*, 2004; Petros *et al.*, 2010) und eine konzentrationsabhängige Rac-Aktivierung durch verschiedene Liganden in verschiedenen Systemen bekannt (Maillet *et al.*, 2003; Adamson *et al.*, 2010). Es ist demzufolge nicht ausgeschlossen, dass die unterschiedlich eingesetzten Ephrin-A-Konzentrationen zu verschiedenen Rac1-Aktivitäten und damit auch zu verschiedenen Ergebnissen führen.

Die von Fournier *et al.*, 2000 durchgeführten Versuche wurden, im Unterschied zu dieser Arbeit, nicht mit rekombinanten Ephrin-Konstrukten durchgeführt, sondern mit Membranfragmenten von Ephrin-A5-transfizierten Zellen. Die eingesetzte Konzentration von 30 µg/ml erlaubt keine Aussage über den Gehalt an Ephrin-A5, sondern bezieht sich auf die Gesamtproteinkonzentration in den Membranfragmenten. Demzufolge können die Ergebnisse nur bedingt mit den hier ermittelten Ergebnissen verglichen werden. Die isolierten Membranen enthalten nicht ausschließlich Ephrin-A5, sondern weitere endogene Membranproteine und sind demzufolge undefiniert zusammengesetzt.

Ein weiterer Punkt, der beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden muss ist, dass die hier verwendeten Inhibitoren Dynasore und MDC entweder ausschließlich die Clathrin-vermittelte Endocytose inhibieren (MDC) oder nur solche Mechanismen, an denen Dynamin beteiligt ist. Andere Mechanismen werden nicht beeinflusst. Nach Doherty und McMahon, 2009 existiert eine Vielzahl weiterer Endocytose-Mechanismen, an denen Dynamin nicht beteiligt ist oder eine Beteiligung noch nicht sicher nachgewiesen werden konnte. Es ist demzufolge möglich, dass der von Journey und Fournier beobachteten Ephrin-A5-vermittelten Endocytose andere Mechanismen zugrunde liegen, die hier nicht erfasst wurden. Dies würde auch Sinn ergeben, da die Clathrin-vermittelte Endocytose auf spezifische Signale hin hauptsächlich Membranrezeptoren internalisiert (LeRoy und Wrana, 2005; Doherty und McMahon, 2009), während es bei einem Kollaps retinaler Wachstumskegel in erster Linie darauf ankommen würde, unspezifisch Membranen zur Reduktion der Wachstumskegelfläche zu internalisieren.

Die Abhängigkeit der initialen Reaktionen von Endocytose-Mechanismen wurde auch für Lenkungsmoleküle der Ephrin-B-Klasse untersucht (Zimmer *et al.*, 2003). Allerdings lassen diese Versuche vermuten, dass die Endocytose nicht für den initialen Kollaps, sondern für die Retraktion des Wachstumskegels nach Kontakt mit einer Ephrin-B-exprimierenden Zelle verantwortlich ist. Diese Situation ist ungefähr mit der initialen Reaktion gegenüber Substratgebundenem Ephrin-A5 vergleichbar. In beiden Fällen treffen Wachstumskegel auf Substrat- bzw. Zell-verankertes Ephrin und in beiden Fällen tritt eine repulsive Reaktion auf. Allerdings ziehen sich die Axone nach unterdrückter Endocytose nicht zurück.

Da die in dieser Arbeit beobachtete Unabhängigkeit der initialen Wachstumskegel-Reaktion von Clathrin-vermittelter Endocytose im Widerspruch zu veröffentlichten Arbeiten steht, wurde die Funktionalität der Inhibitoren in einem separaten Experiment überprüft. Damit sollte getestet werden, ob die Inhibitoren im verwendeten Medium wirksam sind. Dazu wurde die Transferrin-Endocytose von A594-Zellen untersucht. Abb. 3-17 und 3-18 zeigen, dass Dynasore in einer Konzentration von 80 µM die endocytotische Aufnahme effektiv unterdrückt und somit im

verwendeten F12-Medium wirksam ist. Dies bestätigt vorhergehende Studien, die den Inhibitor in gleichen Konzentrationen einsetzten (Macia *et al.*, 2006; Kirchhausen *et al.*, 2008). Für den Inhibitor MDC konnte keine Unterdrückung der endocytotischen Transferrin-Aufnahme nachgewiesen werden. Allerdings wurden die Versuche zur Adaptation gegenüber Ephrin-A5 mit der gleichen Konzentration durchgeführt, die bereits erfolgreich zur Inhibition genutzt wurden (Piper *et al.*, 2005).

Da Dynasore unter den eingesetzten Bedingungen die Clathrin-vermittelte Endocytose wirksam inhibiert, sind die mit diesem Inhibitor erzielten Ergebnisse aussagekräftig. Ein Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose auf die initialen Reaktionen gegenüber Ephrin-A5 konnten nicht nachgewiesen werden. Dieser Aspekt ist die entscheidende Voraussetzung um Einflüsse auf das De- und Resensitivierungsverhalten untersuchen zu können. Bei der Untersuchung der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 konnte kein Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose nachgewiesen werden. Die Wiederaufnahme des Wachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps (Abb. 3-14) und das Auswachsen auf hohen Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Konzentrationen (Abb. 3-15) sind nach Zugabe des Inhibitors unverändert.

Diese Unabhängigkeit der De- und Resensitivierung von Clathrin-vermittelter Endocytose unterscheidet sich teilweise von Reaktionen anderer Lenkungsmoleküle. Die Adaptation von *Xenopus*-Wachstumskegeln gegenüber Sema3A und Netrin-1 beinhaltet eine schnelle, ungefähr zwei Minuten dauernde Desensitivierungsphase und eine langsamere Resensitivierung. Die Desensitivierung ist jeweils abhängig von Clathrin-vermittelter Endocytose und verbunden mit einer Verringerung des Rezeptorgehalts in der Wachstumskegelmembran. Ein Einfluss der Endocytose bei der Resensitivierung wurde hingegen, wie in dieser Arbeit, nicht festgestellt (Piper *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde stets die Adaptation gegenüber gelöstem und Substrat-gebundenem Ephrin-A5 untersucht. Ein Einfluss der Clathrin-vermittelten Endocytose konnte in beiden *in vitro*-Systemen nicht nachgewiesen werden. Diese Tatsache unterstützt die Vermutung zusätzlich, dass die Clathrin-vermittelte Endocytose keinen generellen Einfluss auf die hier untersuchten Phänomene ausübt. Ein genauer Vergleich der Reaktionen zwischen gelöstem und Substrat-gebundenem Ephrin-A5 ist jedoch schwierig, da während des  $\mu$ CP eine undefinierte Proteinmenge an die Oberfläche bindet. D.h. es kann nicht vorausgesagt werden mit welcher Ephrin-Konzentration die Wachstumskegel konfrontiert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Clathrin-vermittelte Endocytose keinen Einfluss auf die Adaptation gegenüber gelöstem und Substrat-gebundenem Ephrin-A5 ausübt.

Ob Endocytosemechanismen, und damit evtl. Veränderungen des Eph-Rezeptorlevels, an den genannten Phänomenen grundsätzlich nicht beteiligt sind, kann allerdings nicht beurteilt werden, da Mechanismen existieren, die mit den verwendeten Inhibitoren nicht erfasst wurden (Doherty und McMahon, 2009).

#### **4.4.2 Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Adaptation gegenüber Ephrin-A5**

Neuronale Wachstumskegel enthalten die für eine Proteintranslation nötigen Komponenten (Tennyson, 1970; Bassell *et al.*, 1998) und nutzen diese zur lokalen Proteinsynthese (Davis *et al.*, 1992; Crino und Eberwine, 1996). Mechanismen, die die Adaptation gegenüber dem repulsiven Lenkungssignal Ephrin-A5 erlauben und an denen die Translationsmaschinerie beteiligt ist, sind durchaus vorstellbar. Beispielsweise wurde gezeigt, dass die Wirksamkeit von Ephrin-A-Liganden in *trans* durch eine *cis*-Interaktion der zugehörigen Rezeptoren mit Ephrinen in derselben Membran verringert wird (Hornberger *et al.*, 1999, Gebhardt *et al.*, 2012). Die Synthese von neuen Liganden und eine damit verbundene verstärkte *cis*-Interaktion wäre demzufolge ein vorstellbarer Mechanismus, der einer Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 zugrunde liegen könnte. Eine Neusynthese von Rezeptormolekülen wäre hingegen ein Mittel um Wachstumskegel zu (re-)sensitivieren.

Anne von Philipsborn konnte bereits 2007 zeigen, dass die initialen Reaktionen und die Resensitivierung von retinalen Hühnchen-Wachstumskegeln gegenüber Ephrin-A5 nicht von lokaler Proteinsynthese abhängen (von Philipsborn, 2007). Die Ergebnisse zur initialen Reaktion gegenüber gelöstem Ephrin-A5 konnten in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 3-19). Der Einfluss auf die Desensitivierung wurde hingegen noch nicht untersucht und daher in dieser Arbeit thematisiert. Dazu wurde der Inhibitor AIM eingesetzt, der die Ausbildung von Peptidbindungen durch eine Peptidyl-Transferase blockiert. Die verwendete Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  wurde bereits in vorangegangenen Studien erfolgreich zur Inhibition verwendet. Wachstumskegel zeigen bis zu vier Stunden nach 40  $\mu\text{M}$  AIM-Zugabe keine veränderte Morphologie und auch keine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit (Campbell und Holt, 2001; von Philipsborn 2007). Die Funktionalität des Inhibitors wurde durch folgende Beobachtungen bestätigt: Die Zugabe des Inhibitors unmittelbar nach dem Auslegen der Retina-Explantate verhindert generell ein Auswachsen der Axone. Desweiteren führt eine mehr als vierstündige Inkubation mit dem Inhibitor zur Beendigung des Axonwachstums und zum Kollaps der Wachstumskegel.

Die Untersuchung der Desensitivierung gegenüber gelöstem und Substrat-gebundenem Ephrin-A5 zeigt in beiden Fällen keinen Einfluss der lokalen Proteinsynthese. Die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach dem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps unterscheidet sich nach Zugabe von AIM nicht signifikant von der DMSO-Kontrolle (Abb. 3-19). Auffallend bei diesem Experiment ist, dass die Wiederaufnahme des Wachstums selbst in der Kontrollsituation langsamer verläuft, als in den zuvor gezeigten Experimenten. Nach 120 min zeigen nur ca. 51 % der Wachstumskegel einen intakten Phänotyp. Für die Gesamtaussage hat diese Veränderung keine Auswirkungen, da zwischen der 20-minütigen und der 120 minütigen Inkubation mit Ephrin-A5/Fc trotzdem ein signifikanter Unterschied festzustellen ist. Der Grund für die langsamere Wiederaufnahme des Wachstums könnte u.U. in der DMSO-Zugabe liegen. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsansätzen herzustellen, wurde im Kontrollansatz eine dem Volumen der AIM-Lösung vergleichbare Menge an DMSO zugegeben. Der DMSO-Anteil am Gesamtvolumen betrug in diesem Fall 0,5 %. Im entsprechenden Experiment mit dem Endocytose-Inhibitor Dynasore (Abb. 3-14) betrug dieser Anteil nur 0,15 %. Unter Umständen wirkt sich dieser Unterschied auf die beschriebene Art und Weise aus.

Die Desensitivierung gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5 kann bei Verwendung von AIM, im Gegensatz zu Dynasore, nicht anhand des Auswachsverhaltens auf Adaptationssubstraten beurteilt werden. Wie bereits beschrieben, führt AIM nach vierstündiger Inkubation zur Beendigung des Axonwachstums und verhindert bei einer Übernacht-Inkubation generell das Auswachsen der Axone. Aus diesem Grund wurde ein alternatives Experiment durchgeführt. Retinale Explantate wurden auf Adaptationssubstraten ausgelegt und in F12-MZ-Medium ohne Inhibitor kultiviert. Unter diesen Bedingungen wachsen die Axone auf den hohen Ephrin-Konzentrationen aus und es kann davon ausgegangen werden, dass sie sich in einem desensitvierten Zustand befinden (siehe Abschnitt 4.2). Die auf dem Ephrin-A5-Muster wachsenden Axone wurden mit AIM behandelt. Bei einem Einfluss der lokalen Proteinsynthese wäre eine Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 nun nicht mehr möglich und ein Kollabieren der Wachstumskegel wahrscheinlich. Nach Zugabe von AIM zeigt sich jedoch keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollsituation. Der Anteil an intakten und kollabierten Wachstumskegeln unterscheidet sich nicht signifikant (Abb. 3-20). Ein Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Desensitivierung scheint deshalb unwahrscheinlich. Allerdings muss festgestellt werden, dass durch dieses Experiment nicht die Fähigkeit zur Desensitivierung erfasst wird, sondern die Aufrechterhaltung des desensitvierten Zustandes. Eventuelle Unterschiede zwischen diesen beiden Mechanismen werden im beschriebenen Versuch nicht berücksichtigt.

Die Unabhängigkeit der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 von lokaler Proteinsynthese unterstützt bereits veröffentlichte Versuche. Piper *et al.*, 2005 konnten nach Inkubation mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid keinen Einfluss auf die Desensitivierung von retinalen *Xenopus*-Axonen gegenüber Sema3A und Netrin-1 feststellen. Auch Ming *et al.*, 2002 zeigen keinen Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die Desensitivierung von Rückenmarksneuronen gegenüber Netrin-1 und BDNF.

Allerdings zeigen die beiden genannten Studien einen Einfluss der lokalen Proteinsynthese auf die initiale Reaktion und die Resensitivierung gegenüber Sema3A, Netrin-1 und BDNF (Ming *et al.*, 2002; Piper *et al.*, 2005). In dieser Hinsicht unterscheiden sich die Moleküle vom repulsiven Lenkungssignal Ephrin-A5 (von Philipsborn, 2007; Abschnitt 3.7 dieser Arbeit). Da jedoch die intrazellulären Mechanismen der Signalweiterleitung verschieden sind (Guan und Rao, 2003; Bashaw und Klein, 2010), scheinen auch verschiedene Adaptationsmechanismen möglich.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die lokale Proteinsynthese keinen Einfluss auf die Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 ausübt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Untersuchungen an gelöstem und Substrat-gebundenem Ephrin-A5. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass beim Experiment mit Substrat-gebundenem Ephrin-A5 nicht die Fähigkeit zur Desensitivierung, sondern die Aufrechterhaltung des desensitvierten Zustandes untersucht wurde. Sollten beide Phänomene über unterschiedliche Mechanismen verlaufen, wurden diese nicht erfasst.

#### **4.4.3 Einfluss der Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen auf die Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5**

Eine Möglichkeit, die Sensitivität von retinalen Wachstumskegeln gegenüber Ephrin-A5 zu regulieren, besteht darin, in die Signaltransduktionskaskade der Eph-Rezeptoren einzugreifen. Das würde bedeuten, dass sowohl die Rezeptor-Liganden-Bindung, als auch der Rezeptorgehalt in der Membran unverändert bleiben könnte. Eine korrekte Signalweiterleitung und damit eine spezifische Reaktion der Wachstumskegel wäre hingegen nicht mehr möglich. Retinale Ganglienzellen des Hühnchens exprimieren beispielsweise in Zellkörpern und Wachstumskegeln die transmembrane Phosphatase PTPRO (frühere Bezeichnung: CRYP-2, Ledig *et al.*, 1999), die nachweislich EphA3-Rezeptoren dephosphoryliert und deren Signaltransduktion unterbinden kann (Shintani *et al.*, 2006).

Um einen Eindruck davon zu bekommen, ob Modulationen intrazellulärer Signalkaskaden eine Rolle bei der Adaptation gegenüber Ephrin-A5 spielen, wurden Experimente mit dem Inhibitor

Pervanadat durchgeführt. Pervanadat inhibiert Protein-Tyrosin-Phosphatasen irreversibel durch die Oxidation des katalytischen Cysteins im aktiven Zentrum des Enzyms (Huyer *et al.*, 1997). Da Eph-Rezeptoren zur Klasse der Rezeptortyrosin-Kinasen gehören (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998; Klein, 2004), spielt die wechselseitige Tyrosin-Phosphorylierung von Rezeptordimeren eine wesentliche Rolle bei der Signalweiterleitung. Ist beispielsweise eine Dephosphorylierung der Rezeptoren an Adaptationsvorgängen beteiligt, so könnten Axone nach Inhibition der Phosphatasen nicht mehr gegenüber dem Lenkungssignal desensitivieren. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass es sich beim verwendeten Inhibitor um einen unspezifischen Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor handelt.

Die durchgeführten Versuche deuten zunächst daraufhin, dass die Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen einen Einfluss auf die Desensitivierung retinaler Wachstumskegel gegenüber gelöstem Ephrin-A5 ausüben könnte. Die Wiederaufnahme des Axonwachstums nach einem Ephrin-A5-vermittelten Kollaps ist nach der Zugabe von 12  $\mu\text{M}$  Pervanadat signifikant unterdrückt (Abb. 3-21). Die Fähigkeit in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc das Wachstum wieder aufzunehmen kann, wie in Abschnitt 4.2 ausführlich erläutert, als Indiz für ein adaptives Verhalten gewertet werden (von Philipsborn *et al.*, 2006b, von Philipsborn, 2007). Da eine Pervanadat-Zugabe dieses Verhalten unterdrückt, könnte dies mit einem Verlust der Desensitivierung erklärt werden. Ein ähnlicher Schluss kann nach Untersuchung des Auswachsverhaltens gezogen werden (Abb. 3-22). Werden Retina-Explantate in F12-MZ-Medium kultiviert, das 0,25  $\mu\text{g/ml}$  geclustertes Ephrin-A5/Fc enthält, so wachsen Axone aus dem Explantat aus. Wird dem Medium zusätzlich Pervanadat zugegeben, so ist der Anteil auswachsender Axone signifikant reduziert. Auch diese Beobachtung könnte mit einer fehlenden Desensitivierung erklärt werden. Axone, die in Gegenwart von gelöstem Ephrin-A5/Fc wachsen, reagieren nicht mehr auf Substrat-gebundene Ephrin-Muster (von Philipsborn *et al.*, 2006b; von Philipsborn, 2007). Das zeigt, dass das Auswachsen in Ephrin-A5/Fc-haltigem Medium mit einer Desensitivierung einher geht. Auffallend an diesem Experiment ist, dass selbst bei alleiniger Zugabe von Ephrin-A5/Fc deutlich weniger Axone auswachsen als in der Positivkontrolle. Diese Beobachtung unterscheidet sich vom Verhalten gegenüber Substrat-gebundenem Ephrin-A5. Anne von Philipsborn verglich 2007 das Auswachsverhalten auf Laminin-Oberflächen mit dem Auswachsverhalten auf Substrat-gebundenen Ephrin-A5-Mustern. Dabei wurde nur ein leicht verringertes Auswachsen auf den Ephrin-Mustern beobachtet (von Philipsborn, 2007). Die Zugabe von gelöstem Ephrin-A5/Fc scheint einen ausgeprägteren Effekt auszuüben, verglichen mit Substrat-gebundenem Ephrin-A5/Fc. An der Gesamtaussage des Experiments ändert dieses Verhalten jedoch nichts,

da ein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit alleiniger Ephrin-A5/Fc-Zugabe und denen mit Ephrin-A5/Fc+Pervanadat-Zugabe besteht.

Die beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pervanadat die Fähigkeit zur Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 beeinflusst. Auch das Verhalten gegenüber Substratgebundenen Ephrin-A5-Mustern legt diesen Schluss nahe. In einem ersten Experiment wurden Retina-Explantate diagonal auf Adaptationssubstraten ausgelegt, sodass ein Teil des Explantats Kontakt zur Laminin-Oberfläche, der andere Teil zum Ephrin-Substrat hatte. Unter Kontrollbedingungen wachsen Axone sowohl auf der Laminin-Oberfläche als auch auf dem Ephrin-A5-Muster aus (Abb. 3-23). Diese Beobachtung bestätigt vorhergehende Ergebnisse (von Philipsborn, 2007). Wird dem Medium Pervanadat zugegeben, so wachsen Axone nur noch auf der Laminin-Oberfläche aus, jedoch nicht mehr auf dem Ephrin-Substrat (Abb. 3-23). Dieses Resultat ist konsistent mit einem Verlust des adaptiven Verhaltens. Desweiteren zeigen Wachstumskegel, die auf einem Ephrin-A5-Muster wachsen, eine erhöhte Kollapsrate nach Zugabe von Pervanadat. Auch dieses Ergebnis kann durch einen Verlust des adaptiven Verhaltens erklärt werden. Nach Zugabe des Inhibitors ist eine Aufrechterhaltung des desensitivierten Zustandes nicht mehr möglich. Da die Wachstumskegel auf dem Muster jedoch mit hohen Konzentrationen des repulsiven Signals konfrontiert sind, führt diese Behandlung zu einem Kollaps.

Die diskutierten Effekte lassen vermuten, dass Dephosphorylierungen, möglicherweise von Eph-Rezeptoren, einen zentralen Beitrag zur Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 leisten. Bei genauerer Betrachtung bleibt allerdings festzustellen, dass sich Pervanadat nicht notwendigerweise auf den Adaptationsmechanismus auswirkt. Tyrosin-Phosphatasen spielen nicht nur bei der Adaptation eine Rolle, sondern sind generell ein zentraler Bestandteil aller Rezeptortyrosin-Kinase-Signalkaskaden. Um die durch intrazelluläre Phosphorylierung aktivierten Rezeptoren nicht in einem konstitutiv aktiven Zustand zu belassen, d.h. um das Signal zu terminieren, ist die Entfernung der Tyrosin-Phosphorylierung erforderlich. Diese Aufgabe übernehmen Tyrosin-Phosphatasen (Elchebly *et al.*, 1999; Schlessinger, 2000). Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass die bisher beschriebenen Effekte durch zwei Modelle erklärt werden können:

- (1) Pervanadat beeinflusst die Modulation des Ephrin-A5-Signals; d.h. die intrazelluläre Signalweiterleitung funktioniert normal und nur der kontinuierliche und adaptive Eingriff in die Signalkaskade ist unterbunden.
- (2) Pervanadat beeinflusst nicht die Adaptation, sondern die Signaltermination der Eph-Rezeptoren. Die Rezeptoren werden in ihrem aktiven Zustand eingefroren.

Um zu überprüfen, welcher der beiden Mechanismen hauptsächlich beeinflusst wird, wurde das Verhalten retinaler Axone im Streifenassay mit Ephrin-A2 untersucht. Der Streifenassay (Vielmetter *et al.*, 1990) untersucht in erster Linie nicht das adaptive Verhalten, sondern adressiert die primäre Signaltransduktion im Wachstumskegel. Shintani *et al.*, 2006 konnten zeigen, dass nasale Axone auf Substrat-gebundene Ephrin-A2-Streifen reagieren, wenn sie mit einem dominant-negativen PTPRO-Konstrukt transfiziert werden. Die Idee des in dieser Arbeit durchgeführten Versuchs war es, zu überprüfen, ob dieses Ergebnis durch die Phosphatase-Inhibition mit Pervanadat bestätigt werden kann. Werden nasale Axone unter Kontrollbedingungen mit alternierenden Ephrin-A2/Laminin-Streifen konfrontiert, so zeigen sie keine Reaktion auf das Substrat-gebundene Lenkungsmolekül. Temporale Axone hingegen wachsen vorwiegend in den Laminin-Bahnen. Dieses topografisch differenzielle Verhalten ähnelt dem Verhalten *in vivo* (Cheng *et al.*, 1995; McLaughlin und O'Leary, 2005). Wird dem Kulturmedium Pervanadat zugegeben, so verändert sich das Wachstum der temporalen Axone nicht, wohingegen nasale Axone die Ephrin-Streifen vermeiden (Abb. 3-25). Pervanadat beeinflusst demzufolge das Verhalten der nasalen Axone im Streifenassay. Es könnte daher davon ausgegangen werden, dass der Inhibitor in erster Linie die primäre Signaltransduktion und nicht den adaptiven Mechanismus beeinflusst. Unter dieser Annahme wäre das Verhalten wie folgt zu erklären: Da nasale Axone im Vergleich zu temporalen weniger Eph-Rezeptoren exprimieren (Cheng *et al.*, 1995; McLaughlin und O'Leary, 2005) und die Rezeptoren einer, möglicherweise durch PTPRO vermittelten, Signaltermination unterliegen, reicht die Rezeptoraktivierung unter Kontrollbedingungen nicht aus, um eine Reaktion auszulösen. Nach Zugabe von Pervanadat wird die Signaltermination unterbunden und die Sensitivität gegenüber Ephrin-A2 erhöht. Allerdings ist das beobachtete Ergebnis auch durch eine endogene Adaptation der nasalen Axone erklärbar: Nasale Axone exprimieren nur geringe Mengen an Eph-Rezeptoren und stattdessen überwiegend Ephrin-Liganden. Angesichts des geringen Rezeptorbesatzes reichen möglicherweise wenige tangentielle Berührungen mit den Substrat-gebundenen Ephrin-Streifen aus um den Adaptationsmechanismus auszulösen. Das beschriebene Experiment kann die ursprünglich gestellte Frage nach dem Wirkmechanismus von Pervanadat daher nicht eindeutig beantworten.

Deshalb wurde ein weiterer Ansatz verfolgt um sich der Problematik anzunähern. Temporale Wachstumskegel wurden für 20 min in Medium inkubiert, das Ephrin-A5/Fc und Pervanadat enthielt. Diese Behandlung führt zu einem Kollaps der Wachstumskegel (Abb 3.21 und Abb. 3.26). Anschließend wurde das Medium gewechselt und neues Medium mit Pervanadat, jedoch ohne Ephrin-A5/Fc für zwei Stunden zugegeben. Je nach Verhalten der Wachstumskegel bestehen zwei Interpretationsansätze:

### 1. Möglichkeit:

Die Axone nehmen in Gegenwart von Pervanadat das Wachstum wieder auf und zeigen nach zwei Stunden einen intakten Phänotyp. Da das Ephrin-A5/Fc-haltige Medium nach dem Kollaps entfernt wurde, ist keine Adaptation an das Ephrin-Signal erforderlich. Trotz Anwesenheit des Inhibitors kann daher eine Wiederaufnahme des Wachstums stattfinden. Dieses Ergebnis würde darauf hindeuten, dass Pervanadat vorwiegend den Adaptationsmechanismus beeinflusst. Es ist in diesem Fall zu erwarten, dass die Wiederaufnahme des Wachstums sogar schneller verläuft.

### 2. Möglichkeit:

Die Wachstumskegel verbleiben in Gegenwart von Pervanadat in einem kollabierten Zustand. Das würde bedeuten, dass der Inhibitor im Wesentlichen die Signaltermination beeinflusst, da die Rezeptoren nach dem initialen Ephrin-Signal im aktiven Zustand eingefroren werden.

Abb. 3.26 zeigt, dass temporale Wachstumskegel in Gegenwart von Pervanadat das Wachstum wieder aufnehmen. Allerdings nicht im gleichen Maße wie unter Kontrollbedingungen. Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben: Zum Einen ist wahrscheinlich, dass Pervanadat die Signaltermination der Rezeptoren beeinflusst. Die verringerte Wiederaufnahme des Wachstums geht in diesem Fall möglicherweise mit einem Austausch von Membranfragmenten und Proteinen im Wachstumskegel einher. Die im aktiven Zustand eingefrorenen Rezeptoren werden für eine Wiederaufnahme des Wachstums nicht benötigt. Stattdessen entsteht gewissermaßen ein neuer Rezeptorbesatz durch Recycling von Komponenten aus intrazellulären Speichern oder durch Proteinsynthese. Da die Regeneration in diesem Experiment nicht in Gegenwart von Ephrin-A5/Fc stattfindet und der Wachstumskegel somit nicht desensitiviert, widerspricht diese Hypothese den Ergebnissen aus Abschnitt 3.7 nicht, die zeigen, dass die lokale Proteinsynthese im Wachstumskegel für die Desensitivierung nicht erforderlich ist.

Unter dieser Annahme muss jedoch die Frage beantwortet werden, warum der höhere Anteil an kollabierten Wachstumskegeln gegenüber dem eingefrorenen Signal nicht desensitiviert, wie es in Anwesenheit von EphrinA5/Fc der Fall ist. Dies könnte daran liegen, dass das Signal aufgrund einer Pervanadat-vermittelten Sensitivierung der Rezeptoren verstärkt ist. Dies ist ein charakteristisches Phänomen von Rezeptortyrosin-Kinasen bei inhibierten Signaltermination (Elchebly *et al.*, 1999; Schlessinger, 2000). Gegen dieses Argument spricht jedoch, dass die Anwesenheit von Pervanadat zu keiner Erhöhung der initialen Kollapsrate bei retinalen Wachstumskegeln führt (Abb. 3-21).

Ein weiterer Interpretationsansatz besteht darin, dass die Fähigkeit zur Desensitivierung durch Pervanadat blockiert ist. Dies wird auch durch folgende Überlegung gestützt: Da neuronale

Wachstumskegel sensibel auf Veränderungen der Kulturbedingungen reagieren, werden bei Medienwechseln grundsätzlich geringe Mengen des alten Mediums zurückgelassen um einen schonenden Übergang zu gewährleisten; d.h. es befanden sich während der Wiederaufnahme des Wachstums zusätzlich zum Inhibitor evtl. geringe Mengen an Ephrin-A5/Fc im Medium, die die Aufrechterhaltung des Adaptationsmechanismus erforderten. Unterdrückt Pervanadat allerdings die Adaptation an das Ephrin-Signal, wäre eine unvollständige Regeneration der Wachstumskegel verständlich. Diese Möglichkeit deutet darauf hin, dass Pervanadat auch einen Einfluss auf den Adaptationsmechanismus ausübt.

Zusammenfassend können die mit Pervanadat erzielten Ergebnisse folgendermaßen bewertet werden:

Die Ergebnisse sind konsistent mit der Vorstellung, dass die Modulation der intrazellulären Ephrin-A5-Signalkaskade an der Adaptation gegenüber dem Lenkungssignal beteiligt ist. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die durch Pervanadat hervorgerufenen Effekte zumindest teilweise von einem Einfluss auf die primäre Signaltransduktion herrühren. Es lässt sich nicht vollständig aufklären, inwieweit der Inhibitor den adaptiven Mechanismus beeinflusst und inwieweit er sich auf die Signaltermination auswirkt. Die teilweise Wiederaufnahme des Axonwachstums im zuletzt vorgestellten Experiment lässt ein Zusammenwirken mehrerer Faktoren vermuten. Die Modulation des Ephrin-Signals ist dabei ein wichtiger Bestandteil der Adaptation. Unter Umständen sind weitere Mechanismen, wie beispielsweise die Rezeptor-Endocytose, beteiligt, die in dieser Arbeit nicht erfasst werden konnten.



## 5 AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der Adaptation von Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen gegenüber dem axonalen Lenkungssignal Ephrin-A5 untersucht. Die erzielten Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Modulation der Ephrin-A5-Signalkaskade eine entscheidende Rolle bei der Desensitivierung gegenüber diesem Lenkungssignal spielt. Um die Ergebnisse zu festigen und um den Einfluss der Adaptation beim Aufbau der retinotektalen Projektion besser einordnen zu können, sollten, anknüpfend an diese Arbeit, weitere Experimente durchgeführt werden. Dieses Kapitel gibt einen Überblick über fünf Themen, die im Rahmen dieses Projekts weiter bearbeitet werden sollten, um das Verständnis der Adaptation im retinotektalen System zu vertiefen.

### **1.) Inwieweit beeinflusst Pervanadat den adaptiven Mechanismus gegenüber Ephrin-A5 und inwieweit die primäre Signaltransduktion im Wachstumskegel?**

Die Inhibition von Protein-Tyrosin-Phosphatasen durch Pervanadat führt zu Effekten, die durch eine blockierte Fähigkeit zur Desensitivierung erklärt werden können. Allerdings lassen die erzielten Ergebnisse nicht notwendigerweise auf einen Adaptationsmechanismus schließen. Möglicherweise beeinflusst Pervanadat nicht die adaptive Modulation des repulsiven Ephrin-A5-Signals, sondern hauptsächlich die Signaltermination der Eph-Rezeptoren. Es müssen demzufolge Anstrengungen unternommen werden, um zwischen diesen beiden Mechanismen zu unterscheiden. Eine solche Unterscheidung ist jedoch schwer, da Pervanadat erstens unspezifisch auf viele Phosphatasen wirkt und zweitens nicht klar ist, ob beide Mechanismen gar identisch sind. Möglicherweise sind an der Adaptation gegenüber Ephrin-A5 dieselben Phosphatasen und Phosphorylierungsstellen beteiligt, die auch bei der Signaltermination eine Rolle spielen. Das folgende Experiment könnte helfen, sich diesem Problem weiter anzunähern:

Ein charakteristisches Phänomen bei inhibierter Signaltermination ist die Erhöhung der Sensitivität gegenüber dem betreffenden Signal (Elchebly *et al.*, 1999; Schlessinger, 2000). Zunächst müsste eine Ephrin-A5/Fc-Konzentration bestimmt werden, die in Anwesenheit von Pervanadat einen Kollaps bei temporalen Wachstumskegeln, jedoch nicht bei nasalen Wachstumskegeln, auslöst. Da Pervanadat, wie in Abschnitt 4.4.3 diskutiert, wahrscheinlich

einen Einfluss auf die Signaltermination der Rezeptoren ausübt, wird diese Konzentration vermutlich niedriger sein, als die ohne Pervanadat bestimmte Konzentration von 0,25 µg/ml (Abb. 3-1). Mit der ermittelten Ephrin-A5/Fc-Konzentration wird das in Abschnitt 3.8.4 vorgestellte Experiment durchgeführt. Beeinflusst Pervanadat die Signaltermination vorwiegend, so wird das Ephrin-Signal u.U. auf einen effektiven Wert verstärkt, der mit der ohne Pervanadat bestimmten Konzentration von 0,25 µg/ml vergleichbar ist. Das hätte zur Folge, dass die Wiederaufnahme des Wachstums in Gegenwart von Pervanadat ähnlich verlaufen müsste, wie in Anwesenheit von 0,25 µg/ml geclusterter Ephrin-A5-Lösung. Beeinflusst Pervanadat hingegen vorwiegend den Adaptationsmechanismus, so wäre eine langsamere Wiederaufnahme des Wachstums, gemäß der in Abschnitt 4.3.3 vorgestellten Erklärung zu erwarten.

## **2.) Was passiert in der Phase der Resensitivierung?**

An der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 ist möglicherweise eine Dephosphorylierung von Signalmolekülen beteiligt. Das könnte bedeuten, dass die dafür notwendigen Phosphatasen während der Resensitivierung inaktiviert werden. Nach diesem Modell würde eine Blockade der Phosphatase-Inaktivierung die Resensitivierung verhindern und damit eine veränderte Reaktion auf gestempelte Adaptationssubstrate bei temporalen Wachstumskegeln auslösen. Mit Hilfe von Zeitraffer-Aufnahmen ist es möglich, dem Kulturmedium während des Axonwachstums in den Lücken bestimmte Substanzen zuzugeben (von Philipsborn, 2007). Führt diese Zugabe zu einer Phosphatase-Aktivierung oder verhindert sie deren Inaktivierung, so sollten temporale Axone nicht mehr auf eine Ephrin-Front nach der 200 µm breiten Lücke reagieren. Im nativen Zustand resensitivieren die Axone in diesen Lücken und bilden eine Stoppfront an der Oberkante der Lücke aus. Meng *et al.*, 2002 konnten zeigen, dass Protein-Tyrosin-Phosphatasen *in vivo* durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert, und dadurch inaktiviert werden. Die Oxidation erfolgt möglicherweise durch eine Hydroxylierung von Cystein-Resten (Claiborne *et al.*, 1999). Es müssten demzufolge Substanzen gefunden werden, die eine solche Oxidation verhindern. Temporale Retina-Explantate werden auf Adaptationssubstraten ausgelegt und die Substanzen während des Wachstums in einer 200 µm breiten Lücke zugegeben. Ausgewertet wird die Reaktion an der Oberkante der Lücke.

## **3.) Welche Signalmoleküle werden während der Desensitivierung gegebenenfalls dephosphoryliert?**

Die Phosphatase PTPRO ist ein interessanter Kandidat zur Regulation der Sensitivität gegenüber Ephrin-A5. PTPRO wird während der Embryonalentwicklung in retinalen Ganglienzellen exprimiert und sollte in den Stadien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, in

den Wachstumskegeln vorhanden sein (Ledig *et al.*, 1999). Shintani *et al.*, 2006 konnten zeigen, dass diese Phosphatase in der Lage ist, EphA3-Rezeptoren zu dephosphorylieren und damit deren Aktivität zu verringern.

In einer Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob während der Desensitivierung gegenüber Ephrin-A5 Veränderungen am Phosphorylierungszustand des EphA3-Rezeptors auftreten. Diese Fragestellung ist mittels biochemischer Verfahren adressierbar. Eph-Rezeptoren können isoliert und der Phosphorylierungsgrad mittels Immunoblots bestimmt werden (Connor *et al.*, 1998; Seiradake *et al.*, 2010). Dazu werden die Blot-Membranen mit Antikörpern gegen den Eph-Rezeptor und gegen phosphorylierte Tyrosin-Reste behandelt. Der Vergleich von unbeeinflussten und desensitvierten Wachstumskegeln könnte einen Aufschluss über Veränderungen am Phosphorylierungsmuster geben. Um dieses Experiment durchführen zu können, bedarf es einer sensitiven Nachweismethode. Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren kann der EphA3-Rezeptor bislang nicht nachgewiesen werden. Entweder müssen größere Proteinmengen aus retinalen Wachstumskegeln isoliert, oder die Sensitivität des Immunoblot-Nachweises erhöht werden. Ersteres könnte durch Vereinigung mehrerer Zelllysate erreicht werden. In dieser Arbeit wurden Lysate aus 120 Explantatkulturen, d.h. 240 Explantatstreifen, verwendet. Diese reichen für einen EphA3-Nachweis offensichtlich noch nicht aus. Letzteres könnte durch eine Variation von Pufferkomponenten oder eine sensitivere Chemolumineszenzdetektion durch neue Reagenzien möglich sein.

#### **4.) Genetische Manipulation retinaler Ganglienzellen**

Die genetische Manipulation retinaler Ganglienzellen würde sowohl die Aufklärung der molekularen Adaptationsmechanismen, als auch die Aufklärung von generellen Mechanismen bei der Gradientendetektion erleichtern. Durch die Überexpression von Fluorophor-markierten Ephrinen und Eph-Rezeptoren oder durch einen RNAi-vermittelten Knock-Down könnte der Einfluss dieser Komponenten bei der Detektion eines Ephrin-Gradienten oder beim Wachstum auf Adaptationssubstraten beobachtet werden. Von Masaharu Noda wurde uns ein dominant-negatives Konstrukt der PTPRO zur Verfügung gestellt, das bereits erfolgreich in retinalen Ganglienzellen des Hühnchens exprimiert wurde (Shintani *et al.*, 2006). Dieses Konstrukt kann durch *in ovo*-Elektroporation in RGCs eingebracht werden. Wird das Verhalten von Wachstumskegeln transfizierter Zellen auf Adaptationssubstraten untersucht, so kann gezielt festgestellt werden, ob die PTPRO einen Einfluss auf die De- oder Resensitivierung der Wachstumskegel ausübt.

### 5.) Adaptieren retinale Wachstumskegel auch gegenüber dem *reverse signaling*?

*In vitro* und *in vivo*-Untersuchungen zeigen, dass das Ephrin-A vermittelte *reverse signaling* repulsiv auf Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen wirkt (Rashid *et al.*, 2005; Gebhardt *et al.*, 2012). Möglicherweise werden nasale Axone, die hohe Ephrin-A-Konzentrationen exprimieren, durch die repulsive Interaktion mit tektalen EphA-Rezeptoren ins posteriore Tektum gelenkt (Rashid *et al.*, 2005). Es ist durchaus möglich, dass auch eine Adaptation gegenüber den EphA-Rezeptoren (*reverse signaling*) auftritt, die für den Aufbau der topografischen Projektion von Bedeutung ist. Daher sollte die Frage beantwortet werden, ob die Phänomene der De- und Resensitivierung gegenüber den Eph-Rezeptoren beobachtet werden. Ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Computermodell sagt eine solche Adaptation voraus (Friebel, 2010; Fiederling, 2012). Eine experimentelle *in vitro*-Analyse des Wachstums auf Adaptationssubstraten war allerdings lange Zeit nicht möglich. Das untersuchte Protein (EphA3) verliert während des Stempelvorgangs seine Aktivität und konnte bislang nicht funktionell auf einer Oberfläche verankert werden. Im Rahmen einer Masterarbeit wurde der EphA3-Rezeptor in einem abgewandelten Verfahren und in Mustern, die den Adaptationssubstraten ähneln, aktiv auf epoxy-silanisierte Deckgläser aufgebracht. Erste Daten zeigen, dass Wachstumskegel retinaler Axone gegenüber dem *reverse signaling* in gleicher Weise adaptieren, wie gegenüber dem *forward signaling* (Fiederling, 2012). In weiteren Versuchen sollte getestet werden, ob sich diese Ergebnisse bestätigen lassen. Darüberhinaus ist die Frage nach dem molekularen Mechanismus interessant, der der Adaptation gegenüber dem *reverse signaling* zugrunde liegt. Gibt es Parallelen zur Adaptation gegenüber dem *forward signaling*? Mithilfe pharmakologischer Inhibitoren oder genetischer Manipulation der RGCs könnte diese Frage beantwortet werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Adamson, R. H., Sarai, R. K., Altangerel, A., Thirkill, T. L., Clark, J. F. & Curry, F. R. E. (2010).** Sphingosine-1-phosphate modulation of basal permeability and acute inflammatory responses in rat venular microvessels. *Cardiovasc Res* **88**, 344-351.

**Alon, U., Surette, M. G., Barkai, N. & Leibler, S. (1999).** Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature* **397**, 168-171.

**Alsina, B., Vu, T. & Cohen-Cory, S. (2001).** Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nature Neuroscience* **4**, 1093-1101.

**Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B. & Imhof, B. A. (1998).** Actin dynamics in living mammalian cells. *Journal of Cell Science* **111**, 1649-1658.

**Bashaw, G. J. & Klein, R. (2010).** Signaling from Axon Guidance Receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**.

**Bassell, G. J., Zhang, H. L., Byrd, A. L., Femino, A. M., Singer, R. H., Taneja, K. L., Lifshitz, L. M., Herman, I. M. & Kosik, K. S. (1998).** Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *Journal of Neuroscience* **18**, 251-265.

**Borst, A., Flanagan, V. L. & Sompolinsky, H. (2005).** Adaptation without parameter change: Dynamic gain control in motion detection. *P Natl Acad Sci USA* **102**, 6172-6176.

**Bouzigues, C., Morel, M., Triller, A. & Dahan, M. (2007).** Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *P Natl Acad Sci USA* **104**, 11251-11256.

**Brown, A., Yates, P. A., Burrola, P., Ortuno, D., Vaidya, A., Jessell, T. M., Pfaff, S. L., O'Leary, D. D. & Lemke, G. (2000).** Topographic mapping from the retina to the midbrain is controlled by relative but not absolute levels of EphA receptor signaling. *Cell* **102**, 77-88.

**Brunet, I., Weinl, C., Piper, M., Trembleau, A., Volovitch, M., Harris, W., Prochiantz, A. & Holt, C. (2005).** The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* **438**, 94-98.

**Burnette, D. T., Ji, L., Schaefer, A. W., Medeiros, N. A., Danuser, G. & Forscher, P. (2008).** Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Developmental Cell* **15**, 163-169.

**Campbell, D. S. & Holt, C. E. (2001).** Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* **32**, 1013-1026.

**Carvalho, R. F., Beutler, M., Marler, K. J. M., Knoll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T. & Drescher, U. (2006).** Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nature Neuroscience* **9**, 322-330.

**Castan, I., Wijkander, J., Manganiello, V. & Degerman, E. (1999).** Mechanisms of inhibition of lipolysis by insulin, vanadate and peroxovanadate in rat adipocytes. *Biochem J* **339**, 281-289.

- Cheng, H. J., Nakamoto, M., Bergemann, A. D. & Flanagan, J. G. (1995).** Complementary Gradients in Expression and Binding of Elf-1 and Mek4 in Development of the Topographic Retinotectal Projection Map. *Cell* **82**, 371-381.
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J., Charrier, V. & Parsonage, D. (1999).** Protein-sulfenic acids: Diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry* **38**, 15407-15416.
- Cohen-Cory, S. & Fraser, S. E. (1995).** Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature* **378**, 192-196.
- Connor, R. J., Menzel, P. & Pasquale, E. B. (1998).** Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Developmental Biology* **193**, 21-35.
- Cox, E. C., Muller, B. & Bonhoeffer, F. (1990).** Axonal Guidance in the Chick Visual-System - Posterior Tectal Membranes Induce Collapse of Growth Cones from the Temporal Retina. *Neuron* **4**, 31-37.
- Cramer, K. S. (2005).** Eph proteins and the assembly of auditory circuits. *Hearing Res* **206**, 42-51.
- Crino, P. B. & Eberwine, J. (1996).** Molecular characterization of the dendritic growth cone: Regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* **17**, 1173-1187.
- Davis, L., Ping, D., Dewit, M. & Kater, S. B. (1992).** Protein-Synthesis within Neuronal Growth Cones. *Journal of Neuroscience* **12**, 4867-4877.
- Davis, S., Gale, N. W., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M. & Yancopoulos, G. D. (1994).** Ligands for Eph-Related Receptor Tyrosine Kinases That Require Membrane Attachment or Clustering for Activity. *Science* **266**, 816-819.
- Dent, E. W. & Gertler, F. B. (2003).** Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**, 209-227.
- Desnos, C., Huet, S. & Darchen, F. (2007).** 'Should I stay or should I go?': myosin V function in organelle trafficking. *Biol Cell* **99**, 411-423.
- Dickson, B. J. (2002).** Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* **298**, 1959-1964.
- Doherty, G. J. & McMahon, H. T. (2009).** Mechanisms of Endocytosis. *Annual review of biochemistry* **78**, 857-902.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M. & Bonhoeffer, F. (1995).** In-Vitro Guidance of Retinal Ganglion-Cell Axons by Rags, a 25 Kda Tectal Protein Related to Ligands for Eph Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **82**, 359-370.
- Dütting, D., Handwerker, C. & Drescher, U. (1999).** Topographic targeting and pathfinding errors of retinal axons following overexpression of ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Developmental Biology* **216**, 297-311.
- Egea, J., Nissen, U. V., Dufour, A. & other authors (2005).** Regulation of EphA4 kinase activity is required for a subset of axon guidance decisions suggesting a key role for receptor clustering in Eph function. *Neuron* **47**, 515-528.

- Ehrlich, M., Boll, W., van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M. L. & Kirchhausen, T. (2004).** Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* **118**, 591-605.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E. & other authors (1999).** Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544-1548.
- Erskine, L. & Herrera, E. (2007).** The retinal ganglion cell axon's journey: Insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Developmental Biology* **308**, 1-14.
- Fain, G. L., Matthews, H. R., Cornwall, M. C. & Koutalos, Y. (2001).** Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev* **81**, 117-151.
- Fantus, I. G., Kadota, S., Deragon, G., Foster, B. & Posner, B. I. (1989).** Pervanadate [Peroxide(S) of Vanadate] Mimics Insulin Action in Rat Adipocytes Via Activation of the Insulin-Receptor Tyrosine Kinase. *Biochemistry* **28**, 8864-8871.
- Feldheim, D. A., Kim, Y. I., Bergemann, A. D., Frisen, J., Barbacid, M. & Flanagan, J. G. (2000).** Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* **25**, 563-574.
- Feldheim, D. A., Nakamoto, M., Osterfield, M., Gale, N. W., DeChiara, T. M., Rohatgi, R., Yancopoulos, G. D. & Flanagan, J. G. (2004).** Loss-of-function analysis of EphA receptors in retinotectal mapping. *Journal of Neuroscience* **24**, 2542-2550.
- Fidler, I. J. & Kripke, M. L. (1977).** Metastasis Results from Preexisting Variant Cells within a Malignant-Tumor. *Science* **197**, 893-895.
- Fiederling, F. (2012).** Modellierung und experimentelle Untersuchung der Adaptation des *Reverse Signaling* in retinalen Wachstumskegeln. *Masterarbeit am Zoologischen Instiut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, des Karlsruher Institut für Technology (KIT)*.
- Flanagan, J. G. & Vanderhaeghen, P. (1998).** The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annual review of neuroscience* **21**, 309-345.
- Forscher, P. & Smith, S. J. (1988).** Actions of Cytochalasins on the Organization of Actin-Filaments and Microtubules in a Neuronal Growth Cone. *Journal of Cell Biology* **107**, 1505-1516.
- Fournier, A. E., Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R. G. & Strittmatter, S. M. (2000).** Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *Journal of Cell Biology* **149**, 411-421.
- Friebel, A. (2010).** Entwicklung eines Computermodells zur Ausbildung topografischer neuronaler Projektionen durch Chemoaffinität bei Adaptation an das chemische Signal. *Studienarbeit am Zoologischen Instiut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, des Karlsruher Institut für Technology (KIT)*.
- Friedman, G. C. & OLeary, D. D. M. (1996).** Retroviral misexpression of engrailed genes in the chick optic tectum perturbs the topographic targeting of retinal axons. *Journal of Neuroscience* **16**, 5498-5509.
- Frisén, J., Yates, P. A., McLaughlin, T., Friedman, G. C., O'Leary, D. D. M. & Barbacid, M. (1998).** Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* **20**, 235-243.

- Gale, N. W., Holland, S. J., Valenzuela, D. M. & other authors (1996).** Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron* **17**, 9-19.
- Gebhardt, C., Bastmeyer, M. & Weth, F. (2012).** Balancing of ephrin/Eph forward and reverse signaling as the driving force of adaptive topographic mapping. *Development* **139**, 335-345.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P. (1973).** In-Vitro Cultivation of Human Tumors - Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors. *J Natl Cancer I* **51**, 1417-1423.
- Gierer, A. (1981).** Development of Projections between Areas of the Nervous-System. *Biological Cybernetics* **42**, 69-78.
- Goodhill, G. J. & Richards, L. J. (1999).** Retinotectal maps: molecules, models and misplaced data. *Trends in Neurosciences* **22**, 529-534.
- Govardovskii, V. I., Calvert, P. D. & Arshavsky, V. Y. (2000).** Commentary - Photoreceptor light adaptation: Untangling desensitization and sensitization. *J Gen Physiol* **116**, 791-794.
- Grafstein, B. & Forman, D. S. (1980).** Intracellular-Transport in Neurons. *Physiol Rev* **60**, 1167-1283.
- Guan, K. L. & Rao, Y. (2003).** Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 941-956.
- Gustafsson, M. G. L. (2000).** Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc-Oxford* **198**, 82-87.
- Hanover, J. A., Willingham, M. C. & Pastan, I. (1984).** Kinetics of Transit of Transferrin and Epidermal Growth-Factor through Clathrin-Coated Membranes. *Cell* **39**, 283-293.
- Hansen, M. J., Dallal, G. E. & Flanagan, J. G. (2004).** Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron* **42**, 717-730.
- Harris, W. A., Holt, C. E. & Bonhoeffer, F. (1987).** Retinal Axons with and without Their Somata, Growing to and Arborizing in the Tectum of Xenopus Embryos - a Time-Lapse Video Study of Single Fibers Invivo. *Development* **101**, 123-133.
- Hattori, M., Osterfield, M. & Flanagan, J. G. (2000).** Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* **289**, 1360-1365.
- Hemmati-Brivanlou, A., Delatorre, J. R., Holt, C. & Harland, R. M. (1991).** Cephalic Expression and Molecular Characterization of Xenopus En-2. *Development* **111**, 715-724.
- Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M. & other authors (2004).** Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature Neuroscience* **7**, 501-509.
- Himanen, J. P., Saha, N. & Nikolov, D. B. (2007).** Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 534-542.
- Himanen, J. P., Yermekbayeva, L., Janes, P. W. & other authors (2010).** Architecture of Eph receptor clusters. *P Natl Acad Sci USA* **107**, 10860-10865.

- Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M. & O'Leary, D. D. M. (2002).** EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* **35**, 475-487.
- Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J. & Takaku, F. (1987).** A Novel Putative Tyrosine Kinase Receptor Encoded by the Eph Gene. *Science* **238**, 1717-1720.
- Hirokawa, N. (1997).** The mechanisms of fast and slow transport in neurons: identification and characterization of the new kinesin superfamily motors. *Current Opinion in Neurobiology* **7**, 605-614.
- Hirokawa, N., Noda, Y. & Okada, Y. (1998).** Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 60-73.
- Hornberger, M. R., Dütting, D., Ciossek, T. & other authors (1999).** Modulation of EphA receptor function by coexpressed EphrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron* **22**, 731-742.
- Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsapralis, G., Gresser, M. J. & Ramachandran, C. (1997).** Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 843-851.
- Itasaki, N. & Nakamura, H. (1996).** A role for gradient expression in positional specification on the optic tectum. *Neuron* **16**, 55-62.
- Iwamasa, H., Ohta, K., Yamada, T., Ushijima, K., Terasaki, T. & Tanaka, H. (1999).** Expression of Eph receptor tyrosine kinases and their ligands in chick embryonic motor neurons and hindlimb muscles. *Dev Growth Differ* **41**, 685-698.
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A. & other authors (2005).** Adam meets Eph: An ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* **123**, 291-304.
- Jaqaman, K., Kuwata, H., Touret, N., Collins, R., Trimble, W. S., Danuser, G. & Grinstein, S. (2011).** Cytoskeletal Control of Receptor Diffusion in Membrane Promotes CD36 Function and Signaling. *Biophys J* **100**, 21-21.
- Journey, W. M., Gallo, G., Letourneau, P. C. & McLoon, S. C. (2002).** Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2-and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Journal of Neuroscience* **22**, 6019-6028.
- Kaethner, R. J. & Stuermer, C. A. O. (1992).** Dynamics of Terminal Arbor Formation and Target Approach of Retinotectal Axons in Living Zebrafish Embryos - a Time-Lapse Study of Single Axons. *Journal of Neuroscience* **12**, 3257-3271.
- Kalil, K. & Dent, E. W. (2005).** Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Current Opinion in Neurobiology* **15**, 521-526.
- Kandouz, M. (2012).** The Eph/Ephrin family in cancer metastasis: communication at the service of invasion. *Cancer metastasis reviews* **31**, 353-373.
- Kirchhausen, T., Macia, E. & Pelish, H. E. (2008).** Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Method Enzymol* **438**, 77-93.
- Klein, R. (2004).** Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 580-589.

- Koshland, D. E. (1980).** Bacterial Chemotaxis in Relation to Neurobiology. *Annual review of neuroscience* **3**, 43-75.
- Kullander, K. & Klein, R. (2002).** Mechanisms and functions of EPH and ephrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 475-486.
- Lang, S., von Philipsborn, A. C., Bernard, A., Bonhoeffer, F. & Bastmeyer, M. (2008).** Growth cone response to ephrin gradients produced by microfluidic networks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**, 809-816.
- Le Roy, C. & Wrana, J. L. (2005).** Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 112-126.
- Ledig, M. M., McKinnell, L. W., Mrcic-Flogel, T., Wang, J., Alvares, C., Mason, I., Bixby, J. L., Mueller, B. K. & Stoker, A. W. (1999).** Expression of receptor tyrosine phosphatases during development of the retinotectal projection of the chick. *Journal of neurobiology* **39**, 81-96.
- Lim, Y. S., McLaughlin, T., Sung, T. C., Santiago, A., Lee, K. F. & O'Leary, D. D. M. (2008).** p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron* **59**, 746-758.
- Lowery, L. A. & Van Vactor, D. (2009).** The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 332-343.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. & Kirchhausen, T. (2006).** Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental Cell* **10**, 839-850.
- Maillet, M., Robert, S. J., Cacquevel, M., Gastineau, M., Vivien, D., Bertoglio, J., Zugaza, J. L., Fischmeister, R. & Lezoualc'h, F. (2003).** Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPP alpha. *Nature Cell Biology* **5**, 633-U636.
- Mann, F., Miranda, E., Weigl, C., Harmer, E. & Holt, C. E. (2003).** B-type Eph receptors and ephrins induce growth cone collapse through distinct intracellular pathways. *Journal of neurobiology* **57**, 323-336.
- Marler, K. J. M., Becker-Barroso, E., Martinez, A. & other authors (2008).** A TrkB/EphrinA Interaction Controls Retinal Axon Branching and Synaptogenesis. *Journal of Neuroscience* **28**, 12700-12712.
- Marquardt, T., Shirasaki, R., Ghosh, S., Andrews, S. E., Carter, N., Hunter, T. & Pfaff, S. L. (2005).** Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell* **121**, 127-139.
- Marston, D. J., Dickinson, S. & Nobes, C. D. (2003).** Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nature Cell Biology* **5**, 879-888.
- McLaughlin, T., Hindges, R. & O'Leary, D. D. M. (2003).** Regulation of axial patterning of the retina and its topographic mapping in the brain. *Current Opinion in Neurobiology* **13**, 57-69.
- McLaughlin, T. & O'Leary, D. D. M. (2005).** Molecular gradients and development of retinotopic maps. *Annual Review of Neuroscience* **28**, 327-355.
- Meng, T. C., Fukada, T. & Tonks, N. K. (2002).** Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* **9**, 387-399.

- Ming, G. L., Wong, S. T., Henley, J., Yuan, X. B., Song, H. J., Spitzer, N. C. & Poo, M. M. (2002).** Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* **417**, 411-418.
- Mombaerts, P. (2006).** Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Bi* **22**, 713-737.
- Monschau, B., Kremoser, C., Ohta, K. & other authors (1997).** Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *Embo J* **16**, 1258-1267.
- Nakamoto, M., Cheng, H. J., Friedman, G. C., McLaughlin, T., Hansen, M. J., Yoon, C. H., O'Leary, D. D. M. & Flanagan, J. G. (1996).** Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell* **86**, 755-766.
- Nakamura, H. & O'Leary, D. D. M. (1989).** Inaccuracies in Initial Growth and Arborization of Chick Retinotectal Axons Followed by Course Corrections and Axon Remodeling to Develop Topographic Order. *Journal of Neuroscience* **9**, 3776-3795.
- Noren, N. K. & Pasquale, E. B. (2004).** Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins. *Cell Signal* **16**, 655-666.
- Pasquale, E. B. (2005).** EPH receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 462-475.
- Petros, T. J., Bryson, J. B. & Mason, C. (2010).** Ephrin-B2 Elicits Differential Growth Cone Collapse and Axon Retraction in Retinal Ganglion Cells from Distinct Retinal Regions. *Dev Neurobiol* **70**, 781-794.
- Piper, M., Salih, S., Weigl, C., Holt, C. E. & Harris, W. A. (2005).** Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nature Neuroscience* **8**, 179-186.
- Piper, M., Anderson, R., Dwivedy, A., Weigl, C., van Horck, F., Leung, K. M., Cogill, E. & Holt, C. (2006).** Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. *Neuron* **49**, 215-228.
- Poliakov, A., Cotrina, M. & Wilkinson, D. G. (2004).** Diverse roles of Eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Developmental Cell* **7**, 465-480.
- Puthenveedu, M. A., Lauffer, B., Temkin, P. & other authors (2010).** Sequence-Dependent Sorting of Recycling Proteins by Actin-Stabilized Endosomal Microdomains. *Cell* **143**, 761-773.
- Raper, J. A. & Kapfhammer, J. P. (1990).** The Enrichment of a Neuronal Growth Cone Collapsing Activity from Embryonic Chick Brain. *Neuron* **4**, 21-29.
- Rashid, T., Upton, A. L., Blentic, A., Ciossek, T., Knoll, B., Thompson, I. D. & Drescher, U. (2005).** Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron* **47**, 57-69.
- Ray, E. & Samanta, A. K. (1996).** Dansyl cadaverine regulates ligand induced endocytosis of interleukin-8 receptor in human polymorphonuclear neutrophils. *Febs Lett* **378**, 235-239.
- Reber, M., Burrola, P. & Lemke, G. (2004).** A relative signalling model for the formation of a topographic neural map. *Nature* **431**, 847-853.

- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. & Horwitz, A. R. (2003).** Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709.
- Rohani, N., Canty, L., Luu, O., Fagotto, F. & Winklbauer, R. (2011).** EphrinB/EphB Signaling Controls Embryonic Germ Layer Separation by Contact-Induced Cell Detachment. *Plos Biol* **9**.
- Rosentreter, S. M., Davenport, R. W., Loschinger, J., Huf, J., Jung, J. G. & Bonhoeffer, F. (1998).** Response of retinal ganglion cell axons to striped linear gradients of repellent guidance molecules. *Journal of Neurobiology* **37**, 541-562.
- Sahin, M., Greer, P. L., Lin, M. Z. & other authors (2005).** Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse. *Neuron* **46**, 191-204.
- Sansom, S. N. & Livesey, F. J. (2009).** Gradients in the Brain: The Control of the Development of Form and Function in the Cerebral Cortex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**.
- Schaefer, A. W., Schoonderwoert, V. T. G., Ji, L., Mederios, N., Danuser, G. & Forscher, P. (2008).** Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth. *Developmental Cell* **15**, 146-162.
- Schlessinger, J. (2000).** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225.
- Schmitt, A. M., Shi, J., Wolf, A. M., Lu, C. C., King, L. A. & Zou, Y. M. (2006).** Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* **439**, 31-37.
- Schütze, S., Machleidt, T., Adam, D., Schwandner, R., Wiegmann, K., Kruse, M. L., Heinrich, M., Wickel, M. & Kronke, M. (1999).** Inhibition of receptor internalization by monodansylcadaverine selectively blocks p55 tumor necrosis factor receptor death domain signaling. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10203-10212.
- Seiradake, E., Harlos, K., Sutton, G., Aricescu, A. R. & Jones, E. Y. (2010).** An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signaling platform assembly. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 398-U327.
- Shigetani, Y., Funahashi, J. & Nakamura, H. (1997).** En-2 regulates the expression of the ligands for Eph type tyrosine kinases in chick embryonic tectum. *Neurosci Res* **27**, 211-217.
- Shintani, T., Ihara, M., Sakuta, H., Takahashi, H., Watakabe, I. & Noda, M. (2006).** Eph receptors are negatively controlled by protein tyrosine phosphatase receptor type O. *Neurosci Res* **55**, S183-S183.
- Simon, D. K. & O'Leary, D. D. M. (1992).** Development of Topographic Order in the Mammalian Retinocollicular Projection. *Journal of Neuroscience* **12**, 1212-1232.
- Sperry, R. W. (1963).** Chemoaffinity in Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *P Natl Acad Sci USA* **50**, 703-&.
- Stubbs, J., Palmer, A., Vidovic, M. & Marotte, L. R. (2000).** Graded expression of EphA3 in the retina and ephrin-A2 in the superior colliculus during initial development of coarse topography in the wallaby retinocollicular projection. *Eur J Neurosci* **12**, 3626-3636.
- Takei, K., Yoshida, Y. & Yamada, H. (2005).** Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *J Biochem* **137**, 243-247.

- Tennyson, V. M., Sun, S., Barrett, R. E. & Cote, L. (1970).** Fine Structure of Developing Caudate Nucleus of Rabbit Correlated with Histofluorescence and Biochemical Levels of Dopamine. *Journal of Cell Biology* **47**, A211-&.
- Tessier-Lavigne, M. & Goodman, C. S. (1996).** The molecular biology of axon guidance. *Science* **274**, 1123-1133.
- Thanos, S. & Mey, J. (2001).** Development of the visual system of the chick II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res Rev* **35**, 205-245.
- Vielmetter, J., Stolze, B., Bonhoeffer, F. & Stuermer, C. A. O. (1990).** Invitro Assay to Test Differential Substrate Affinities of Growing Axons and Migratory Cells. *Exp Brain Res* **81**, 283-287.
- von Philipsborn, A. C., Lang, S., Bernard, A., Loeschinger, J., David, C., Lehnert, D., Bastmeyer, M. & Bonhoeffer, F. (2006a).** Microcontact printing of axon guidance molecules for generation of graded patterns. *Nat Protoc* **1**, 1322-1328.
- von Philipsborn, A. C., Lang, S., Loeschinger, J., Bernard, A., David, C., Lehnert, D., Bonhoeffer, F. & Bastmeyer, M. (2006b).** Growth cone navigation in substrate-bound ephrin gradients. *Development* **133**, 2487-2495.
- von Philipsborn, A. C. (2007).** Axon Guidance in Substrate-Bound Protein Gradients. *Dissertation am Zoologischen Instiut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, der Universität Karlsruhe (TH)*
- Wahl, S., Barth, H., Ciossek, T., Aktories, K. & Mueller, B. K. (2000).** Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *Journal of Cell Biology* **149**, 263-270.
- Walter, J., Kernveits, B., Huf, J., Stolze, B. & Bonhoeffer, F. (1987).** Recognition of Position-Specific Properties of Tectal Cell-Membranes by Retinal Axons Invitro. *Development* **101**, 685-696.
- Wang, Z. P., Edwards, J. G., Riley, N. & other authors (2008).** Myosin Vb Mobilizes Recycling Endosomes and AMPA Receptors for Postsynaptic Plasticity. *Cell* **135**, 535-548.
- Weinl, C., Drescher, U., Lang, S., Bonhoeffer, F. & Loschinger, J. (2003).** On the turning of Xenopus retinal axons induced by ephrin-A5. *Development* **130**, 1635-1643.
- Wimmer-Kleikamp, S. H., Janes, P. W., Squire, A., Bastiaens, P. I. H. & Lackmann, M. (2004).** Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *Journal of Cell Biology* **164**, 661-666.
- Wizenmann, A., Brunet, I., Lam, J. S. Y. & other authors (2009).** Extracellular Engrailed Participates in the Topographic Guidance of Retinal Axons In Vivo. *Neuron* **64**, 355-366.
- Wurst, W., Auerbach, A. B. & Joyner, A. L. (1994).** Multiple Developmental Defects in Engrailed-1 Mutant Mice - an Early Mid-Hindbrain Deletion and Patterning Defects in Forelimbs and Sternum. *Development* **120**, 2065-2075.
- Yamaguchi, Y. & Pasquale, E. B. (2004).** Eph receptors in the adult brain. *Current Opinion in Neurobiology* **14**, 288-296.
- Yates, P. A., Roskies, A. L., McLaughlin, T. & O'Leary, D. D. M. (2001).** Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *Journal of Neuroscience* **21**, 8548-8563.

**Yin, Y., Yamashita, Y., Noda, H., Okafuji, T., Go, M. J. & Tanaka, H. (2004).** EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis. *Neurosci Res* **48**, 285-296.

**Zhang, J. & Hughes, S. E. (2006).** Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol* **208**, 453-461.

**Zhou, F. Q. & Cohan, C. S. (2004).** How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. *Journal of neurobiology* **58**, 84-91.

**Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. & Klein, R. (2003).** EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nature Cell Biology* **5**, 869-878.



# ANHANG

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A594</b>	Humane Alveolarepithel-Zelllinie	<b>MEF</b>	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
<b>ADAM10</b>	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain 10</i>	<b>MDC</b>	Monodansylcadaverin
<b>AIM</b>	Anisomycin	<b>mkl</b>	monoklonal
<b>B16</b>	Maus Melanom-Zelllinie	<b>μCP</b>	<i>Microcontact Printing</i>
<b>BDNF</b>	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>	<b>MZ</b>	Methylzellulose
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>	<b>n.s.</b>	nicht significant
<b>CS</b>	<i>Chicken serum</i>	<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>DAPI</b>	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	<b>PDMS</b>	Polydimethylsiloxan
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser	<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>Pervanadat</b>	Peroxovanadat
<b>F12</b>	Zellkultur-Medium für RGCs	<b>pkl</b>	polyklonal
<b>F-Aktin</b>	Filamentöses Aktin	<b>PTPRO</b>	<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type O</i>
<b>Fc</b>	<i>Fragment constant</i>	<b>RGC</b>	Retinale Ganglienzellen
<b>FCS</b>	<i>Fetal calf serum</i>	<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>GA</b>	Glutaraldehyd	<b>Tuj</b>	Neuronen-spezifisches β3-Tubulin
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase		
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol		
<b>HH</b>	Hamburger-Hamilton		
<b>IgG</b>	Immunglobulin G		
<b>IR</b>	Immunreaktivität		



## Veröffentlichungen

### Wissenschaftliche Artikel und Manuskripte

Elena Seiradake, Anne C. von Philipsborn, Maud Henry, **Martin Fritz**, Hugues Lortat-Jacob, Marc Jamin, Wieger Hemrika, Martin Bastmeyer, Stephen Cusack & Andrew A. McCarthy, 2009. Structure and functional relevance of the Slit2 homodimerization domain. *Embo Rep.* **10**(7): 736-741.

**Martin Fritz** and Martin Bastmeyer, 2012. Microcontact Printing of Substrate-Bound Protein Patterns for Cell- and Tissue Culture. *Methods in Molecular Biology*. (in Bearbeitung).

### Posterpräsentationen

**Martin Fritz**, Anne C. von Philipsborn, Roberto Lattanzio, Franco Weth and Martin Bastmeyer. Adaptation in Retinal Axon Guidance on Substrate-Bound Ephrin Patterns. Meeting on Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity. Cold Spring Harbor, New York. 10.-14. September 2008.

**Martin Fritz**, Anne C. von Philipsborn, Franco Weth and Martin Bastmeyer. Adaptation and Resensitization of Retinal Growth Cones on Substrate-Bound Ephrin Patterns. Meeting on Axon Guidance, Synaptic Plasticity & Regeneration. Cold Spring Harbor, New York. 21.-25. September 2010.

Markus Weschenfelder, Adrian Friebel, Christoph Gebhardt, Felix Fiederling, **Martin Fritz**, Martin Bastmeyer and Franco Weth. Reconstitution of Topographic Guidance in the Presence of Growth Cone Adaptation. Meeting on Axon Guidance, Synaptic Plasticity & Regeneration. Cold Spring Harbor, New York. 21.-25. September 2010.

Franco Weth, **Martin Fritz**, Felix Fiederling, Nicolas Lutz and Martin Bastmeyer. Adaptation to Chemoaffinity Cues in Topographic Axon Guidance. Meeting on Axon Guidance, Synapse Formation & Regeneration. Cold Spring Harbor, New York. 18.-22. September 2012.



