

Expression rekombinanter Sensoren zur Visualisierung der  
Oberflächendynamik des Eph/ephrin-Systems in retinalen  
Wachstumskegeln des Huhns

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

Markus Weschenfelder

aus

Karlsruhe



Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 18 Juli 2014



## **Danksagung**

Vielen Dank an alle, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht und mich bei deren Anfertigung unterstützt haben.

Zunächst möchte ich meinem Referenten und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer dafür danken, dass er mir die Möglichkeit zu Promotion am Zoologischen Institut ermöglicht und mich bei ihrer Ausarbeitung unterstützt hat. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Nick für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Franco Weth für die intensive und engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für Begleitung und Förderung meiner gesamten bisherigen wissenschaftlichen Laufbahn.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Zoologie für die wirklich schöne Zeit am Zoologischen Institut bedanken. Mein besonderer Dank gilt außerdem Stephanie Frank für das Anlegen der Primärzellkultur und Michael Bachmann für die Unterstützung bei der Anfertigung der SIM-Aufnahmen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Joel Levine, Prof. Dr. Esther Stöckli, Prof. Dr. Uwe Drescher sowie den Mitarbeitern der Werkstatt des ITIV am KIT für die Bereitstellung einiger Materialien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Mein herzlicher Dank geht an meine Freundin Mona, meine Familie und Freunde, die mich immer unterstützt und alle meine Launen ertragen haben. Ich liebe euch!



## **Erklärung**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2009 bis März 2014 am Zoologischen Institut in der 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.

**Markus Weschenfelder, Karlsruhe, den 02.06.14**



# I. Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	V
Erklärung .....	VII
I. Inhaltsverzeichnis.....	IX
Abbildungen und Tabellen.....	XI
II. Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
III. Zusammenfassung .....	XV
1. Einleitung .....	1
1.1 Das Huhn als entwicklungsbiologisches Modellsystem .....	1
1.2 Die retinotektale Projektion des Huhns als Modellsystem der axonalen Lenkung .....	1
1.2.1 Eph/ephrin-Signaltransduktion: Axon-Tektum und Axon-Axon Interaktionen .....	3
1.2.2 Adaptation und Topographie .....	4
1.2.3 Besonderheiten der Eph-ephrin-Signaltransduktion .....	5
1.2.4 ephrin-A: <i>Reverse</i> Signaltransduktion und <i>cis</i> -Interaktion.....	6
1.2.5 Eph/ephrin-Interaktion, Clustern und Signaltransduktion .....	8
1.2.6 Eph/ephrin-Signaltransduktion und Endozytose.....	10
1.3 Das Huhn als genetisches Modellsystem .....	13
1.3.1 Das RCAS System.....	13
1.3.2 Elektroporation .....	15
1.4 Zusammenfassung und Zielsetzung .....	18
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Puffer und Medien .....	19
2.2 Plasmide .....	20
2.3 Zellkultur, Gewebekultur und Präparation.....	23
2.3.1 Zellkultur .....	23
2.3.2 Präparation und Kultur primärer Hühnerfibroblasten.....	23
2.3.3 Präparation embryonaler Hühnerretina.....	24
2.4 Lipofektion und Elektroporation.....	25
2.4.1 Lipofektion von humanen Cervixkarzinomzellen der HeLa-Linie.....	25
2.4.2 Elektroporation primärer Hühnerfibroblasten.....	25
2.4.3 <i>In ovo</i> Elektroporation embryonaler Retina des Huhns .....	26
2.4.4 <i>Ex ovo</i> Elektroporation embryonaler Retina des Huhns .....	26
2.5 Beschichtung der Deckgläser .....	27
2.5.1 Reinigung und PLL-Beschichtung.....	27

2.5.2 Homogene Protein-Beschichtung.....	28
2.6 Streifenassay.....	28
2.7 Zellfärbungen und Immunhistochemie.....	29
2.7.1 SNAP-Färbungen.....	29
2.7.2 Färbungen des Zytoskeletts.....	30
2.7.3 Affinitäts-Sonden.....	31
2.8 EphA3-Aggregationsassay.....	31
2.9 PI-PLC Behandlung.....	31
2.10 Mikroskopie und Bildauswertung.....	32
3. Ergebnisse.....	34
3.1 Test der <i>ex ovo</i> Elektroporation: Koexpression der Par-Komplex-Komponenten Par6c und PKC $\zeta$ im retinalen System.....	34
3.1.1 Die atypische Protein Kinase C zeta wird für die Vermittlung der repulsiven Wirkung des Proteoglycans NG2 auf Axone retinaler Ganglienzellen benötigt.....	35
3.1.2 Die Kolokalisation der koexprimierten Par-Komplex-Komponenten Par6c und PKC $\zeta$ mit dem Tubulinzytoskelett kann durch NG2 beeinflusst werden.....	37
3.2 Optimierung der Elektroporationsmethode für retinale Ganglienzellen.....	39
3.2.1 <i>In ovo</i> Elektroporation embryonaler Hühnerretina.....	40
3.2.2 <i>Ex ovo</i> Elektroporation embryonaler Hühnerretina.....	42
3.2.3 Transfizierte Axone in Explantatkulturen elektroporierter Retinae sind morphologisch intakt.....	46
3.3 Erfolgreiche Herstellung und Expression der rekombinanten Fusionsproteine SNAP-EphA3 und SNAP-ephrin-A5.....	47
3.3.1 SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 kolokalisieren mit den etablierten rekombinanten Proteinen EphA3-FLAG und GPI-GFP.....	48
3.3.2 An Benzylguanyl und Benzylchloropyrimidin gekoppelte Fluorophore färben unterschiedliche Subpopulationen des gleichen SNAP-Proteins.....	49
3.3.3 SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 sind in primären Hühnerfibroblasten ähnlich lokalisiert.....	52
3.3.4 SNAP-ephrin-A5 wird korrekt in der Membran verankert und bindet die extrazelluläre Domäne seines Rezeptors EphA3.....	54
3.3.5 Lösliches ephrin-A5-Fc induziert Aggregation von SNAP-EphA3.....	56
3.4 Untersuchungen der Proteindynamik membranständiger SNAP-ephrin-A5 Moleküle in Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen in Abhängigkeit des Substrats.....	59
3.4.1 Expression von SNAP-ephrin-A5 in retinalen Ganglienzellen.....	59
3.4.2 Färbung von oberflächenständigem SNAP-ephrin-A5.....	60
3.4.3 Das axonale Lenkungsmolekül ephrin-A5 wird auf Oberflächen retinaler Wachstumskegel durch exogenes, substratgebundenes EphA3 und ephrin-A5, stark reduziert.....	62

3.4.4 Im EphA3-Streifenassay akkumuliert SNAP-ephrin-A5 in der C-Zone des Wachstumskegels .....	65
3.4.5 SNAP-ephrin-A5 kolokalisiert mit Rab4.....	66
4. Diskussion .....	67
4.1 Koexpression der Par-Komplex-Komponenten PKC $\zeta$ und Par6 in retinalen Wachstumskegeln und der Einfluss von NG2 auf deren Lokalisation.....	67
4.2 Optimierung der Elektroporationsmethode für retinale Ganglienzellen .....	69
4.3 Expression von SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 und Untersuchung der Dynamik an der Zelloberfläche .....	72
4.3.1. SNAP-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 lassen sich funktionell in verschiedenen Zelltypen exprimiert .....	72
4.3.2 Ephrin-A5 bindet an SNAP-EphA3 und verstärkt Clusterbildung und Endozytose ....	73
4.3.3 Eph/ephrin-Dynamik in HeLa-Zellen und Fibroblasten .....	74
4.3.4 Eph/ephrin-Dynamik im Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen.....	77
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	83
6. Literatur .....	85

## Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1.1	Die retinotektale topographische Projektion	3
Abbildung 1.2	Reverse signaling und cis-Interaktion im EphA/ephrin-A-System	7
Abbildung 1.3	Endozytose im EphA/ephrin-A-System	12
Abbildung 1.4	Transfektionsmethoden für das Huhn	14
Abbildung 3.1	Ein PKC $\zeta$ -Inhibitor hebt die repulsive Wirkung von NG2 auf Axone retinaler Ganglienzellen auf	36
Abbildung 3.2	NG2 verändert die Lokalisation koexprimierter Par-Komplex-Komponenten	38
Abbildung 3.3	Ablauf einer in ovo Elektroporation	41
Abbildung 3.4	Mittels in ovo Elektroporation transfizierte Retina	41
Abbildung 3.5	Ablauf einer ex ovo Elektroporation	43
Abbildung 3.6	Wichtige Parameter der ex ovo Elektroporation embryonaler Retinae	44
Abbildung 3.7	Transfizierter retinaler Explantatstreifen nach 48 h Kultur auf Laminin	46
Abbildung 3.8	Expressionsplasmide für die Fusionsproteine SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3	47

Abbildung 3.9	Lokalisation der SNAP-Konstrukte in HeLa-Zellen	49
Abbildung 3.10	Serielle Färbung mit verschiedenen fluoreszenten SNAP-Substraten ermöglicht die differenzielle Färbung intra- und extrazellulärer Subpopulationen eines Proteins	51
Abbildung 3.11	Lokalisation von SNAP-ephrin-A5 in primären Hühnerfibroblasten	52
Abbildung 3.12	Lokalisation von SNAP-EphA3 in Hühnerfibroblasten	53
Abbildung 3.13	Das Oberflächensignal von SNAP-ephrin-A5 lässt sich mit PI-PLC reduzieren	55
Abbildung 3.14	SNAP-ephrin-A5 bindet die extrazelluläre Domäne von EphA3-Fc	56
Abbildung 3.15	Lösliches ephrin-A5 induziert Aggregation von SNAP-EphA3	58
Abbildung 3.16	Bicistronische Expression von SNAP-ephrin-A5 und EGFP in retinalen Ganglienzellen führt zu unterschiedlichen Lokalisationen der Expressionsprodukte im Axon	60
Abbildung 3.17	Färbeprozedur zum Nachweis des membranständigen SNAP-ephrin-A5	61
Abbildung 3.18	SNAP-ephrin-A5 ist in der Membran von retinalen Axonen detektierbar	62
Abbildung 3.20:	Reduktion des membranständigen SNAP-ephrin-A5 durch substratgebundenes EphA3 und ephrin-A5	64
Abbildung 3.20	Im EphA3-Streifenassay akkumuliert SNAP-ephrin-A5 in der C-Zone der Wachstumskegel	65
Abbildung 3.21	Im retinalen Wachstumskegel kolokalisiert SNAP-ephrin-A5 mit Rab4	66
Abbildung 4.1	Koadaptation unter Erhalt der Stöchiometrie	79
Abbildung 4.2	Hypothetische Regulation der EphA/ephrin-A-Signaltransduktion durch Endozytose, Recycling und Degradation	81
Tabelle 3.1	Effizienz der Methoden mit pβactEYFP	40
Tabelle 3.2	Einflüsse verschiedener Parameter der ex ovo Elektroporation retinaler Ganglienzellen	45
Tabelle 4	Vergleich und Interpretation der Lokalisation der verschiedenen SNAP-Färbungen	76

## II. Abkürzungsverzeichnis

<b>AP-Achse</b>	Anterior-posterior-Achse
<b>ASLV</b>	Avian Sarcoma-Leukosis Virus
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor
<b>BG</b>	Benzyl-Guanin
<b>BP</b>	Benzyl-Chloro-Pyrimidin
<b>Brn3a</b>	Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A
<b>Cdc42</b>	Cell division control protein 42
<b>CGN</b>	Cerebellar granule neurons
<b>CRD</b>	Cystein-reiche Domäne
<b>CS</b>	Chicken-serum
<b>CSPG</b>	Chondroitinsulfat-Proteoglycan
<b>DRGC</b>	Dorsal root ganglion cell
<b>DV-Achse</b>	Dorsal-ventral-Achse
<b>ECM</b>	Extra cellular matrix
<b>EGFP</b>	Enhanced green fluorescent protein
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>EphA</b>	EphA-Rezeptor (erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma receptor tyrosin kinase)
<b>ephexin</b>	Eph-interacting exchange protein
<b>ephrin-A</b>	Eph-related receptor tyrosine kinase ligand
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Reticulum
<b>FCS</b>	Fetall Calf Serum
<b>FN</b>	Fibronectin
<b>GDNF</b>	Glial cell-derived neurotrophic factor
<b>GEF</b>	Guanine nucleotide exchange factors
<b>GFP</b>	Green fluorescent Protein
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>GTPase</b>	Guanosintriphosphat-Hydrolase
<b>HBSS</b>	Hank's balanced salt Solution
<b>HH</b>	Hamburger-Hamilton-Stadium
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IRES</b>	Internal ribosomal entry site
<b>JMR</b>	Juxtamembranal Region
<b>KSHV</b>	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus

<b>LBD</b>	Ligandenbindedomäne
<b>LM-Achse</b>	Lateral-medial-Achse
<b>MAG</b>	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
<b>NG2</b>	Chondroitin sulfate proteoglycan NG2
<b>O-6-AGT</b>	O-6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
<b>ONH</b>	Optic Nerve Head
<b>p75-NTR</b>	P75-Neurotrophin
<b>Par6</b>	Partitioning defective 6 homolog alpha
<b>PBS</b>	Phosphate buffered salt solution
<b>PCF</b>	Primary Chicken Fibroblast
<b>PFA</b>	Paraformalsdehyd
<b>PI-PLC</b>	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
<b>PKC<math>\zeta</math></b>	Atypische Proteinkinase C zeta
<b>PLL</b>	Poly-L-Lysin
<b>PVR</b>	Poliiovirusrezeptor
<b>Rab</b>	Ras related in brain
<b>Rac1</b>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
<b>Ras</b>	Rat sarcoma
<b>RCAS</b>	Replication-Competent Avian sarcoma-leukosis virus long terminal repeat with a Splice acceptor
<b>Ret</b>	Proto-oncogene c-Ret
<b>RGC</b>	Retinale Ganglienzelle
<b>Rho</b>	Ras-Homolg
<b>Rin1</b>	Ras Inhibitor
<b>RSV</b>	Rous Sarcomavirus
<b>SAM</b>	Steril-alpha motif
<b>SHIP2</b>	Src Homology Inositol Phosphatase-
<b>SPF</b>	Specific pathogen-free
<b>Src</b>	Sarcoma Homolog
<b>Tiam1</b>	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
<b>TN-Achse</b>	Temporal-nasal-Achse
<b>TrkB</b>	Tropomyosin related kinase B

### III. Zusammenfassung

Topographische Projektionen, also die nachbarschaftstreuen Verknüpfungen einer Ebene des Gehirns mit der nächsten, sind ein grundlegendes Prinzip der neuronalen Verschaltung. Die topographische retinotektale Projektion wird durch Gegengradienten der EphA-Rezeptortyrosinkinasen und deren ephrin-A-Liganden in Retina und Tektum etabliert. Deren positionelle und direktionale Information wird von Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen quantitativ ausgelesen. Hierbei findet Signaltransduktion sowohl in der EphA *-forward signaling*, als auch ephrin-A *-reverse signaling* exprimierenden Zelle statt. Ziel dieser Arbeit war es, die Oberflächendynamik von ephrin-A5 und EphA3 in retinalen Wachstumskegeln fluoreszenzmikroskopisch zu analysieren. Hierfür wurden Fusionskonstrukte aus EphA3 beziehungsweise ephrin-A5 und einer O-6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (SNAP-Tag) kloniert und deren funktionelle Expression bestätigt. Der SNAP-Tag bindet seine fluoreszierende Substrate ohne die Ligandenbindung der axonalen Lenkungsmoleküle zu beeinträchtigen. Durch kombinierte Verwendung verschiedener SNAP-Substrate in lebenden Zellen, ist eine Unterscheidung der Fusionsproteine in der Zellmembran von intrazellulären Fusionsproteinen möglich. In nicht-neuronalen Zellen konnten Hinweise auf Endozytose und Proteinrecycling während der Eph/ephrin-Signaltransduktion gefunden werden. Für die Expression der rekombinanten Sensoren in retinalen Ganglienzellen wurde ein effizientes *ex ovo*-Expressionssystem entwickelt. Eine neue mechanische und proteolytische Behandlung explantierter embryonaler Retinae vor der Elektroporation verdoppelte dabei die Anzahl transfizierter Axone. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen des rekombinanten Sensors SNAP-ephrin-A5 in retinalen Wachstumskegeln zeigten eine verstärkte Dynamik des SNAP-ephrin-A5 während des *reverse signaling* im EphA3-Streifenassay. Für eine quantitative Analyse der Dynamik des rekombinanten Sensors wurden SNAP-ephrin-A5 exprimierende Axone auf homogenem EphA- oder ephrin-A-haltigem Substrat kultiviert. Erstaunlicherweise konnte in beiden Fällen eine Reduktion des Sensors an der Wachstumskegeloberfläche beobachtet werden. Dies deutet auf eine Adaptation des ephrin-A-Sensors sowohl auf das *reverse* als auch auf das *forward signaling* hin. Diese Ergebnisse sind erste Hinweise auf eine neuartige Koregulation des Rezeptor-Liganden-Paares EphA3 und ephrin-A5 bezüglich Signaltransduktion und Adaptation. Es wurde eine Hypothese aufgestellt, nach der die Eph/ephrin-Dynamik Endozytose sowie Proteinrecycling umfasst und dadurch die Signaltransduktion und Adaptation reguliert. Koendozytose könnte hierbei für die Homöostase der relativen Eph/ephrin-Ausstattung des Wachstumskegels sorgen und damit dessen topographische Identität erhalten.



## 1. Einleitung

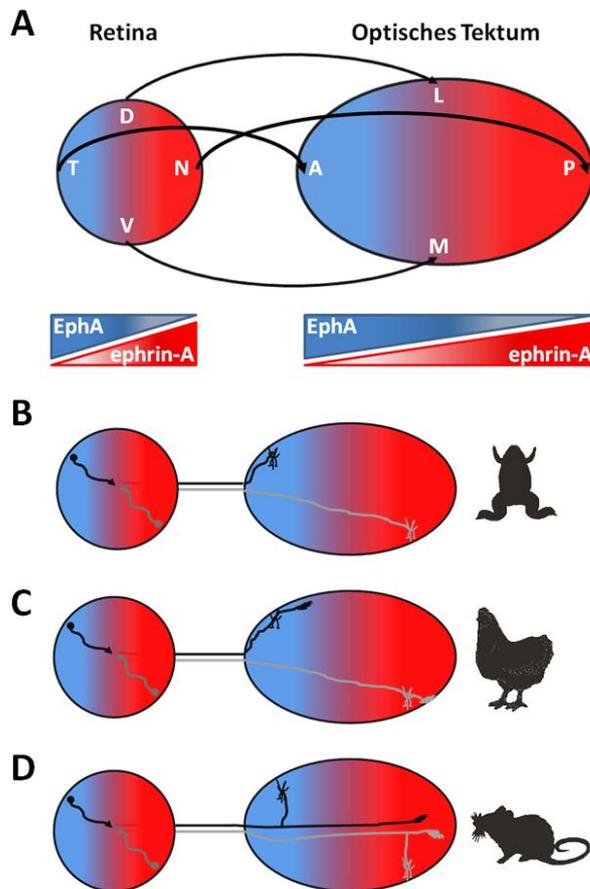
### 1.1 Das Huhn als entwicklungsbiologisches Modellsystem

Das Huhn (*Gallus gallus*) ist einer der ältesten Modellorganismen zum Studium der Embryonalentwicklung und wurde von Pionieren der Naturwissenschaften, wie dem Anatomen Marcello Malpighi oder dem Autoren des ersten histologischen Atlanten, Mathias Duval, immer wieder für die grundlegendsten Arbeiten in der Zoologie herangezogen. Aber auch seit den ersten experimentellen entwicklungsbiologischen Ansätzen von Wilhelm Roux, bis hin zur moderneren Hirnforschung wurde es weiter genutzt. So wurde zum Beispiel der Nervenwachstumsfaktor NGF (*nerve growth factor*) im Huhn entdeckt, wofür Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen 1986 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten. Grundlegendste entwicklungsbiologische Konzepte wie Induktion, Kompetenz, Plastizität und Kontaktinhibition wurden zumindest teilweise am Huhn entdeckt. Das Modellsystem Huhn begleitete die Entwicklung der Biologie von einer deskriptiven Wissenschaft bis ins Zeitalter der Molekularbiologie. Doch hier schienen die großen Vorteile wie schnelle Entwicklung, leichte Verfügbarkeit und sehr gute Zugänglichkeit zum Embryo von der eher beschränkten genetischen Zugänglichkeit überwogen zu werden. Zwar wurden die ersten Gene und Transkriptionsfaktoren, die an der Ausbildung der Körperachsen beteiligt sind, noch im Huhn erforscht, doch mit der rasanten Entwicklung raffinierter genetischer Methoden in Fadenwurm, Taufliege, Zebrafisch und Maus konnte das Modellsystem Huhn zunächst nicht Schritt halten. Dies ändert sich jedoch in letzter Zeit (siehe 1.3), wodurch das Huhn als Modellorganismus insbesondere für die Neuroentwicklungsbiologie momentan ein kleines Comeback feiert. Als weitere Lektüre zur Geschichte und Zukunft des Modellsystems Huhn im Allgemeinen sind insbesondere die Übersichtsartikel von Stern und Vergara zu empfehlen (Stern, 2004; Stern, 2005; Vergara und Canto-Soler, 2012). Der nächste Abschnitt beschäftigt sich mit dem Huhn als Modellorganismus für die Erforschung der axonalen Lenkung.

### 1.2 Die retinotektale Projektion des Huhns als Modellsystem der axonalen Lenkung

Topographische Projektionen, also die nachbarschaftstreue Verknüpfung einer neuronalen Ebene mit der nächsthöheren, sind ein grundlegendes Prinzip der neuronalen Verschaltung. Ein Paradebeispiel hierfür ist die Verknüpfung der Retina mit dem optischen Tektum der niederen Vertebraten beziehungsweise dem Superioren Colliculus bei Säugern. Die temporal-nasale Achse (TN-Achse) der Retina wird hierbei auf die anterior-posterior-Achse des Tektums (AP-Achse) abgebildet und die dorsal-ventrale-Achse (DV-Achse) der Retina auf die lateral-medial Achse

(LM-Achse) des Tektums. Über die Ausbildung der LM/DV-Karte ist wenig bekannt und die bestehenden Theorien sind umstritten. Die TN/AP-Karte wird auf Grund von Gegengradienten von ephrin-A und EphA (*Anmerkung: die Nomenklatur für ephrin und Eph erfolgt nach Vorschlägen des Eph nomenclature comitee (1997).*) in Retina und Tektum ausgebildet (Abbildung 1.1). Repulsive Lenkungsmoleküle der ephrin-A-Familie bilden einen von anterior nach posterior ansteigenden Gradienten im Tektum. Nasale Axone besitzen wenig des ephrin-A-Rezeptors EphA und können daher weiter in das optische Tektum einwachsen als temporale Axone, die viel EphA besitzen und daher früher stehen bleiben. Diese zu stark vereinfachte Form von Chemoaffinität bezieht jedoch weder alle vorhandenen Gegengradienten mit ein, noch das *reverse signaling*, dessen Einfluss auf die retinotektale Projektion in mehreren Studien gezeigt wurde (Hornberger et al., 1999; Carvalho et al., 2006; Gebhardt et al., 2012). Ein erklärungs mächtiges Modell, dass sowohl die Gegengradienten in Retina und Tektum, als auch *forward* und *reverse signaling* berücksichtigt, wurde kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entwickelt (Gebhardt et al., 2012) und durch Computersimulation aber auch *in vitro* Experimente unterstützt. Die Axone wachsen in das Tektum ein und die apikalen Wachstumskegel integrieren alle Signale des *forward* und *reverse signalings*. Ein einwachsendes Axon stoppt an der Position im Tektum, in dem diese Signale balanciert sind. Dies geschieht an einer Position an der das lokale EphA/ephrin-A Verhältnis das des Axons widerspiegelt. Die retinotektale Projektion ist seit den 1960er Jahren ein Feld intensiver Forschung und Gegenstand zahlreicher Übersichtsartikel. Alleine in den letzten fünf Jahren wurden mindestens sieben Übersichtsartikel in hochrangigen Journalen veröffentlicht, die sich ausführlich mit diesem Thema befassen (Clandinin und Feldheim, 2009; Scicolone et al., 2009; Feldheim und O'Leary, 2010; Suetterlin et al., 2012; Triplett und Feldheim, 2012; Klein und Kania, 2014; Triplett, 2014). Die grundlegenden, allgemein akzeptierten Fakten der retinotektalen Projektion sind dort bis ins Detail beschrieben und haben es auch in die gängigen Lehrbücher geschafft, weshalb ich mich hier dem interessanteren Teil widmen möchte: Den offenen Fragen und Kontroversen. Zahlreiche Meinungsverschiedenheiten zu grundlegenden Mechanismen tauchen in der Literatur auf und werden oft ausführlich diskutiert, aber immer wieder auch durch Unterschiede im Experiment oder System relativiert. Doch bei genauerer Betrachtung liegen vielleicht gerade hier interessante Antworten verborgen.



**Abbildung 1.1: Die retinotektale topographische Projektion.** **A:** Die Neurone der Retina sind so mit dem optischen Tektum verknüpft, dass die T/N-Achse auf der A/P-Achse abgebildet wird und die D/V-Achse auf der L/M-Achse. Verantwortlich für die Ausbildung der T/N - A/P- Karte sind Gegengradienten von EphA und ephrin-A, die die topographische Identität der retinalen Ganglienzellen und ihr Ziel im Tektum definieren. **B:** Die Axone wachsen aus dem optischen Nervenaustritt aus und bilden den optischen Nerv und Trakt. Nach Erreichen des Tektums wachsen sie dort direkt zur topographisch richtigen Position. Dort beginnen sie Verknüpfungen auszubilden. Diese direkte Lenkung ist unter anderem bei Amphibien und Fischen beschrieben. **C:** Im Huhn wachsen die Axone zunächst direkt zu ihrer topographischen Position, überwachsen diese jedoch. An der topographisch korrekten Position werden Verknüpfungen gebildet. Der *overshoot* wird zurückgebildet. **D:** In der Maus und Ratte wachsen die Axone zunächst bis zum posterioren Tektum. Anschließend bilden sich laterale Ausläufer, die *interstitial branches*, die zur topographisch korrekten Position wachsen. T: temporal, N: nasal, A: anterior, P: posterior.

### 1.2.1 Eph/ephrin-Signaltransduktion: Axon-Tektum und Axon-Axon Interaktionen

Es gibt vereinfacht zwei Möglichkeiten, wie die Axone ihre korrekte topographische Position finden. Durch Auslesen der Konzentrationen der Gradienten im Tektum oder durch einen Vergleich ihres eigenen Repertoires an Signalmolekülen mit denen der anderen Axone. Oder anders ausgedrückt: Durch Interaktion der Axone mit dem Tektum oder Interaktion der Axone untereinander. Einige Modelle gehen von einer klaren Vorgabe der Topographie durch die Gradienten im Tektum aus. Doch die überraschende Plastizität der Karte stellt einen Widerspruch dazu dar. Ein Experiment verdeutlicht dies besonders gut. Entfernt man die anteriore oder posteriore Hälfte des Tektums, bildet sich dennoch eine zwar kleinere aber korrekte topographische Karte aus (Yoon, 1971; Sharma, 1972). Die Axone, deren Ziel entfernt wurde, sind in diese Karte integriert. Neben dieser Kartenkompression und weiteren Experimenten, die auf Axon-Axon-Wechselwirkungen hinweisen, sorgte ein genetischer Ansatz für ein Umdenken: EphA3 *knock in* Versuche in der Maus und daraus abgeleitete Computermodelle (Brown et al., 2000; Reber et al., 2004; Yates et al., 2004). Wird in einer zufällig verteiltem Population der retinalen Ganglienzellen zusätzlich zum endogenen EphA-Level ektopisch EphA3 exprimiert,

könnte man eigentlich erwarten, dass diese auf Grund der hohen Rezeptorexpression eine Art hypertemporale Identität aufweisen und ihre Axone nicht in den Superioren Colliculus einwachsen oder anterior stehen bleiben. Tatsächlich bildet diese Subpopulation aber eine korrekte topographische Karte im anterioren Superioren Colliculus und die nativen Axone werden nach posterior verdrängt, wo sie eine weitere korrekte topographische Karte bilden. Diese Kartenduplikation kann durch eine relative Signaltransduktion unter Beteiligung von Axon-Axon-Interaktionen erklärt werden (Reber et al., 2004). Sprechen diese Versuche klar für eine Karte, die unter Beteiligung von Axon-Axon-Wechselwirkungen entsteht, kann ein Mechanismus, der ausschließlich auf Axon-Axon-Wechselwirkungen beruht ein anderes Experiment jedoch nicht erklären. Transplantiert man einzelne Ganglienzellen von Zebrafischen in Mutanten ohne retinale Ganglienzellen, finden diese ohne Axon-Axon-Wechselwirkung ihre korrekte Terminationszonen (Gosse et al., 2008). Es scheinen also beide Mechanismen eine Rolle zu spielen, deren Zusammenspiel nach wie vor unklar ist (Triplett, 2014). Eine Möglichkeit wäre die Redundanz von Axon-Tektum- und Axon-Axon-Wechselwirkungen, um so die Ausbildung der korrekten Karte unter allen Umständen zu gewährleisten. Man kann aber auch von einer Integration aller Wechselwirkungen ausgehen. Das Signal der Axon-Axon-Wechselwirkungen wird mit dem der Axon-Tektum-Wechselwirkungen verrechnet und so die Gesamtinformation über die Umgebung des Wachstumskegels in einen Wert übersetzt. Ein solches Modell (Gebhardt et al., 2012) liefert in der Computersimulation korrekte, robuste topographische Karten und kann die meisten beschriebenen Versuche simulieren. Dies legt nahe, dass sowohl Axon-Axon als auch Axon-Tektum-Interaktionen beteiligt und miteinander verknüpft sind. Darüber, welcher Mechanismus dominiert, entscheiden bei der experimentellen Untersuchung des Prozesses dann die Umstände des jeweiligen Experiments.

### 1.2.2 Adaptation und Topographie

Einen klaren Beweis für die Fähigkeit retinaler Wachstumskegel auf ephrin-A zu adaptieren liefern eine Reihe von sogenannten „Gap-Assays“ (Fritz, 2012). Auf Proteinsubstraten, die aus zwei homogenen Feldern von ephrin-A-Protein unterbrochen von einer Lücke mit permissivem Laminin bestanden, wurden retinale Explantatstreifen kultiviert. Wachsen die Axone auf ephrin-A, ignorieren sie das zweite ephrin-A-Feld nach Überqueren der Lamininlücke, wohingegen naive Axone am Rand eines ephrin-A-Feldes eine deutliche Stoppreaktion zeigen. Dies zeigt die Desensitivierung des *forward signalings*. Verwendet man jedoch Substrate mit einer größeren Lamininlücke zwischen den ephrin-Feldern, bilden die Axone bei zweitem ephrin-Kontakt ebenfalls eine Stopppfront. Dies zeigt Resensitivierung des *forward signalings*. In weiteren ähnlichen Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass dies auch auf

vergleichbaren Eph-Lückensubstraten der Fall ist (Fiederling, unpubliziert), also ebenso Adaptation des *reverse signalings* stattfindet. Axone retinaler Ganglienzellen können also auf Eph-A und ephrin-A adaptieren. Doch wie kann man sich Adaptation und gleichzeitiges Auslesen eines Gradienten vorstellen? Bei attraktiven Signalen kann Adaptation zu einer Bewegung hin zur höchsten Konzentration führen, wie es bei Bakterien (Wadhams und Armitage, 2004) oder auch bei Axonen im Falle des Lenkungsmoleküls Netrin gezeigt wurde (Ming et al., 2002). Die Adaptation führt hier also zu gerichtetem Wachstum, aber keineswegs zu einer topographischen Karte. Eine Möglichkeit zur Lösung des Konflikts zwischen Adaptation und topographischem Wachstum im Rahmen des Modells der balancierten Signaltransduktion (Gebhardt et al., 2012) ist die stöchiometrische Koadaptation von Eph und ephrin (Fiederling, unpubliziert). Durch Kodaptation von EphA und ephrin-A im bestehenden Konzentrationsverhältnis wird die relative topographische Identität des Axons trotz Adaptation gewährleistet. Erste Hinweise auf die Richtigkeit dieser Annahme lieferten weitere Gap-Assays bei denen ein EphA-Feld durch eine Lamininlücke von einem ephrin-A-Feld getrennt ist. Auch hier konnte Adaptation beobachtet werden (Fiederling, unpubliziert). Dies ist ein sehr starkes Indiz dafür, dass Axone auf Grund von *forward* oder *reverse signaling* ihre Sensitivität gegenüber EphA und ephrin-A adaptieren können. Doch wie wird die axonale Adaptation überhaupt reguliert? Im Falle des Netrin ist Endozytose für Desensitivierung und lokale Proteinsynthese für die Resensitivierung verantwortlich (Piper et al., 2005). Proteinsynthese scheint keine Rolle bei der Eph/ephrin-Signaltransduktion (Roche et al., 2009) und Adaptation (Fritz, 2012) zu spielen. Dynamin-abhängige Endozytose kann als einziger Weg für die Adaptation wahrscheinlich ebenfalls ausgeschlossen werden (Fritz, 2012). Andere von Dynamin-unabhängige Endozytosewege sind jedoch nach wie vor gute Kandidaten. Auch Phosphatasen scheinen beteiligt zu sein (Fritz, 2012). Neben der Frage nach dem unbekanntem Mechanismus, stellt sich die Frage nach der Funktion bei der Ausbildung der Karte. Eine mögliche Funktion wäre es, den Axonen überhaupt erst zu ermöglichen in das Tektum einzuwachsen. Am Anfang werden sie mit einer sehr hohen Konzentration EphA konfrontiert, das in diesem Kontext eigentlich repulsiv wirken sollte. Vielleicht erreichen die Axone auf Grund des engen faszikulierten Wachstums im optischen Nerv das Tektum in einer Art präadaptiertem Zustand. Erst nach Überqueren der Eph-Hürde resensitivieren sie und wachsen zu ihren topographischen Zielen. Eine sehr langsame Resensitivierung könnte auch der Grund für den *overshoot* vor dem *interstitial branching* der Axone im Superioren Colliculus sein (Abbildung 1.1 D).

### 1.2.3 Besonderheiten der Eph-ephrin-Signaltransduktion

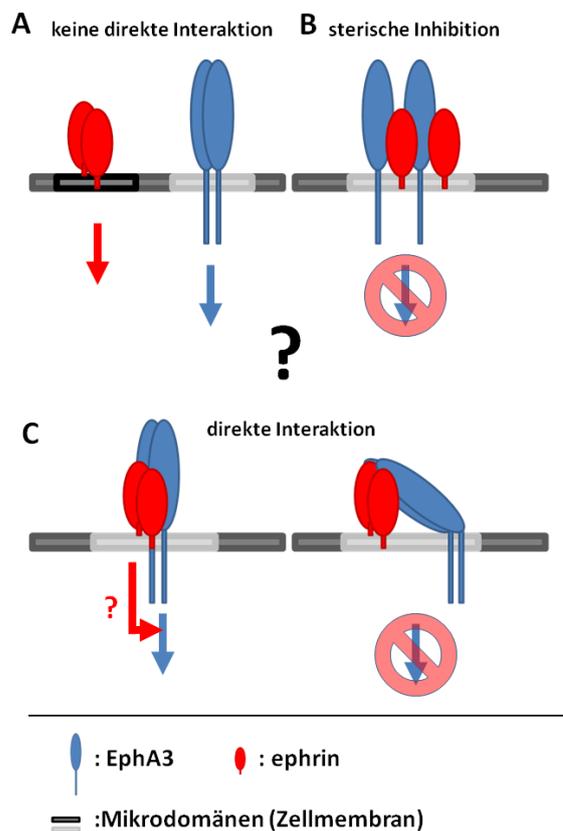
Die Eph-Familie ist die größte Familie der Rezeptortyrosinkinasen und lässt sich in eine EphA (EphA1 bis A8 und EphA10) und EphB (EphB1 bis B4 und EphB6) Unterfamilie unterteilen

(Klein und Kania, 2014), ebenso ihre Liganden die ephrine (ephrin-A1 bis A6 und ephrin-B1 bis B3). Bis auf EphA4 und EphB2, die ephrin-A und B binden können, binden EphA-Rezeptoren nur ephrin-A und EphB-Rezeptoren nur ephrin-B. Es gibt einige interessante Unterschiede zwischen den Vertretern der Eph-Familie zu allen anderen Rezeptortyrosinkinasen. Fünf davon fallen besonders auf (Egea und Klein, 2007). Erstens: Alle ihre Liganden, die ephrine sind membrangebunden und nicht diffusibel. Zweitens: Eph-Rezeptoren bilden nicht nur wie für Rezeptortyrosinkinasen üblich Dimere, sondern können auch größere Cluster bilden, deren Zusammensetzung und Größe über Art und Stärke des Signals entscheidet (Janes et al., 2012; Nikolov et al., 2013). Drittens: Obwohl Eph-ephrin-Bindungen zuerst an der Bildung von Zell-Zellkontakten beteiligt sind, wirken sie meistens in zweiter Instanz repulsiv. Viertens: Bei solchen Zellinteraktionen findet Signaltransduktion sowohl in der Eph- (*forward signaling*) als auch in der ephrin-präsentierenden Zelle (*reverse signaling*) statt. Dies ist besonders im Falle des GPI-verankerten ephrin-A bemerkenswert. Fünftens: Es sind neben diesen *trans*-Interaktionen auch *cis*-Interaktionen in der gleichen Zellmembran möglich. Einige dieser Phänomene werde ich im Folgenden mit Schwerpunkt auf neuroentwicklungsbiologische Systeme detaillierter ausführen.

### 1.2.4 ephrin-A: Reverse Signaltransduktion und cis-Interaktion

Ein besonders interessanter Aspekt der Eph/ephrin-Signaltransduktion ist das Phänomen des *reverse signaling*. Bei einem Aufeinandertreffen zweier Zellen findet sowohl in der Eph- als auch ephrin-exprimierenden Zelle Signaltransduktion statt. Doch wie soll das im Falle des ephrin-A, das GPI-verankert ist und somit keine intrazelluläre Domäne besitzt, funktionieren? Eine Möglichkeit ist die Modulation der Signaltransduktion von koexprimierten EphA also *cis* Interaktion ohne eigenständige Signaltransduktion, eine weitere die Signaltransduktion über Korezeptoren. Tatsächlich sind insbesondere in den neuronalen Modellsystemen EphA und ephrin-A häufig koexprimiert und beide Varianten also *cis* Modulation und Signaltransduktion über Korezeptoren, beschrieben worden (Klein und Kania, 2014). Jedoch sind einige Punkte über Details strittig und häufig werden für Aussagen über das ephrin-A Signaltransduktion Publikationen zum ephrin-B System angeführt, welches eine intrazelluläre Domäne besitzt und daher eventuell andere Signalwege nutzt. Die erste Studie, die sich mit *cis*-Interaktion im EphA/ephrin-A-System auseinandersetzt, stammt aus der Gruppe um U. Drescher. Überexpression von ephrin-A in retinalen Ganglienzellen führt dazu, dass temporale Axone (mit niedrigem endogenen ephrin-A Level) nicht mehr auf caudale Membranstreifen des Tektums reagieren und PI-PLC Behandlung dazu, dass nasale Axone (mit hohem endogenen ephrin-A Level) auf ephrin-A2 Streifen reagieren, was sie normalerweise nicht tun (Hornberger et al., 1999). Ein in dieser Studie ebenfalls gezeigter Effekt von ektopisch exprimiertem ephrin-A5 war

die erhöhte Phosphorylierung von koexprimiertem EphA4, insbesondere in temporalen Axonen. Kurz darauf bestätigten genetischen Studien die *cis* Interaktion (Feldheim et al., 2000). Erste Hinweise auf eine direkte Interaktion zwischen EphA und ephrin-A lieferten Überexpressionsstudien in Kulturzellen (Yin et al., 2004). EphA4 und ephrin-A2 kolokalisierten in Koexpressionsstudien und konnten ihren löslichen Liganden daraufhin nicht mehr binden. Die erhöhte Phosphorylierung des EphA4 wurde hier nicht beobachtet und deshalb eine Maskierung von EphA durch ephrin-A vorgeschlagen. Da es sich aber um Überexpression in nichtneuronalen Zellen handelte, findet diese Studie nach wie vor wenig Beachtung im Feld der axonalen Lenkung. Weitere hochrangige Studien in neuronalen Modellsystemen zeigten aber ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. In Motoneuronen wurde eine laterale Segregation von koexprimiertem, endogenem EphA und ephrin-A gezeigt (Abbildung 1.2 A) und direkte *cis*-Interaktion ausgeschlossen (Marquardt et al., 2005).



**Abbildung 1.2: Reverse signaling und *cis*-Interaktion im EphA/ephrin-A-System.** **A:** In der gleichen Zellmembran (in *cis*) exprimierte EphA und ephrin-A Moleküle können auf verschiedene Art und Weise interagieren. Sie können räumlich voneinander getrennt sein und unterschiedliche Signalwege nutzen. Diese laterale Segregation schließt intrazelluläre Integration der Signale jedoch nicht aus. Auch Interaktion von EphA und ephrin-A verschiedener Filopodien des gleichen Wachstumskegels ist denkbar. **B:** Ohne direkte spezifische Interaktion verhindern die ephrin-A-Moleküle die Dimerisierung der Rezeptor-tyrosinkinasen EphA. So wird durch sterische Inhibition das EphA Signal blockiert. **C:** Direkte Interaktion über eine spezifische Bindung von EphA und ephrin-A in *cis*. Es ist sowohl eine Interaktion über eine nicht an der *trans*-Detektion des ephrin-A5 beteiligte

Domäne (links) als auch Maskierung über die Ligandenbindedomäne (rechts) beschrieben. Inwiefern diese Maskierung in der Zellmembran sterisch umsetzbar ist, bleibt jedoch fraglich. Ob eine direkte *cis*-Interaktion grundsätzlich inhibierend wirkt und welche der Szenarien tatsächlich physiologisch relevant sind, ist noch nicht endgültig geklärt. Korezeptoren des ephrin-A sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Daher geht diese Studie von einer eigenständigen Signaltransduktion des ephrin-A aus. Überexpressionsstudien in retinalen Ganglienzellen zeigten jedoch, dass EphA und ephrin-A in der gleichen Membran-Mikrodomäne lokalisiert sind. Durch geschickte Verwendung von ephrin-A und EphA Chimären wurde neben der direkten Interaktion über die Ligandenbindedomäne sogar eine zweite davon unabhängige *cis*-Interaktion zwischen EphA und ephrin-A (Carvalho et al., 2006) gezeigt, also das Gegenteil von lateraler Segregation? Carvalho et al. schlagen eine kontextabhängige Koexistenz der Mechanismen vor. Diese Hypothese wurde durch Überexpression von ephrin-A5 im Motoneuron-System erhärtet. Hohe ephrin-A5 Konzentrationen führen zu einer Kolokalisation und Interaktion mit EphA3, wohingegen bei niedrigen ephrin-A5 Konzentrationen keine Kolokalisation oder *cis*-Interaktion zu beobachten ist (Kao und Kania, 2011). So kann man von einer konzentrationsabhängigen Koexistenz des *reverse signaling* und *cis*-Interaktionen ausgehen, die entweder das *forward signaling* durch eine Art der Modulation oder Maskierung (Abbildung 1.3 C) beeinflussen, aber vielleicht auch durch sterische Beeinträchtigung (Abbildung 1.3 B) das EphA-Clustering behindern (Dudanova und Klein, 2011; Kao und Kania, 2011; Kao et al., 2012). Weitere Belege für eine unabhängige ephrin-A-Signaltransduktion im Motorsystem folgten (Dudanova et al., 2012). Ein besonders deutlicher Hinweis auf eine eigenständige Signaltransduktion des ephrin-A lieferten Streifenassays mit EphA3. Axone retinaler Ganglienzellen vermeiden die EphA-Streifen in Abwesenheit von exogenem ephrin-A, wonach es sich hier also nicht um eine Modulation des *forward signaling* handelt. Für eine Signaltransduktion GPI-verankerter ephrin-A-Moleküle ist die Beteiligung eines Korezeptors erforderlich. Im Motorneuron-System wurde Ret als Korezeptor für ephrin-A identifiziert (Bonanomi et al., 2012). Somit ist die ephrin-A Signaltransduktion hier mit dem GDNF-Signalweg (Dudanova et al., 2010; Bonanomi et al., 2012) gekoppelt. Im retinotektalen System ist es TrkB und mit geringerer Affinität p75-NTR (Deinhardt et al., 2006; Fitzgerald et al., 2008; Lim et al., 2008; Marler et al., 2008; Marler et al., 2010; Poopalasundaram et al., 2011) was die Beteiligung des BDNF-Signalweges nahe legt. Wie eine Integration der verschiedenen Signalwege realisiert wird, bleibt weiter unklar.

### 1.2.5 Eph/ephrin-Interaktion, Clustern und Signaltransduktion

Eph-Rezeptoren bestehen aus einer relativ konservierten intrazellulären Domäne und einer variableren extrazellulären Domäne. Diese besteht aus der Ligandenbindedomäne (LBD), einer Cystein-reichen Domäne (CRD) und zwei Fibronectin III-Domänen. Die intrazelluläre Domäne besteht aus einer juxtamembranal Region (JMR), der Kinase Domäne, einem *sterile- $\alpha$  motif* (SAM) und einem PDZ *binding motif* (PBM). Neben der Phosphorylierungsstelle der Kinase Domäne sind auch Phosphorylierungsstellen in der JMR und der SAM-Domäne

vorhanden. Eph-Aktivierung und Phosphorylierung wird nicht nur von der Bindung des ephrin-Liganden an die Ligandenbindedomäne und Eph-Dimerisierung ausgelöst, sondern geht mit der Bildung von größeren Komplexen unter Beteiligung vieler Eph-Moleküle in derselben Membran, sogenannten Clustern einher (Davis et al., 1994; Janes et al., 2012; Nikolov et al., 2013). Die Liganden der Eph-Rezeptoren, die ephrine, unterscheiden sich vor allem darin, dass ephrin-A GPI-verankert ist, wohingegen ephrin-B eine transmembrane und intrazelluläre Domäne mit einem PBM und Phosphorylierungsstellen aufweist. Die extrazelluläre Bindedomäne ist jedoch ähnlich. Doch wie wird der Ligand gebunden und wie bilden sich die Cluster, insbesondere bei EphA/ephrin-A-Interaktion? EphA Rezeptoren sind vor der Bindung des Liganden in der Zellmembran verteilt oder bilden bereits kleinere Cluster (Wimmer-Kleikamp et al., 2004). Die Rezeptortyrosinkinasen zeigen minimale Kinaseaktivität. Das Binden mit hoher Affinität von je zwei ephrin und Eph-Molekülen über die Ligandenbindedomänen (Himanen, 2012) erfolgt unter Bildung von Eph/ephrin-Heterotetrameren. Die Bildung der Tetramere erfolgt hierbei über Bindungsstellen in der LBD und CRD mit niedriger Affinität (Himanen et al., 2010; Seiradake et al., 2013), wobei eine ringartige Struktur ausgebildet wird. Dabei werden auch die autoinhibierten Phosphorylierungsstellen der Monomere für Kreuzaktivierung freigelegt und die Signaltransduktion ermöglicht. Die Tetramere können als eine Art Nukleationspunkt für die Ausbildung größerer Cluster dienen (Smith et al., 2004; Wimmer-Kleikamp et al., 2004; Janes et al., 2012). Es wurden hierbei Homo- und Hetero-Oligomerisierung von Eph-Rezeptoren unter Beteiligung der extrazellulären Domänen beobachtet. Eine gute Übersicht über das Arrangement und den Aufbau der Eph-Rezeptoren während der Cluster-Bildung liefert ein Übersichtsartikel von D. Nikolov (Nikolov et al., 2013). Die Tetramere bilden den Kern des Clusters. Mehrere Tetramere können wiederum über die Teile der LBD, die nicht direkt an der ephrin-Bindung beteiligt sind, größere Oligomere bilden. Die intrazellulären Domänen dieser Oligomere können sich gegenseitig phosphorylieren und somit signalisieren. Auch nicht ephrin-gebundene Eph-Rezeptoren interagieren über ihre LBD mit der FN III-Domäne der oligomerisierten Eph-Rezeptoren, bis sie ebenfalls ephrin binden und aktiv an der Signaltransduktion teilnehmen.

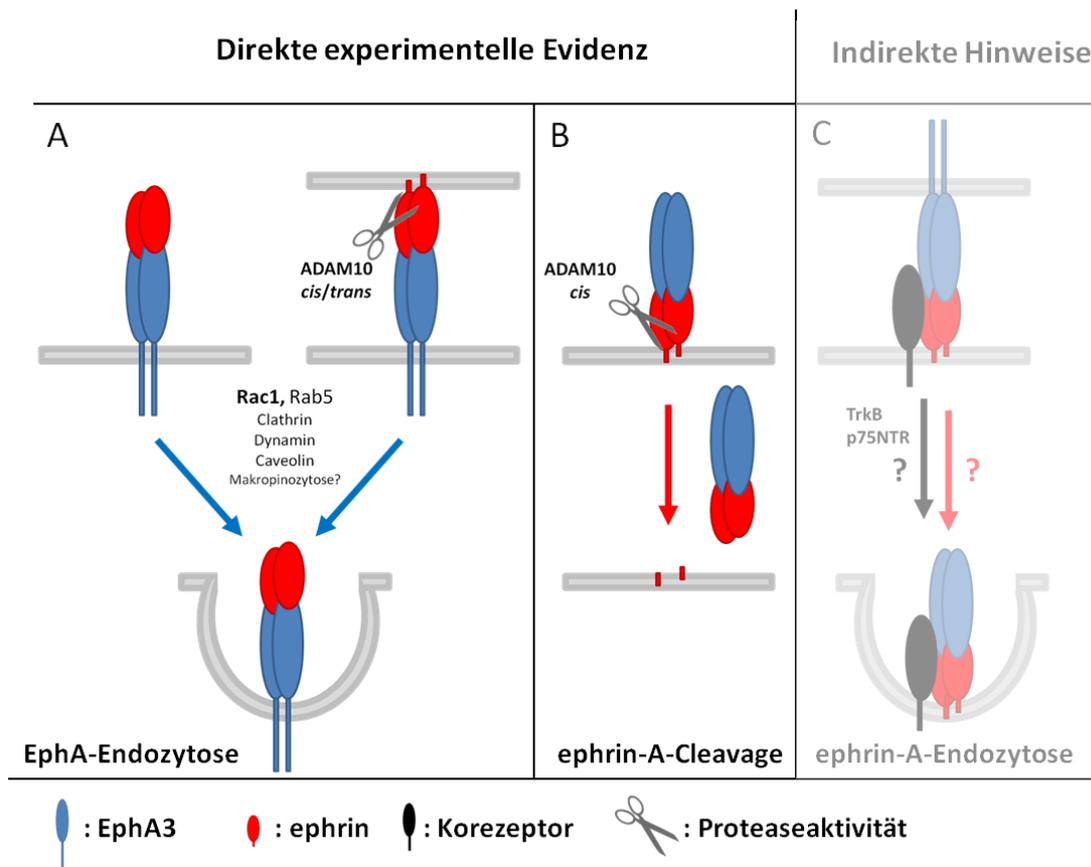
Downstream des EphA3 werden verschiedene Signalwege adressiert (Coulthard et al., 2012): Kinasen der Src-Familie, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, p-21 aktivierte Kinase, PSD-95, Chemokin- sowie heterotrimere G-Protein-abhängige Signalwege, aber auch Integrin-vermittelte Signalwege. In der axonalen EphA/ephrin-A-Signaltransduktion ist vor allem die ephexin-vermittelte Wirkung auf die Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 (Shamah et al., 2001) als Hauptmechanismus auszumachen, auch wenn es durchaus Belege für die Beteiligung des Integrin-Signalweges gibt (Woo et al., 2009). So wird durch EphA-Signaling über die Rho-GTPasen das Aktinzytoskelett reguliert. Dies beeinflusst sowohl gerichtetes Wachstum als auch Adhäsion, Repulsion und Endozytose, und somit die gesamte Dynamik des Wachstumskegels (Shamah et al., 2001; Murai und Pasquale, 2005; Sahin et al., 2005). Da sich diese Arbeit vor

allem mit der initialen Eph/ephrin-Interaktion und der zellulären Dynamik des Eph/ephrin-Systems beschäftigt, sei für eine ausführlichere Beschreibung des nachgeschalteten Signalweges auf aktuelle Übersichtsartikel zu dem Thema verwiesen (Coulthard et al., 2012; Miao und Wang, 2012; Klein und Kania, 2014).

### 1.2.6 Eph/ephrin-Signaltransduktion und Endozytose

Endozytose spielt eine wichtige Rolle im Eph/ephrin-Signaling. So ist sie ein entscheidender Mechanismus der Signaltermination und daran beteiligt die starke Eph-ephrin-Bindung zwischen zwei Zellen in Repulsion umzuwandeln. Besonders zu empfehlen sind zu diesem Thema die Übersichtsartikel von Egea und Klein sowie Pitulescu und Adams (Egea und Klein, 2007; Pitulescu und Adams, 2010). Da es für diese Arbeit von besonderem Interesse ist, lege ich im Folgenden den Schwerpunkt auf EphA/ephrin-A-Endozytose. In der Tat befassen sich nur wenige Studien mit der Endozytose im EphA/ephrin-A-System. Es wurde aber gezeigt, dass Tiam1, ein für die Rho-GTPase Rac1 spezifischer GEF (*guanine nucleotide exchange factor*), eine Rolle in der Clathrin vermittelten EphA/ephrin-A-Endozytose spielt (Yoo et al., 2010). Stimuliert man EphA8 exprimierende Zellen mit löslichem ephrin-A5, so werden EphA8-ephrin-A5-Komplexe internalisiert. Dieser Endozytose-Vorgang ist Clathrin-abhängig. Wird Tiam1 durch *knock-down* herunter reguliert, reduziert dies die Endozytose der EphA8-ephrin-A5-Komplexe. Das gleiche geschieht bei Deletion der GEF-Bindedomäne des EphA8. Der Einfluss dieses Endozytoseweges auf die retinotektale Projektion wurde kürzlich gezeigt (Yoo et al., 2011). Auch in anderen Studien wurde der Einfluss von Tiam1 auf die Eph-Signaltransduktion untersucht. So ist Tiam1 am EphA2 vermittelten Neuritenwachstum (Tanaka et al., 2004) und an der Regulation der dendritischen Dornenfortsätze beteiligt (Tolias et al., 2007), aber auch an der ephrin-A2 vermittelten Clathrin-abhängigen Endozytose des KSH-Virus (Hahn et al., 2012; Dutta et al., 2013). Eine Möglichkeit für die Regulierung der Tiam1 abhängigen Endozytose liefert eine Studie zu Rab5 und Rac1. In nicht neuronalen Zellen führt die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR und PVR zu einer lokalen Aktivierung von Tiam1 und Rac1 an Rab5 positiven frühen Endosomen. Dies führt wiederum zu Aktinpolymerisierung und letztendlich zu gerichteter Migration (Palamidessi et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde kürzlich gezeigt, dass Rab4 und Rab5 am schnellen Proteinrecycling und damit am Wachstum von Axonen retinaler Ganglienzellen in *Xenopus* beteiligt ist (Falk et al., 2014). So wäre denkbar, dass Tiam1 vermittelte Endozytose von EphA im retinalen Wachstumskegel ebenfalls über Rab4 und Rab5 funktioniert. Ein Hinweis darauf könnte der GEF Rin1 sein. Rin1 interagiert mit Rab5, wodurch EphA4-Endozytose vermittelt wird, allerdings in Neuronen der Amygdala und nach ephrin-B-Stimulation (Deininger et al., 2008). Des Weiteren wurde für EphA2 gezeigt, dass es unter Beteiligung von Tiam1 in frühen Endosomen aufgenommen wird und dort weiter

signalisiert (Boissier et al., 2013). Auch Rab5 und Rab4 sind an frühen Endosomen lokalisiert (Falk et al., 2014). Dafür, dass die Schnittstelle von Endozytose und Proteinrecycling im Wachstumskegel nicht nur am Wachstum, sondern auch an der axonalen Lenkung über EphA beteiligt ist, fehlt allerdings direkte experimentelle Evidenz. Ein negativer Regulator der ephrin-A1 induzierter EphA2 Endozytose ist SHIP2 (*Src Homology Inositol Phosphatase-2*) (Zhuang et al., 2007), welches mit Rac1 interagiert. Rac1-Regulation des Aktinzytoskeletts nimmt eine sehr zentrale Rolle während der EphA/ephrin-A-Endozytose ein (Abbildung 1.3 A) und wird zumindest teilweise über Tiam1 und Rin1 gesteuert. Daher ist auch die Beteiligung anderer Endozytosewege, die über das Aktinzytoskelett reguliert werden, denkbar. So wurde ephrin-A vermittelte Makropinozytose, bei der größere Membranbereiche endozytiert werden (Kolpak et al., 2009), aber auch Dynamin-abhängige EphA Endozytose gezeigt. Es wurde in einer Studie zur Beteiligung von Caveolin-1 an der Endozytose von EphB auch eine Interaktion von Caveolin-1 mit EphA2 nach ephrin-A1 Stimulation beobachtet (Vihanto et al., 2006), was ein Hinweis auf Dynamin-Caveolin-Endozytose ist. Es wurde also die Beteiligung der Dynamin-abhängigen Endozytosewege (Clathrin-vermittelt und Caveolin-vermittelt) gezeigt, aber auch Dynamin-unabhängige Endozytose wie Makropinozytose ist nicht auszuschließen. Weitere Phänomene der Eph/ephrin-Endozytose, wie die Endozytose Membran-gebundenen ephrins in *cis* und *trans* (Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003) oder die Beteiligung von Vav wurden bisher nur für EphB/ephrin-B gezeigt, werden in der Literatur jedoch häufig ohne experimentelle Evidenz auf das EphA/ephrin-A System übertragen. Alle bisherigen Versuche zur Endozytose wurden mit rekombinantem löslichem ephrin-A durchgeführt. Doch welche Evidenzen gibt es für EphA-ephrin-A-Endozytose in Zusammenhang mit Membran-gebundenem ephrin-A? Diese Frage steht eng in Verbindung mit der Metalloprotease ADAM10, die Eph-gebundenes ephrin schneidet und damit aus der Zellmembran entfernt (Abbildung 1.3 B). ADAM10 kann sowohl mit ephrin-A, als auch mit EphA kolokalisiert sein (Hattori et al., 2000; Janes et al., 2005) und ephrin-A in *cis* und *trans* schneiden. Kolokalisation von ADAM10 mit EphA3 wird durch Zugabe von löslichen ephrin-A-Fc erhöht und ephrin-A5 vom Fc-Anteil gespalten (Janes et al., 2005). Desweiteren konnten Zellen, die EphA3 und ADAM10 exprimieren, Bead-gebundenes ephrin-A5-FC schneiden und endozytieren, wohingegen *knock down* von ADAM10 diesen Vorgang reduziert. Diese Beobachtung konnte auch in Kokultur von ephrin-A2 oder ephrin-A5 exprimierenden Zellen mit EphA3/ADAM10 exprimierenden Zellen gemacht werden. Ephrin-A wird in *trans* geschnitten und an EphA3 gebunden von der EphA3-präsentierenden Zelle endozytiert. Dies unterscheidet sich vom EphB/ephrin-B-System; hier werden ganze Moleküle mit Zellmembrananteil *trans*-endozytiert (Zimmer et al., 2003). Interessanter Weise wird auch gezeigt, dass keine Endozytose von ephrin-A/EphA-Komplexen in die ephrin-A exprimierende Zellen stattfindet, egal ob ADAM10 in *cis* oder *trans* exprimiert wird (Janes et al., 2005).



**Abbildung 1.3: Endozytose im EphA/ephrin-A-System.** **A:** Lösliches ephrin-A wird von EphA gebunden und der EphA/ephrin-A-Komplex in die EphA präsentierende Zelle endozytiert. Bei membrangebundenem ephrin-A wird dieses von der Metalloprotease ADAM10 aus der Zellmembran geschnitten. Dies kann in *cis* und *trans* geschehen. Daraufhin wird der EphA/ephrin-A-Komplex in die EphA präsentierende Zelle endozytiert. An der EphA-Endozytose ist Clathrin und Rac1, aber auch Rab5, Dynamin und Caveolin, sowie eventuell Makropinozytose beteiligt. **B:** Bei Bindung von löslichem EphA3 an ephrin-A wird dies in *cis* durch ADAM10 aus der Membran geschnitten (Cleavage) und der EphA3/ephrin-A Komplex wird in die Umgebung entlassen. **C:** Mögliche ephrin-A-Endozytose. Nach wie vor ist unklar, ob ephrin-A auch in die ephrin-A-präsentierende Zelle endozytiert wird. Möglicherweise wird ephrin-A jedoch zusammen mit den jeweiligen Korezeptoren endozytiert. Besonders die Rezeptortyrosinkinase TrkB scheint plausibel. Auch p75NTR kommt im retinotektalen System in Frage. Ob diese Endozytose wie hier dargestellt durch Stimulation mit EphA induziert wird, ist ebenfalls ungeklärt.

Dies widerspricht früheren Experimenten mit KUZ, dem Drosophila-Homolog von ADAM10 (Hattori et al., 2000). Hier wurde gezeigt, dass in der Zellmembran von ephrin-A2 exprimierenden Zellen nach exogener EphA3-Fc-Stimulation, ephrin-A2 von ADAM10 in *cis* abgespalten wird. Von einer Internalisierung der ephrin-A2/EphA3-Fc-Komplexe wird jedoch nicht berichtet. So ist zwar klar, dass Endozytose von EphA/ephrin-A Komplexen in die EphA exprimierende Zelle stattfindet und auch einen Einfluss auf die retinotektale Projektion hat, eine Kontakt-vermittelte Endozytose des Komplexes in die ephrin-A exprimierende Zelle, wie im Falle des ephrin-B, konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden. Ein Hinweis darauf liefert allerdings die Kolokalisation von ephrin-A5 mit p75-NTR in der Caveola-Domäne der Zellmembran von retinalen Axonen und die Rolle von p75-NTR beim EphA/ephrin-*reverse signaling* (Lim et al.,

2008). Eng damit verbunden ist ein weitere Korezeptor des ephrin-A, die Rezeptortyrosinkinase TrkB (Marler et al., 2008; Poopalasundaram et al., 2011). TrkB wird nach BDNF-Aktivierung endozytiert, p75-NTR inhibiert diesen Vorgang (Makkerh et al., 2005). Endozytose und schneller axonaler retrograder Transport von TrkB und p75-NTR werden wiederum von Rab5 und Rab7 reguliert (Deinhardt et al., 2006). Da ephrin-A mit beiden kolokalisiert ist, eine gekoppelte Clathrin/Caveolae-abhängige Endozytose mit TrkB (Zheng et al., 2008) und vielleicht auch p75NTR denkbar, aber bis lange nicht eindeutig gezeigt. So wurde die Beteiligung der Endozytose für das EphA/ephrin-A-*forward-signaling* zwar mehrfach bestätigt und untersucht, für das *reverse signaling* ist eine Beteiligung der Endozytose jedoch ohne experimentelle Evidenz (Abbildung 1.3 C).

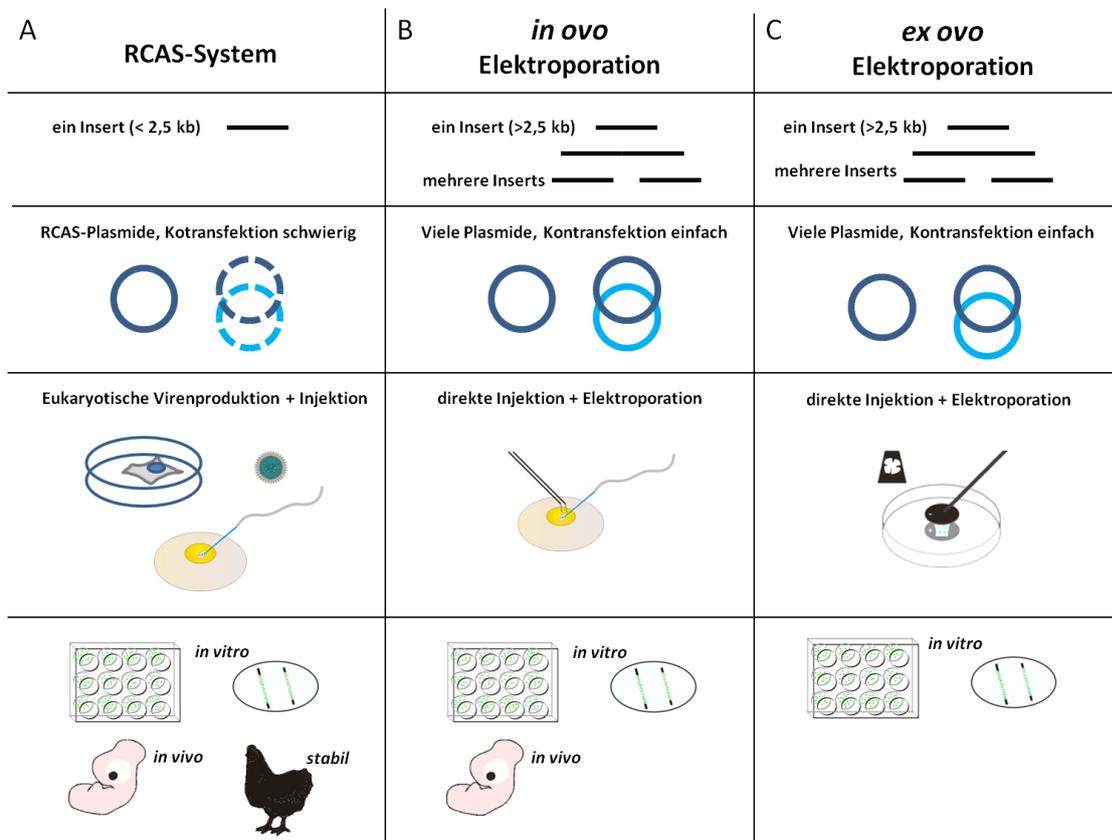
### 1.3 Das Huhn als genetisches Modellsystem

Nicht zuletzt die Sequenzierung des Hühnergenoms und die Bereitstellung zahlreicher Ressourcen zum Hühnergenom, zum Beispiel durch das NIH in einer umfangreichen Datenbank (GenBank, NCBI), macht das Arbeiten mit dem Modellsystem Huhn für Wissenschaftler weltweit attraktiv. Dies, in Verbindung mit den im Vergleich sehr niedrigen Kosten, die das Arbeiten mit Hühnerembryonen verursacht, hat auch zur Weiterentwicklung der Methoden zur genetischen Veränderung des Huhns geführt. Inzwischen sind auch einige wenige stabile Hühnerlinien erhältlich (Han, 2009; Kwon et al., 2011), weitere werden wohl folgen. Meist wird das Huhn aber nach wie vor für transiente genetische Veränderungen verwendet. Für die Expression von rekombinanten Genen und anderen *gain of function* Experimenten haben sich für das Huhn vor allem zwei Methoden durchgesetzt: Das RCAS-System und die Elektroporation (Abbildung 1.4), für *loss of function* Experimente die Morpholino-Technologie und siRNA. Im folgenden Abschnitt werden das RCAS-System und Elektroporations-Techniken beschrieben und miteinander verglichen, wobei besonderes Gewicht auf die experimentell in dieser Dissertation ebenfalls verwendete Elektroporation gelegt wird.

#### 1.3.1 Das RCAS System

Die Abkürzung RCAS steht für die lange englische Bezeichnung dieses Transfektionssystems *Replication-Competent Avian sarcoma-leukosis virus long terminal repeat with a Splice acceptor Vector*. RCAS -Vektoren sind retrovirale Vektoren, die ursprünglich aus dem SR-A-Stamm des Rous Sarcoma Virus (RSV) gewonnen wurden, einem besonderen Mitglied der Avian Sarcoma-

leukosis Virus (ASLV) Familie. Die Besonderheit dieses rekombinanten Retrovirus liegt darin, dass es sich trotz der Aufnahme eines Genes aus einer Wirtszelle weiter in Vogelzellen replizieren kann. Normalerweise verlieren Retroviren durch die Aufnahme eines Fremdgenes virale Gene und damit meistens auch die Fähigkeit, den retroviralen Replikationszyklus zu durchlaufen. RSV jedoch enthält ein komplettes Set viraler Gene und das Fremdgen *src*. Dieses wurde im Labor durch eine ClaI-Schnittstelle ersetzt, über die theoretisch beliebige Sequenzen in den Vektor eingefügt werden können (Hughes und Kosik, 1984; Hughes, 2004). Normalerweise werden die Vektoren danach in Hühnerfibroblasten zum Beispiel über Lipofektion eingebracht und die Viren vermehrt. Diese können nun aus dem Kulturmedium der Fibroblasten isoliert und zum gewünschten Zeitpunkt in proliferierendes Hühnergewebe injiziert werden.



**Abbildung 1.4: Transfektionsmethoden für das Huhn.** Prinzipiell werden für die Transfektion des Huhns, insbesondere der Retina, zwei unterschiedliche Methoden angewandt: retrovirale Transfektion mit dem RCAS-System und Elektroporation. Die Elektroporation kann *in ovo* im lebenden Embryo oder *ex ovo* am explantierten Zielgewebe (hier Retina) stattfinden. **A:** Der größte Vorteil des RCAS-Systems ist, dass auch stabile Transfektion über die Keimbahn möglich ist. Die Einschränkungen bei der Größe des Inserts (maximal 2,5 kb), die Schwierigkeiten bei Verwendung mehrerer Plasmide, sowie die Notwendigkeit der Produktion der Viren in Fibroblastenkulturen vor Transfektion des Zielorganismus limitieren die Anwendung der Methode. **B, C:** Elektroporation hat all diese Nachteile nicht, eignet sich aber nur für transiente Transfektionen. Im Gegensatz zu *in ovo* Elektroporation (B), eignet sich die *ex ovo* Elektroporation (C) nur für *in vitro* Experimente. Eine ausführliche Beschreibung der Methoden ist im Fließtext zu finden.

Die RCAS-Vektoren dringen in die Zellen ein und integrieren in das Wirtsgenom sich teilender Zellen, weshalb sie sich gut zur Langzeitexpression genetischer Konstrukte eignen. Das RCAS-System wurde daher in zahlreichen Studien verwendet, um Hühnerembryonen zu transfizieren, auch im Bereich der Retinaentwicklung (Schulte et al., 1999; Sakuta et al., 2001; Adler und Belecky-Adams, 2002; Esteve et al., 2003) und axonalen Lenkung (Hornberger et al., 1999; Sen et al., 2005), wobei bei Hornberger et al. die transfizierten Retinae auch für das Anlegen retinaler Explantatkulturen verwendet wurden. Doch das RCAS-System weist auch einige Einschränkungen auf. So verhindert das Phänomen der viralen Rezeptorinterferenz auch im Falle der ASLV-Familie die Mehrfachinfektion einer Zelle von Viren der gleichen Untergruppe, weshalb eine Kotransfektion verschiedene Vektortypen für die jeweiligen Konstrukte voraussetzt. Je nach Vektortyp können aber nur bestimmte Hühnerlinien adressiert werden. Dieser Umstand beschränkt Mehrfachtransfektionen mit dem RCAS-System stark. Auch Kontamination der verwendeten Hühner mit natürlichen RCAS-Viren kann eine erfolgreiche Transfektion verhindern. Diese tritt selbst in speziellen für virale Transfektion produzierten, sogenannten SPF-Eiern immer wieder auf. Dies muss zwar nicht immer die Transfektion verhindern, verkompliziert aber die Identifikation transfizierter Zellen über virale Marker (Vergara und Canto-Soler, 2012). Ein weiterer Nachteil ist die Limitierung der Insertgröße auf maximal 2,5 kb (Hughes, 2004). Dies verhindert die Expression größerer Fusionsproteine aber auch bicistronische Expression zweier Gene mit Hilfe einer *internal ribosomal entry site* (IRES). Das RCAS-System (Abbildung 1.4 A) ist also eine geeignete Variante für die stabile Expression einzelner Gene im Huhn und wird permanent erweitert (siehe hierzu <http://home.ncifcrf.gov>). So wurde auch eine stabile GFP-Hühnerlinie mit einer RCAS-Variante generiert (Kwon et al., 2011). Vielleicht werden die bestehenden Nachteile für die Mehrfachexpression und Expression großer Konstrukte in Zukunft überwunden. Bis dahin muss in solchen Fällen auf andere Methoden, wie die Elektroporation, zurückgegriffen werden.

### **1.3.2 Elektroporation**

Während sich das RCAS-System Viren zunutze macht, um die Zellmembran der Zielzelle zu überwinden, geschieht dies im Falle der Elektroporation durch Applikation elektrischer Pulse. Nach wie vor ist nicht vollständig bekannt wie die Elektroporation tatsächlich funktioniert. Es wird aber weitgehend akzeptiert, dass ein mehrstufiger Prozess vorliegt, der die elektrische Destabilisierung der Zellmembran und elektrophoretischen Transport der DNA-Moleküle zur Pluselektrode umfasst (Escoffre et al., 2009). Ob es dabei tatsächlich zur Bildung von Poren in der Zellmembran kommt (Weaver, 1995), oder ob es sich um eine andere Art der lokalen Elektropermeabilisierung der Lipiddoppelschicht, wie zum Beispiel den Flip-Flop von

Phospholipiden (Haest et al., 1997) handelt, bleibt umstritten (Teissie, 2014). Doch auch zellbiologische Vorgänge wie Makropinozytose (Rols et al., 1995) und Elektroendozytose (Antov et al., 2005) scheinen beteiligt zu sein. Neben der Optimierung physikalischer Parameter beschäftigen sich Optimierungsversuche daher auch mit der *endosomal escape*, also damit, den Abbau endozytotisch aufgenommener DNA zu verhindern und ihre Entlassung aus endozytotischen Vesikeln zu forcieren (Douglas, 2008). Obwohl die Theorie der Elektroporation sehr kontrovers diskutiert wird, wird sie experimentell immer weiter optimiert und zeigt sich als effizienter als andere nicht-virale Transfektionsmethoden wie Mikropartikelbombardement, Lipofektion oder Ultraschall, insbesondere *in vivo* (Muramatsu et al., 1997; Kusumanto et al., 2007; De Vry et al., 2010). Die erste *in vivo* Elektroporation im Huhn wurde 1997 von der Gruppe um J. Okumura in Japan berichtet (Muramatsu et al., 1997). Es folgten bald zahlreiche weitere Gruppen, die verschiedene Gewebe im Huhn durch Elektroporation transfizierten. Ein besonders gelungener Übersichtsartikel zur *in vivo* Elektroporation des Zentralnervensystem wurde von der Gruppe J. Prickaerts 2010 veröffentlicht (De Vry et al., 2010), hier ist auch eine tabellarische Auflistung von *in ovo* Elektroporationsexperimenten im Huhn zu finden. Meist werden hierfür die Stadien HH8 bis HH18 (Hamburger und Hamilton, 1951), was ungefähr Embryonaltag 1,5 bis 3 entspricht, verwendet. Die gängige DNA-Konzentration liegt zwischen 0,2 und 2 µg/µl und es werden 3 bis 10 Pulse von 50 ms mit einer Spannung von 12 bis 25 V verabreicht. Hierfür werden Pinzetten-ähnliche oder feine, gebogene Stabelektroden verwendet. Es gibt viele Kombinationen der Parameter innerhalb dieser Bandbreite, wobei auch anzumerken ist, dass das Präparationsgeschick und der Umgang des Experimentators mit Injektionsnadel und Feinelektrode mit der entscheidendste ist. Die *in ovo* Elektroporation (Abbildung 1.4 B) im Huhn ist sehr vielseitig einsetzbar und wird daher auch zunehmend für *loss of function* Experimente mit verschiedenen RNAi Methoden verwendet (Bourikas und Stoeckli, 2003; Andermatt et al., 2014). Zur *in ovo* Elektroporation des Auges gibt es ebenfalls Beispiele (De Vry et al., 2010). Besonders hervorzuheben sind im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation jedoch die Arbeiten der Gruppe um L. Cai (Doh et al., 2010; Islam et al., 2012), die sich explizit mit der Elektroporation der embryonalen Retina befassen. Hierfür werden ältere Stadien HH22-23 (E4) verwendet und die hochkonzentrierte GFP-Reporterplasmid-Lösung (3 bis 6 µg/µl) direkt in den subretinalen Spalt injiziert. Nach Applikation von 5 Pulsen von 15 V und 50 ms Dauer wird das Ei bis E7 weiter inkubiert. Antikörperfärbungen gegen Brn3a zeigen, dass auch retinale Ganglienzellen erfolgreich transfiziert werden. Eine Kombination dieser Methode mit Explantatkulturen ist bisher nicht publiziert. Ein anderer Ansatz zur Transfektion der Retina ist es, die Retina im gewünschten Stadium zu explantieren und anschließend zu elektroporieren. In einigen Studien wird die Retina (E7) vor der Elektroporation dissoziiert und die retinalen Zellen werden daraufhin in einer Küvette elektroporiert und anschließend kultiviert (Carvalho et al., 2006; Marler et al., 2008; Poopalasundaram et al., 2011). Hierbei erhält man Mischkulturen aller retinalen Zellen. Die

morphologische Identifikation der retinalen Ganglienzellen gestaltet sich schwer, da die dafür normalerweise genutzten besonders langen Axone in dieser Kulturart deutlich kürzer sind. Auch die topographische Identität ist nicht in gleichem Maße nachvollziehbar, wie in der Kultur von Gewebestreifen entlang einer definierten Achse. Zwar sind auch hier retinale Ganglienzellen anhand von immunhistochemischen Markern identifizierbar, deutliche Effekte bezüglich der axonalen Lenkung wie im Streifenassay mit Explantatkulturen bleiben jedoch aus. Dies ist besonders gut im direkten Vergleich der Streifenassays von RCAS-transfizierten Explantatkulturen (Hornberger et al., 1999) und dissoziierten elektroporierten Zellen zu erkennen (Poopalasundaram et al., 2011). Ein Ausweg aus dem Dilemma zwischen einfacherer Handhabung und Vielseitigkeit der Elektroporation auf der einen und der mangelnden topographischen Integrität des Zellkultursystems auf der anderen Seite, ist die *whole mount* oder *ex ovo* Elektroporation (Abbildung 1.4 C) embryonaler Retina (Yuasa-Kawada et al., 2003; Shintani et al., 2006; Shintani et al., 2009). Hier wird die Retina (E6) explantiert auf einer Membran ausgebreitet und anschließend elektroporiert. Hierzu werden Plattenelektroden verwendet und 15 Pulse von 50 ms Dauer und 15 V appliziert. Die Konzentration des GFP-Kontrollplasmids beträgt hier 0,1 µg/µl. Danach können Explantatkulturen angelegt werden ohne die Zellen zu vereinzeln. Sowohl *knock down* mit shRNA als auch Überexpression ist mit anschließender Verwendung der Explantatkulturen im Streifenassay kompatibel (Shintani et al., 2006). Obwohl Morphologie der Axone und Flexibilität der Methode vielversprechend sind, findet man keine exakten Angaben zur Effizienz der Methode. Größere quantifizierbare Datensätze sind mit dieser Methode nicht beschrieben. Die Quantifizierungen beziehen sich entweder auf viele Axone aus einem einzigen Experiment oder der Analyse von wenigen einzelnen Axonen (Yuasa-Kawada et al., 2003; Shintani et al., 2006; Shintani et al., 2009) aus mehreren Experimenten. Für die Verwendung der gängigen Transfektionsmethoden in Kombination mit dem *in vitro* System der retinalen Explantatkultur ist daher noch viel Platz für Optimierung. Einen Beitrag dazu leistet die vorliegende Dissertation.

#### **1.4 Zusammenfassung und Zielsetzung**

Topographische Projektionen sind ein grundlegendes Prinzip der neuronalen Verschaltung. Ein Paradebeispiel hierfür ist die Verknüpfung der Retina mit dem optischen Tektum im Huhn. Hier bildet das Rezeptor-Liganden-Paar EphA und ephrin-A sowohl entlang der TN-Achse der Retina, als auch entlang der AP-Achse im Tektum Gegengradienten. Die komplexe Signaltransduktion, die *forward* und *reverse signaling* umfasst, aber auch Adaptationsmechanismen des Eph/ephrin-Systems sind dabei von der Oberflächendynamik dieser Lenkungsmoleküle im retinalen Wachstumskegel abhängig. Zur Untersuchung dieser Dynamik sollen rekombinante Fusionsproteine aus EphA3 beziehungsweise ephrin-A5 und einer modifizierten O-6-Alkylguaninalkyltransferase (O-6-AGT oder auch SNAP-Tag) eingesetzt werden. Mit Hilfe des SNAP-Tags kann man, durch die Verwendung verschiedener Fluorophor-gekoppelter Substrate, zwischen intra- und extrazellulärem Protein unterscheiden und somit auch endozytische Prozesse beobachten, deren Beteiligung an der Adaptation und Signaltransduktion wahrscheinlich ist. Für die Expression dieser rekombinanten Sensoren in retinalen Ganglienzellen muss dafür zuerst die Methode der Elektroporation für die Verwendung mit Explantatkulturen embryonaler Hühnerretinae optimiert werden.

#### **Die Ziele dieser Arbeit sind daher:**

- 1.) Verbesserung der bestehenden Methoden der Elektroporation retinaler ganglienzellen des Huhns, und Kombination mit dem *in vitro* System der retinalen Explantatkultur.
- 2.) Herstellung und Klonierung von rekombinanten Varianten der axonalen Lenkungsmoleküle ephrin-A5 beziehungsweise EphA3, die einen N-terminalen SNAP-Tag tragen und Nachweis ihrer Funktionalität in Zellkultur.
- 3.) Die Expression von SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 in retinalen Ganglienzellen und Untersuchung ihrer Dynamik im retinalen Wachstumskegel während des *forward* und *reverse signaling*.

## 2. Material und Methoden

Für eine Reproduktion der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse werden neben den im Folgenden gesondert aufgelisteten oder im Text erwähnten Materialien und Geräten ein molekularbiologisches S1-Labor, ein Zellkulturlabor und Zugang zu Standardchemikalien benötigt. Falls nicht anders vermerkt, wurden Standardchemikalien von der Firma Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen, Enzyme von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Oligonukleotide über Eurofins Scientific (Luxemburg) und Plastikware bei Greiner Bio-One (Frickenhausen) oder Sarstaedt (Nümbrecht). Das Wasser für alle Puffer und Medien wurde mit einem Ionentauscher vollentsalzt und anschließend autoklaviert.

### 2.1 Puffer und Medien

Falls nicht anders vermerkt wurden Zellkulturmedien, Seren und Zusätze der Marke Gibco (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

DMEM	DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )	1x
	FCS: Foetal Bovine Serum (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	10 % v/v
E-Puffer	KCl	120 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	2 mM
	HEPES	25 mM
	Ficoll 400	0,5 %
	pH 7,6	
F12	FCS: Foetal Bovine Serum (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	10 % v/v
	CS: Chicken Serum	2 % v/v
	L- Glutamin	2 mM
	Penicillin / Streptomycin	10 U/ml
	F12-Pulver (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	1x
F12-MZ	F12	1x
	Methylzellulose	0,4 % w/v

## 2. Material und Methoden

---

HBSS ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )	NaCl	8 g/l
	KCl	0,4 g/l
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 mg/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	60 mg/l
	NaHCO <sub>3</sub>	0,35 g/l
	Glucose	1,0 g/l
	HEPES	4,8 g/l
	Phenolrot	10 mg/l
	pH 7,4	
Mowiol-Einbettmittel	2,4 g Mowiol (Merck, Darmstadt)	
	6 g Glycerin	
	6 ml Wasser	
	mindestens 2h bei Raumtemperatur schütteln.	
	+ 12 ml 0,2 M TRIS·HCL (pH 8,5)	
	bei 53 °C schütteln bis alles gelöst ist (2 bis 24h)	
	Zentrifugation bei 5000 rpm 20 Minuten	
	zum Überstand 0,1 % Triethylendiamin	
	aliquotieren	
	Lagerung bei -20 °C	
PBS ( <i>Phosphate buffered saline</i> )	NaCl	8 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,15 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
	pH = 7,4	
TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Acetat (Essigsäure)	20 mM
	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	1 mM

### 2.2 Plasmide

Folgende verwendete Plasmide und Vektoren sind kommerziell erhältlich:

pSNAPtag und pSNAP-ADRβ2 (NEB, Frankfurt), pCR-Blunt II-TOPO (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

Folgende verwendete Plasmide wurden von anderen Arbeitsgruppen hergestellt, kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

pCAGJC-ires-GFP, pCAGJC-dTomato-Par6c und pCAGJC-PKC $\zeta$ -EGFP stammen aus der Arbeitsgruppe von Dr. Joel Levine; Stony Brook, NY, USA (Lee et al., 2013).

pBactEYFP stammt aus der Arbeitsgruppe von Dr. Esther Stöckli; ETH, Zürich (Pekarik et al., 2003).

pFLAG-EphA3 und pGPI-GFP wurden von Dr. Uwe Drescher (King's College, London) zur Verfügung gestellt (Carvalho et al., 2006).

Die folgenden Plasmide wurden selbst hergestellt und kloniert. Hierzu wurden Standardverfahren der Molekularbiologie (Sambrook und Russell, 2001) verwendet. Aufreinigung von DNA erfolgte mit dem entsprechenden Aufreinigungskit der Firma Qiagen (Hilden), Ladepuffer und Marker für Agarosegele stammen von der Firma Peqlab (Erlangen). Für die PCR wurde die Polymerase Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit einem *two step* Protokoll verwendet.

Alle unten beschriebenen Ligationsprodukte wurden in elektrokompente *E. coli* (Stamm XL-1, Stratagene, La Jolla, CA, USA) transformiert. Aus Übernachtskulturen wurde das Plasmid isoliert beziehungsweise Glycerindauerkulturen angelegt. Die Selektion erfolgte mit Ampicillin. Die Sequenzen der isolierten Plasmide wurden durch Restriktionsverdau beziehungsweise Sequenzierung (pSNAP-ephrin-A5, pSNAP-EphA3, pSNAP-ephrin-A5-iG, pSNAP-EphA3-iG) von der Firma LGC Standards in Wesel positiv getestet.

### **pSNAP-ephrin-A5**

Durch oligo(dT) geprimete reverse Transkription (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) von isolierter (TRIZOL-Extraktion) totaler RNA aus Hühnertekten (E7) wurde cDNA gewonnen. Mit den Primer-Linkern **gtcctgcaggCATCCGTCTCCCCGCGATG** (forward) und

**ctggcgccgcTTCTTCGACAGGTTGCTGGAGCA** (reverse) wurde die kodierende Sequenz von ephrin-A5 des Huhns (NCBI Reference Sequence: NM\_205184.2) mittels PCR amplifiziert und der kodierenden Sequenz eine SdaI- (16 bp 5' des Startcodons) und eine NotI-Schnittstelle (27 bp 3' des Stoppcodons) angefügt. Das 753 bp große PCR-Produkt wurde gereinigt, mit SdaI und NotI verdaut und mit dem SdaI/NotI verdauten Vektor pSNAPtag ligiert. In die EcoRV-Schnittstelle des Vektors wurde zuvor, 12 bp 5' der SNAP-Tag-Sequenz, die synthetische phosphorylierte DNA mit der Sequenz

**ATGCCGCACGTGGAGATGCTGCTGCTGGCGGTCGCGGCGCTGTGGGTGTGCGTGCCGCGG**, die für das Signalpeptid des ephrin-A5 kodiert, ligiert.

### **pSNAP-ephrin-A5ΔSignal**

Das Design und die Klonierung erfolgten exakt wie für pSNAP-ephrin-A5. Auf das Einfügen des Signalpeptids wurde jedoch verzichtet.

### **pSNAP-EphA3**

Durch oligo(dT) geprimete reverse Transkription (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) von totaler RNA (TRIZOL-Extraktion) aus Hühnertekten (E7) wurde cDNA gewonnen. Mit den Primer-Linkern **ctcctgcaggCTGCTGCCCCGCCGACATG** (forward)

und **cttgcgccgcCGTGCCGTTTATCAGCCATCGC** (reverse) wurde die kodierende Sequenz von EphA3 (NCBI Reference Sequence: NM\_205430.2) mittels PCR amplifiziert und der kodierenden Sequenz eine SdaI- (16 bp 5' des Startcodons) und eine NotI-Schnittstelle (83 bp 3' des Stoppcodons) angefügt. Das PCR-Produkt wurde auf ein 0,5 % Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Es zeigen sich mehrere Banden. Die 3076 bp Bande wurde ausgeschnitten, gereinigt und in den Vektor pCR-Blunt II-TOPO eingefügt. Das Plasmid wurde aus Übernachtskulturen isoliert, mit SdaI und NotI verdaut, auf ein Gel aufgetragen und das Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die 3056 bp Bande wurde ausgeschnitten, gereinigt und in den SdaI/NotI verdauten, dephosphorylierten Vektor pSNAPtag ligiert. In die EcoRV-Schnittstelle des Vektors wurde zuvor, 12 bp 5' der SNAP-Tag-Sequenz, die phosphorylierte synthetische DNA mit der Sequenz

**ATGGACCGCCGCGCCTGCCGCTGCTGCTGCTCTGCGCTGCCCTCGGCTCCGCCGGG**, die für das Signalpeptid des EphA3 kodiert, ligiert.

### **pSNAP-ephrin-A5-iG**

Durch PCR mit den Primer-Linkern **tgacctcgagTCACTATAGGGAGACCCAAGC** (forward) und **actcccgggCCCTCGCAGACAGCGAATTA** (reverse) wurde die Sequenz von Signalpeptid, SNAP-Tag und ephrin-A5 amplifiziert und die Schnittstellen XbaI und XmaI angefügt. Als Template hierfür diente pSNAP-ephrin-A5. Das PCR Produkt wurde mit XbaI und XmaI verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Bande bei 1462 bp ausgeschnitten und gereinigt. Dieses Insert wurde in den XbaI/XmaI verdauten Vektor pCAGJC-ires-GFP ligiert.

### **pSNAP-EphA3-iG**

Durch PCR mit den Primer-Linkern **tgacctcgagTCACTATAGGGAGACCCAAGC** (forward) und **tactcccgggTCGCAGACAGCGAATTA** (reverse) wurde die Sequenz von Signalpeptid, SNAP-Tag und EphA3 amplifiziert sowie die Schnittstellen XbaI und XmaI angefügt. Als Template hierfür diente pSNAP-EphA3. Das PCR-Produkt wurde mit XbaI und XmaI verdaut,

gelelektrophoretisch aufgetrennt, die Bande bei 3775 bp ausgeschnitten und gereinigt. Dieses Insert wurde in den XbaI/XmaI verdauten Vektor pCAGJC-ires-GFP ligiert.

### **pSNAP-iG**

Durch PCR mit den Primerlinkern tgacctcgagTCACTATAGGGAGACCCAAGC (forward) und tactcccgggTCGCAGACAGCGAATTA (reverse) wurde die Sequenz des SNAP-Tag amplifiziert und die Schnittstellen XbaI und XmaI angefügt. Als Template hierfür diente pSNAPtag. Das 711 bp große PCR-Produkt wurde mit XbaI und XmaI verdaut, gereinigt und in den XbaI/XmaI verdauten Vektor pCAGJC-ires-GFP ligiert.

## **2.3 Zellkultur, Gewebekultur und Präparation**

### **2.3.1 Zellkultur**

Die humane Cervixkarzinom-Zelllinie HeLa (DSMZ Nr. ACC-57) sowie die primären Hühnerfibroblasten (siehe 2.3.2) wurden unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 98 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dreimal wöchentlich erfolgte unter sterilen Bedingungen die Passage der Zellen. Die Handhabung der verschiedenen Zelltypen unterscheidet sich dabei lediglich in der Zusammensetzung der Medien. HeLa Zellen werden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert, primäre Hühnerfibroblasten in F12 Medium mit 10 % FCS und 2 % CS. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen unter Zugabe von 150 µl Trypsin/EDTA und einer 3-5 minütigen Inkubation im Brutschrank abgelöst. Zum Auswaschen der Trypsin/EDTA- Lösung werden die Zellen in 5 ml FCS- haltigem Medium aufgenommen und für 5 min (145 x g, RT) abzentrifugiert. Das dadurch erhaltene Pellet wird in 5 ml serumhaltigem Medium resuspendiert, und die Zellen in den jeweiligen Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:15) auf die bereits mit dem Medium gefüllten Kulturflaschen verteilt. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen der Passagen 5 bis 10 verwendet.

### **2.3.2 Präparation und Kultur primärer Hühnerfibroblasten**

Die Präparation primärer Hühnerfibroblasten (PCF = *primary chicken fibroblasts*) wurde nach einem standardisierten Protokoll (Autenrieth, 2012) durchgeführt. Hierfür werden Hühnerembryonen (E8) in kaltes HBSS überführt und mit einer Pinzette am Untergrund der Petrischale fixiert, während mit einer zweiten Pinzette die Rückenhaut entlang der Wirbelsäule vorsichtig abgezogen wird. Nach Überführen in eine frische Schale mit HBSS wird die Haut nochmals mit HBSS gespült und in eine vorbereitete Petrischale mit F12-Medium (10 % FCS und

2 % CS) überführt. Anschließend werden die Hautstücke mit Hilfe eines Skalpell in kleine Stücke geschnitten und mit einer Pinzette am Boden der Petrischale angedrückt, mechanisch zerkleinert und durch Andrücken am Schalenboden fixiert. Während einer einwöchigen Inkubationsphase wandern die sich teilenden Zellen aus den Hautstücken aus und können anschließend in die Routinezellkultur übernommen werden. Unter Standardbedingungen (siehe 2.3.1) werden die Zellen bis zur Passage 12 kultiviert.

### 2.3.3 Präparation embryonaler Hühnerretina

Befruchtete Eier (*Gallus gallus*, weiße Legehennen, Brüterei Hockenberger, Elsenz) werden bei 18 °C gelagert. Die Entwicklung beginnt erst durch die Inkubation bei 37 °C und 90 % Luftfeuchte im Eierinkubator. Während der Inkubation werden die Eier alle zwei Stunden automatisch gedreht. Nach Erreichen des gewünschten Embryonaltags (E7) werden die Eier geöffnet, der Embryo entnommen und decapitiert. Es folgt eine Retinapräparation nach Walter (Walter et al., 1987). Hierzu wird der Kopf des Embryos in eiskaltes HBSS-Medium überführt und unter dem Binokular ein Auge mit Dumontpinzetten entnommen. Das entnommene Auge wird in frisches, eiskaltes HBSS überführt, von Muskulatur, Bindegewebe und Pigmentschicht befreit sowie Linse und Glaskörper entfernt. Die übrig bleibende, becherförmige Retina wird auf einer Zellulosemischestermembran (ME 25/12, Firma Whatman, Dassel) so ausgebreitet, dass die RGC-Schicht oben liegt, also die Membran den Platz der zuvor entfernten Pigmentschicht einnimmt. Hierzu müssen kleine Entlastungsschnitte an der Retina, entlang und gegenüber der ursprünglich ventral gelegenen optischen Fissur, sowie an der nasalen und temporalen Seite eingefügt werden. Die nun in etwa kleeblattförmige Retina wird mit Hilfe einer Laborpumpe (Laboport, Firma KNF, Freiburg) auf der Membran festgesaugt und mit einem Gewebehacker (Tissue-Chopper, Firma McILWAIN, Goose Green, UK) in 300 µm breite Streifen gehackt. Die Membran wird dabei so ausgerichtet, dass die gehackten Membranstreifen an ihren Enden noch mit der übrigen Membran verbunden bleiben und die auf ihr befindliche Retina parallel zur temporal-nasal-Achse in Streifen geschnitten wird. Nun kann entweder die Elektroporation (siehe 2.4.4) erfolgen, oder die gehackte Membran mit der Retina wird wieder in HBSS überführt. Danach werden die Membranstreifen mit einem Skalpell von der übrigen Membran getrennt. So erhält man 2 cm lange und 300 µm breite Membranstreifen auf denen jeweils ein 300 µm breiter und circa 1,2 mm langer Retinastreifen aufgesaugt ist. Anschließend werden die Streifenpräparate auf beschichtete Deckgläser (siehe 2.5) überführt, mit Metallklötzchen an den Membranenden ohne retinales Gewebe beschwert und mit sterilem F12-MZ überschichtet. Die Streifenpräparate werden so aufgelegt, dass die gesamte Oberfläche des Retinastreifens (also die RGC-Schicht) auf dem Substrat liegt. Die ursprüngliche Position der Retinastreifen in der Retina sowie ihre Lage

auf dem Deckglas werden dokumentiert und die überschichteten Deckgläser mit den Streifenpräparaten in je einer Petrischale bei 37 °C für 48 h inkubiert.

## **2.4 Lipofektion und Elektroporation**

Es wurden verschiedene Methoden verwendet, um Plasmid-DNA transient in Vertebratenzellen zu exprimieren. Für humane Cervixkarzinomzellen des Typs HeLa wurde eine chemische Methode verwendet. Diese beruht auf der Bildung von Komplexen aus der negative geladenen Plasmid-DNA und kationischen Lipiden (Liposomen). Die Liposomen können mit der Zellmembran fusionieren und die DNA in das Zytosol entlassen. Während der nächsten Zellteilung gerät die Plasmid-DNA in den Kern und kann nun von der Transkriptionsmaschinerie der Zelle abgelesen werden. Die Transfektion der Hühnerfibroblasten und retinalen Ganglienzellen erfolgte durch verschiedene Varianten der Elektroporation.

### **2.4.1 Lipofektion von humanen Cervixkarzinomzellen der HeLa-Linie**

Die Transfektion mit Lipofectamine2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) erfolgte nach Angaben des Herstellers. HeLa-Zellen werden in einer Standard 6-Well-Platte bis 90 % Konfluenz kultiviert. Alle nachfolgenden Angaben beziehen sich auf ein Well dieser Platte. Das Medium wird vor der Transfektion durch 1,5 ml Opti-MEM ersetzt. 5 µl Lipofectamine werden in 250 µl Opti-MEM pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen werden 5 µg Plasmid-DNA in 250 µl Opti-MEM gegeben und anschließend zur 250 µl Lipofectamine-Emulsion gegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die 500 µl Plasmid-Lipofectamine-Gemisch zu den 1,5 ml Medium gegeben und die Zellen über Nacht kultiviert. Vor Verwendung für weitere Versuche wurden die Zellen trypsiniert und 2 h in frischem DMEM mit 10 % FCS auf Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) beschichteten Deckgläsern kultiviert.

### **2.4.2 Elektroporation primärer Hühnerfibroblasten**

Eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit zu 90 % konfluenten PCFs (2.3.2) wird zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen wie in 2.3.1 trypsiniert und in 10 ml F12 (10 % FCS, 2 % CS) aufgenommen. Es folgt eine Zentrifugation für 3 min bei 300 x g. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 500 µl eiskaltem E-Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut in eiskaltem 500 µl E-Puffer resuspendiert. 250 µl Zellsuspension werden in eine eiskalte Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand)

überführt, 5 µg der gewünschten Plasmid-DNA hinzugefügt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgt die Elektroporation (exponentiell, 250 V, 900 µF, Biorad E. Coli Pulser Fuse Typ I). Nach einer kurzen Ruhephase auf Eis werden die Zellen in das Kulturmedium aufgenommen und in einer 6-Well Platte ausgesät. Nach 12 h werden die Zellen für weitere Versuche verwendet.

### **2.4.3 *In ovo* Elektroporation embryonaler Retina des Huhns**

Es wurde eine bereits publizierte Methode (Doh et al., 2010; Islam et al., 2012) leicht modifiziert. Der prinzipielle Ablauf der Methode ist im Ergebnisteil (Abbildung 3.3) dargestellt. Befruchtete Hühnereier werden drei Tage bei 37,5 °C und 70 bis 100 % Luftfeuchte inkubiert. Mit einem Diamantmesser und einer Präparationsschere wird ein circa 3 cm langes und 2 cm breites ovales Fenster in die Oberseite des Eis geschnitten. Durch Serosa und Amnion ist der Dotter zu erkennen. Auf diesem liegt der Embryo. Serosa und Amnion werden eröffnet, um den Embryo zugänglich zu machen. Eine feine Injektionskapillare (angefertigt aus Ringcabs 10 µl, Firma Hirschmann, Eberstadt mit einem Vertical Pipette Puller 700C, David Kopf Instruments, CA, USA) wird mit 3 µl 0,5 bis 2 µg/µl Plasmid DNA in PBS und 0,25 % Trypanblau (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) befüllt. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wird unter dem Binokular die Injektionskapillare in einem Winkel von circa 45° durch den gewünschten Bereich der Retina bis in den Vitreus gestochen. Nun wird die Kapillare langsam herausgezogen und gleichzeitig vorsichtig die DNA-Lösung injiziert. Sobald sich eine lokale Blaufärbung der Retina ausmachen lässt, ist der retinale Spalt erreicht und weitere 2 µl der DNA-Lösung werden injiziert. Die Kapillare wird entfernt und der Embryo mit 500 ml sterilem PBS überschichtet. Die Stabelektroden (Platin, 5 mm lang, 1 mm Durchmesser, angefertigt im Institut für Technik der Informationsverarbeitung, KIT) werden so am Auge positioniert, dass die Negativelektrode auf der Seite der Injektionsstelle und die Positivelektrode gegenüber liegt. Die Elektroden dürfen weder Herz, noch große Blutgefäße berühren. Es werden fünf 50 ms Pulse im Abstand von 950 ms mit 18 V Spannung (Elektroporator: Square Pulser CUY21, Nepagene-XCeltis, Mannheim) appliziert. Danach wird die Schale des Eis mit durchsichtigem Klebeband sorgfältig verschlossen und bis E7 bei 37,5 °C und 70 bis 100 % Luftfeuchte inkubiert. Der Embryo kann nun entnommen und die Retina für Zellkultur oder Explantatkultur aufbereitet werden.

### **2.4.4 *Ex ovo* Elektroporation embryonaler Retina des Huhns**

Es wurde eine publizierte Methode (Yuasa-Kawada et al., 2003; Shintani et al., 2009) modifiziert. Der prinzipielle Ablauf ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Befruchtete Hühnereier werden 7 Tage

inkubiert und der Embryo entnommen. Die Retina wird wie in 2.3.3 beschrieben präpariert und auf eine Membran gesaugt. Nun wird die Retina entweder direkt elektroporiert (siehe 3.1) oder die Retina wie folgt vorbehandelt (siehe 3.4). In die Retina und die darunterliegende Membran werden parallel zur nasal-temporal-Achse mit einem Gewebehacker 300 µm breite Streifen gehackt. Danach folgt eine Behandlung mit vorgekühlter Accutase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für 5 min bei Raumtemperatur. Die Retina wird nun auf die Positivelektrode (CUY700P20 Plattenelektrode, Nepagene-XCeltis, Mannheim) gelegt und mit 50 µl einer eiskalten 500 ng/µl Plasmid-DNA-PBS-Lösung überschichtet. Die Negativelektrode wird im Abstand von 3 mm darüber positioniert. Die DNA-Lösung bildet nun eine Flüssigkeitssäule zwischen den Elektroden, dazwischen befindet sich die Retina auf der Membran. Es werden fünf 50 ms Pulse im Abstand von 950 ms mit 18 V Spannung appliziert. Die Retina wird in kaltes HBSS überführt. Falls keine Vorbehandlung erfolgte, wird die Retina nun in 300 µm breite Streifen gehackt. Die Explantatstreifen können nun kultiviert werden.

### 2.5 Beschichtung der Deckgläser

Für die Beschichtung wurden folgende Polyaminosäuren und Proteine verwendet:

PLL: Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

EphA3-Fc: human recombinant EphA3-Fc (R&D Systems, NE, Minneapolis, USA)

ephrin-A5-Fc: human recombinant ephrin-A5 (R&D Systems, NE, Minneapolis, USA)

Fc: human IgG Fc-Fragment (Merck, Darmstadt)

Laminin: natural mouse Laminin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

FN: Fibronectin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

NG2: Hergestellt und zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Dr. Joel Levine (Stony Brook, NY, USA) wie beschrieben (Ughrin et al., 2003).

#### 2.5.1 Reinigung und PLL-Beschichtung

Deckgläser (rund, 18 mm Durchmesser, Firma VWR, Radnor, PA, USA) werden in 50 % Ethanol im Ultraschallbad für 15 min gereinigt. Es folgt eine Inkubation über Nacht in 1:1 Ethanol:Aceton. Anschließend wird dreimal mit Ethanol gespült und die Deckgläser bei 200 °C für 3 h gebacken. Nun folgt die Proteinbeschichtung mit 75 µl 100 µg/ml PLL in PBS zwischen je zwei Deckgläsern über Nacht. Danach werden die Deckgläser mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet.

### 2.5.2 Homogene Protein-Beschichtung

Das jeweilige Protein wird in HBSS gelöst (15 µg/ml EphA3-Fc, 10 µg/ml ephrin-A5-Fc oder 10 µg/ml Fc), auf ein gereinigtes PLL beschichtetes Deckglas gegeben und ein zweites Deckglas aufgelegt (Sandwich-Beschichtung). Es folgt eine Inkubation bei 37 °C für 2 h. Anschließend werden die Deckgläser mit HBSS aufgeschwemmt, mit der unbeschichteten Seite auf die Innenseite eines Petrischalendeckels gelegt und zweimal mit je 500 µl HBSS gewaschen. Nun erfolgt die gleiche Prozedur mit 20 µg/ml Laminin. Die Deckgläser werden einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt oder gleich verwendet. Vor Auflegen der Explantatstreifen werden die Proteinsubstrate mit F12 überschichtet und 20 min im Brutschrank inkubiert. Die FN-Beschichtung erfolgt ebenfalls durch Sandwich-Beschichtung (10 µg/µl) aber ohne zusätzliche Laminin-Beschichtung.

### 2.6 Streifenassay

Die Streifenassays mit EphA3, ephrin-A5, Fc und NG2 (Vielmetter et al., 1990; Gebhardt et al., 2012; Lee et al., 2013) wurden wie bereits genau beschrieben (Weschenfelder et al., 2013) durchgeführt. Das zu testende Protein wird in entsprechender Konzentration (20 µg/ml EphA3-Fc, 10 µg/ml ephrin-A5, 20 µg/ml Fc, 20 µg/ml NG2) in HBSS gelöst. Zur späteren Identifikation werden 2 µg/ml Sekundärantikörper (Anti human IgG goat IgG Alexa 594, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) beigemischt. Eine Silikonmatrize (Eigenproduktion, AG Bastmeyer, Zoologie, KIT) wird so auf ein gereinigtes, mit PLL beschichtetes Deckglas gelegt, dass dieses die 40 µm beziehungsweise 90 µm breiten Kanäle in der Silikonmatrize verschließt. Die Proteinlösung wird in die Kanäle gefüllt und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Die Proteine adsorbieren nun aus der Lösung an die PLL-Oberfläche. Nach Entfernen der Matrize und dreimaligem Waschen des Streifensubstrates mit HBSS, wird es mit 20 µg/ml Laminin überschichtet, nach 1 h im Brutschrank dreimal mit HBSS gewaschen und vor Verwendung für 20 min mit F12 überschichtet im Brutschrank inkubiert. Streifenexplantate (siehe 2.3.3) werden orthogonal zu den Proteinstreifen aufgelegt, mit Metallklötzchen beschwert, mit 37 °C warmen F12-MZ überschichtet und 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgen die jeweiligen Färbungen.

## 2.7 Zellfärbungen und Immunhistochemie

### 2.7.1 SNAP-Färbungen

Als Substrat für den SNAP-Tag, der eine modifizierte O-6-AGT ist, dienen Benzyl-Guanine (BG) und Benzyl-Chloro-Pyrimidine (BP) die an Fluorophore (ATTO, Alexa-Fluor, Dyomics-Fluorophoren, Tetramethylrhodamin (TMR), Aminomethylcoumarin (AMCA)) gekoppelt sind. Die folgenden kommerziell erhältlichen Varianten (NEB, Frankfurt) wurden in dieser Arbeit verwendet:

BG-ATTO488: SNAP-Surface Fluor 488

BG-Alexa488: SNAP-Surface Alexa Fluor 488

BG-Alexa647: SNAP-Surface Alexa Fluor 647

BG-ATTO594: SNAP-Surface 594

BG-Dy549: SNAP-Surface 549

BP-TMR: SNAP-Cell-TMR-Star

BP-AMCA: SNAP-Cell-360

### SNAP-Färbung von Zellen des Typs HeLa und PCF

Für Färbungen von Zellen des Typs HeLa und PCF werden diese wie in 2.3 beschrieben kultiviert, mit 37 °C warmen Zellkulturmedium gewaschen und anschließend die unfixierten, lebenden Zellen gefärbt. Durch serielles Färben mit einem BG-Fluorophor und einem BP-Fluorophor ist es möglich, verschiedene Subpopulationen des SNAP-Proteins zu färben. Zunächst binden die BG-Fluorophore an die SNAP-Proteine an der Zelloberfläche, anschließend die BP-Fluorophore an alle anderen SNAP-Proteine in der Zelle. Da die gesamte Färbung über eine Stunde dauert und an der lebenden Zelle durchgeführt wird, können auf Grund von Endo- und Exozytoseprozessen die Färbungen überlappen (siehe Teil 3.3).

Für eine Färbung der SNAP-Proteine an der Zelloberfläche wird das Medium durch 400 µl Medium, das 1 µl 1 nmol/µl BG-Fluorophor in DMSO und Serum enthält, ersetzt. Es folgt eine Inkubation für 30 min im Brutschrank, danach wird zweimal mit Medium gewaschen. Die SNAP-Proteine sind nun kovalent markiert und die Zellen können für weitere Färbungen oder Experimente verwendet werden.

Für eine Färbung aller SNAP-Proteine wird das Medium durch 400 µl Medium, das 1 µl 1 nmol/µl BP-Fluorophor in DMSO enthält, ersetzt. Es folgt eine Inkubation für 30 min im Brutschrank, danach wird dreimal mit Medium gewaschen. Die SNAP-Proteine sind nun kovalent markiert und die Zellen können für weitere Färbungen oder Experimente verwendet werden.

### **SNAP-Färbung von RGCs**

Für Färbungen von RGCs werden diese wie in 2.4.4 beschrieben präpariert und transfiziert und auf entsprechenden Substraten (siehe 2.5) kultiviert. Die folgende Färbeprozedur ist schematisch in Abbildung 3.17 dargestellt. Die Zellen werden mit 37 °C warmen Kulturmedium gewaschen und das Medium durch 400 µl Medium, das 1 µl 1 nmol/µl BG-Alexa488 in DMSO enthält, ersetzt. Es folgt eine Inkubation für 35 min im Brutschrank und zwei Waschrinne mit Medium. Die Explantatkulturen werden mit 4 % PFA und 0,15 % Glutaraldehyd in 0,33 M Saccharose in PBS für 15 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgt eine Behandlung mit NaBH<sub>4</sub>. Hierzu wird eine Spatelspitze NaBH<sub>4</sub> in 5 ml PBS gerührt und 2 min gelöst. Es kann die Bildung von Bläschen beobachtet werden. Die Explantatkulturen werden 5 min mit der NaBH<sub>4</sub>-Lösung behandelt, dann wird diese durch frisch angesetzte NaBH<sub>4</sub>-Lösung ersetzt, nochmals 5 min inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Es folgt eine Antikörperfärbung gegen das Fluorophor Alexa488. Der Primärantikörper (Anti-Alexa Fluor488 Rabbit IgG, Firma Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) wird 1:200 in 1 % BSA verdünnt und 100 µl auf ein Deckglas mit Explantatstreifen gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und dreimaligem Waschen mit PBS wird der Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG Goat IgG Alexa Fluor647, Firma Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) 1:200 in 1 % BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Explantate in Mowiol eingebettet.

Für die gleichzeitige immunhistochemische Färbung des Rab4, wurde ein Antikörper gegen Rab4 (Mouse anti-Rab4, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) 1:50 zusammen mit dem Primärantikörper und ein Antikörper gegen Maus-IgG (Goat anti-mouse IgG-Cy3, Dianova, Hamburg) 1:200 zusammen mit dem Sekundärantikörper verwendet.

### **2.7.2 Färbungen des Zytoskeletts**

#### **Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts**

Zellen werden wie in 2.3 beschrieben kultiviert. Nach Fixierung mit 4 % PFA in 0,33 M Saccharose in PBS und dreimaligem Waschen mit PBS folgt eine einstündige Inkubation mit Phalloidin-Alexa488/Alexa568/Alexa647 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 1:200 in 1 % BSA. RGCs werden mit 4 % PFA, 0,15 % Glutaraldehyd in 0,33 M Saccharose in PBS fixiert und das Phalloidin 1:100 verdünnt. Bei gleichzeitigen Antikörperfärbungen wird Phalloidin mit dem Sekundärantikörper auf die Zellen gegeben. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in Mowiol eingebettet.

### **Immunhistochemische Färbung des Tubulinzytoskeletts**

Für eine Tubulinfärbung werden RGCs (2.3) mit 4 % PFA, 0,15 % Glutaraldehyd in 0,33 M Saccharose in PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die einstündige Inkubation mit dem Primärantikörper (anti  $\beta$ III-Tubulin rabbit IgG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:300 in 1 % BSA. Es folgt dreimal Waschen mit PBS und eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (goat anti rabbit AMCA, Dianova, Hamburg) 1:200 in 1 % BSA. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Deckgläser mit den gefärbten Zellen in Mowiol eingebettet.

#### **2.7.3 Affinitäts-Sonden**

Um Affinitätssonden gegen ephrin-A5 beziehungsweise EphA3 herzustellen, werden 2  $\mu$ g/ml EphA3-Fc beziehungsweise ephrin-A5-Fc mit 2  $\mu$ g/ml anti-Fc-Antikörper (Anti human IgG goat IgG Alexa 594, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) für 30 min bei Raumtemperatur in HBSS präinkubiert. Die Suspension wird bei 5000 x g abzentrifugiert und der Überstand mit einer Endkonzentration von 100 ng/ml (bezüglich des Proteins) zu den Zellen gegeben. Es folgt eine Inkubation für 5 bis 30 min. Danach werden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und mit 4 % PFA in 0,33M Saccharose in PBS für 15 min fixiert. Es folgt eine Kernfärbung mit DAPI (1:3000) für 30 min. Nach dreimaligem Waschen werden die Deckgläser mit den gefärbten Zellen in Mowiol eingebettet.

#### **2.8 EphA3-Aggregationsassay**

Primäre Hühnerfibroblasten werden wie in 2.3.2 beschrieben kultiviert und transfiziert, 30 min mit BG-ATTO488 gefärbt (siehe 2.7.1) und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgt eine Inkubation für 5; 10; 15 min mit der Affinitätssonde gegen EphA3 (siehe 2.7.3) oder mit einer auf die gleiche Weise hergestellter Fc-Kontrolle. Danach werden die Zellen dreimal mit Medium gewaschen und mit 4 %PFA in 0,33M Saccharose in PBS für 15 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen werden die Deckgläser mit den gefärbten Zellen in Mowiol eingebettet und mit SIM ausgewertet.

#### **2.9 PI-PLC Behandlung**

Mit pSNAP-ephrin-A5 transfizierte PCFs werden wie in 2.3.2 beschrieben kultiviert, 30 min mit BG-ATTO488 gefärbt (siehe 2.7.1), mit PBS gewaschen und anschließend 30 min mit 0,3 U/ml

PI-PLC (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in F12-Medium ohne Serum im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgt die Fixierung mit 4 % PFA in 0,33 M Saccharose in PBS für 15 min. Es folgt eine Kernfärbung mit DAPI (1:3000) für 30 min. Nach dreimaligem Waschen werden die Deckgläser mit den gefärbten Zellen in Mowiol eingebettet.

### **2.10 Mikroskopie und Bildauswertung**

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axioimager Z1 mit CCD Kamera (Zeiss) und Apotome-Modus, für SIM (structured illumination microscopy) Aufnahmen ein Prototyp der Elyra PS.1 Serie mit Andor iXON 897 EM CCD Kamera (Zeiss) verwendet. Als Aufnahme- und Bearbeitungssoftware diente Axiovision 4.8 und ZEN2012\_blue von Zeiss sowie das Java-basierte Freeware Programm ImageJ.

#### **Bildauswertung: NG2-Streifenassays**

Nach Färbung der Deckgläser mit den Streifenmustern und Retinaexplantatstreifen (siehe 2.6) mit Phalloidin-Alexa488 (siehe 2.7.2) folgen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Die Bilder werden im TIF-Format in ImageJ importiert. Mithilfe des Plugins JACoP werden in den jeweiligen Farbkanälen Intensitäts-Schwellenwerte festgelegt und der Anteil Phalloidin-gefärbter Axone ausgemessen, der mit den Alexa Fluor594-markierten NG2-Streifen überlappt.

#### **Bildauswertung: Bestimmung der Oberflächenkonzentration von SNAP-ephrin-A5**

Es werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den gefärbten Wachstumskegeln (siehe 2.7.1) angefertigt, mit ImageJ in 8-Bit Bilder umgewandelt und ausgewertet. Die Fläche des Wachstumskegels wird manuell an Hand der EGFP Färbung umrandet. Es werden *mean intensity*, *integrated density* und *area* im Menüpunkt *set measurements* angewählt und durch den Befehl *measure* mittlere Intensität, integrierte Dichte und Fläche der umrandeten Fläche ermittelt.

#### **Bildauswertung: EphA3-Aggregation**

Die Aufnahmen zur Auswertung der EphA3-Aggregate in primären Hühnerfibroblasten (siehe 2.8) erfolgten mit *Structured Illumination Microscopy* (SIM). Die so entstandenen Aufnahmen wurden zu 8-Bit TIFFs konvertiert und in ImageJ mit dem Plug-In *particel measurements* analysiert. Hierzu wurde ein Schwellenwert so gesetzt, dass vereinzelte Pixel des Hintergrundsignals außerhalb der Zelle zu erkennen waren. Anschließend wurde das Bild binärisiert. Nun wurde manuell ein 500 x 500 Pixel-Fenster im Bereich der Zellfläche festgelegt und mit dem erwähnten Plug-In die Anzahl und Größe der Partikel bestimmt.

#### **Bildauswertung: PI-PLC Behandlung**

Es wurden konventionelle Fluoreszenzaufnahmen ohne Apotome-Modus angefertigt und mit ImageJ in 8-Bit Bilder konvertiert und ausgewertet. Es wird *mean intensity* im Menüpunkt *set measurements* angewählt und durch den Befehl *measure* die Fluoreszenzintensität des Signals im grünen Fluoreszenzkanal gemessen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Test der *ex ovo* Elektroporation: Koexpression der Par-Komplex-Komponenten Par6 und PKC $\zeta$ im retinalen System.

Dieser Teil der Arbeit beschreibt die Ergebnisse, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Joel Levine (Stony Brook, NY, USA) entstanden sind. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit steht die Erprobung der *ex ovo* Elektroporation im Vordergrund. Hierfür wurden Versuche mit dem Chondroitinsulfat-Proteoglycan (CSPG) NG2 durchgeführt, das eine Rolle bei der Bildung der Glianarbe nach Verletzungen des Rückenmarks inne hat.

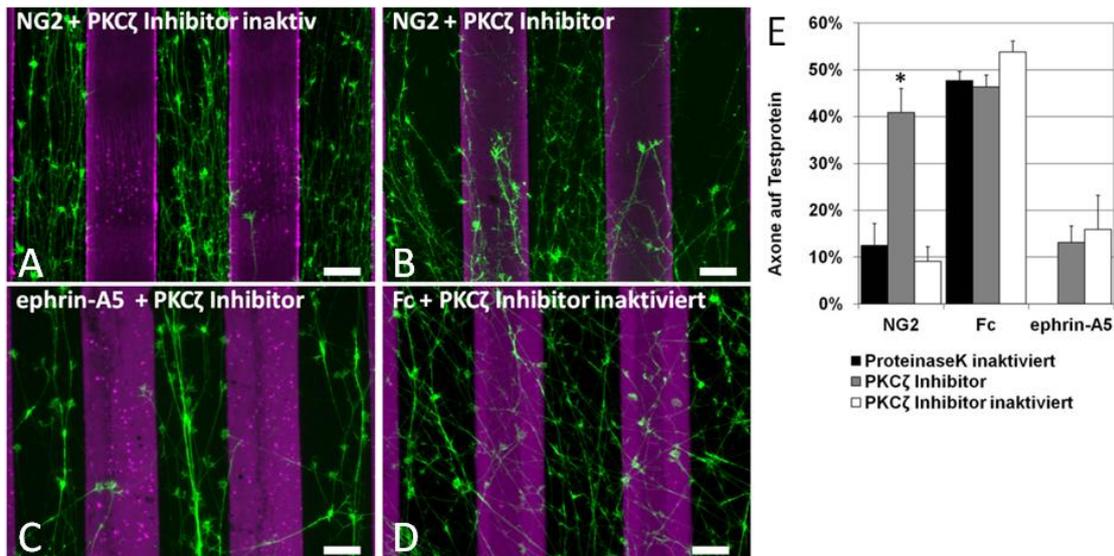
Hintergrund für diese Studie liefert das Phänomen, dass verletzte Axone des Zentralnervensystems bei höheren Vertebraten nicht regenerieren. Grund hierfür ist die Expression repulsiver beziehungsweise Wachstum-inhibierender Substanzen durch Oligodendrozyten, Astrozyten, einwandernde Fibroblasten und NG2-Gliazellen im Bereich der Läsion. Neben den beteiligten repulsiven Lenkungsmolekülen Semaphorin, ephrin, Nogo und MAG, spielen CSPGs hierbei eine herausragende Rolle. Vor allem Neurocan, Brevican, Tenascin, Phosphacan und NG2 sind beteiligt (Sandvig et al., 2004). Das transmembrane CSPG NG2 wird unter anderem von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Levine und Nishiyama, 1996) und Gliazellen (Butt et al., 2002) exprimiert, wird nach proteolytischer Spaltung aber auch in die extrazelluläre Matrix sezerniert (Nishiyama et al., 1991). Letzteres ist vor allem fünf bis sieben Tage nach einer Verletzung, während der Bildung der Glianarbe zu beobachten (Jones et al., 2002). Auch wenn es mehrere Belege für eine repulsive und wachstumshemmende Wirkung des NG2 *in vitro* (Dou und Levine, 1994; Tan et al., 2006) gibt, blieb die Suche nach einem Rezeptor und den zellulären Mechanismen bisher erfolglos. Außerdem ist nach wie vor unklar, wie NG2 mit bereits besser erforschten Regulationsmechanismen der Axogenese und Wachstumskegelbildung verknüpft ist. Eine Schlüsselrolle bei diesen Regulationsmechanismen nimmt der Polaritätskomplex (Par-Komplex) ein. Dieser ternäre Komplex aus Par3, Par6 und atypischer PKC $\zeta$  reguliert im Wechselspiel mit Cdc42 und Rac1 das Zytoskelett und legt somit unter anderem auch fest, welches Neurit eines Neurons den Wachstumskegel bildet (Arimura und Kaibuchi, 2007; Bradke et al., 2012). Die Studie der Levine-Arbeitsgruppe, in die ich ebenfalls eingebunden war, widmete sich daher der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen NG2-vermittelter Signaltransduktion und der Par-Komplex-vermittelten Regulation axonalen Wachstums (Lee et al., 2013).

Im Rahmen der Dissertation wurden hierfür Versuche mit NG2 an transfizierten und untransfizierten retinalen Explantatkulturen durchgeführt und an diesem Beispiel eine bereits

publizierte *ex ovo* Elektroporationsmethode (Yuasa-Kawada et al., 2003; Shintani et al., 2009) getestet. Das retinale *in vitro*-System schien geeignet, da NG2 auch im optischen Nerv exprimiert wird (Butt et al., 2004). Expressionskonstrukte, die für die Expression in Rattenneuronen des zentralen Nervensystems konstruiert wurden, konnten auch in retinalen Ganglienzellen funktionell exprimiert werden. Der dabei verwendete Fusionspromotor aus CMV-Enhancer-Element und  $\beta$ -Aktin-Promotor erwies sich als sehr effizient. Die verwendeten Vektoren dienen daher auch als Grundlage für die neuronale Expression von SNAP-ephrin-A5 in Teil 3.4 der Dissertation. Die Elektroporationsmethode funktionierte zwar, zeigte aber deutlichen Optimierungsbedarf. Vor allem auf Grund der geringen Effizienz, also der Anzahl transfizierter Wachstumskegel pro transfizierter Retina, war eine quantitative Auswertung problematisch. Teile der hier gezeigten Ergebnisse (Abbildung 3.1) wurden zusammen mit den Daten der Kooperationspartner bereits veröffentlicht (Lee et al., 2013). Die Daten zur erfolgreichen Expression von Par6c und PKC $\zeta$  in retinalen Ganglienzellen werden in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt (Abbildung 3.2).

### **3.1.1 Die atypische Protein Kinase C zeta wird für die Vermittlung der repulsiven Wirkung des Proteoglycans NG2 auf Axone retinaler Ganglienzellen benötigt.**

Um die Sensitivität von retinalen Ganglienzellen gegenüber dem CSPG NG2 zu testen, wurden untransfizierte Streifenexplantate embryonaler Retinae (E7) verwendet. Im Streifenassay wurden diese auf Proteinbeschichteten Deckgläsern mit alternierenden Streifen aus NG2 und Laminin kultiviert. Genauer wurden zuerst die NG2 Streifen adsorbiert und anschließend das entstandene Proteinmuster mit Laminin überschichtet. Somit enthalten auch die NG2-Streifen das permissive Laminin. Eine ausführliche Beschreibung des Streifenassays ist in im Methodenteil 2.6 und in einem im Rahmen der Dissertation angefertigten Übersichtsartikel (Weschenfelder et al., 2013) zu finden. In den Streifenassays konnte gezeigt werden, dass auch primäre Axone retinaler Ganglienzellen von NG2 beeinflusst werden. Die Axone vermeiden die Streifen, die NG2 enthalten und bevorzugen die Lamininstreifen (Abbildung 3.1 A). Auf einem auf die gleiche Weise hergestellten Streifensubstrat mit Fc statt NG2 ist diese Reaktion nicht zu erkennen (Abbildung 3.1 D). Der Effekt scheint also nicht auf dem Konzentrationsunterschied des permissiven Laminins in den Streifen zu beruhen. Hier nicht dargestellte immunhistochemische Färbungen gegen Laminin bestätigen dies.

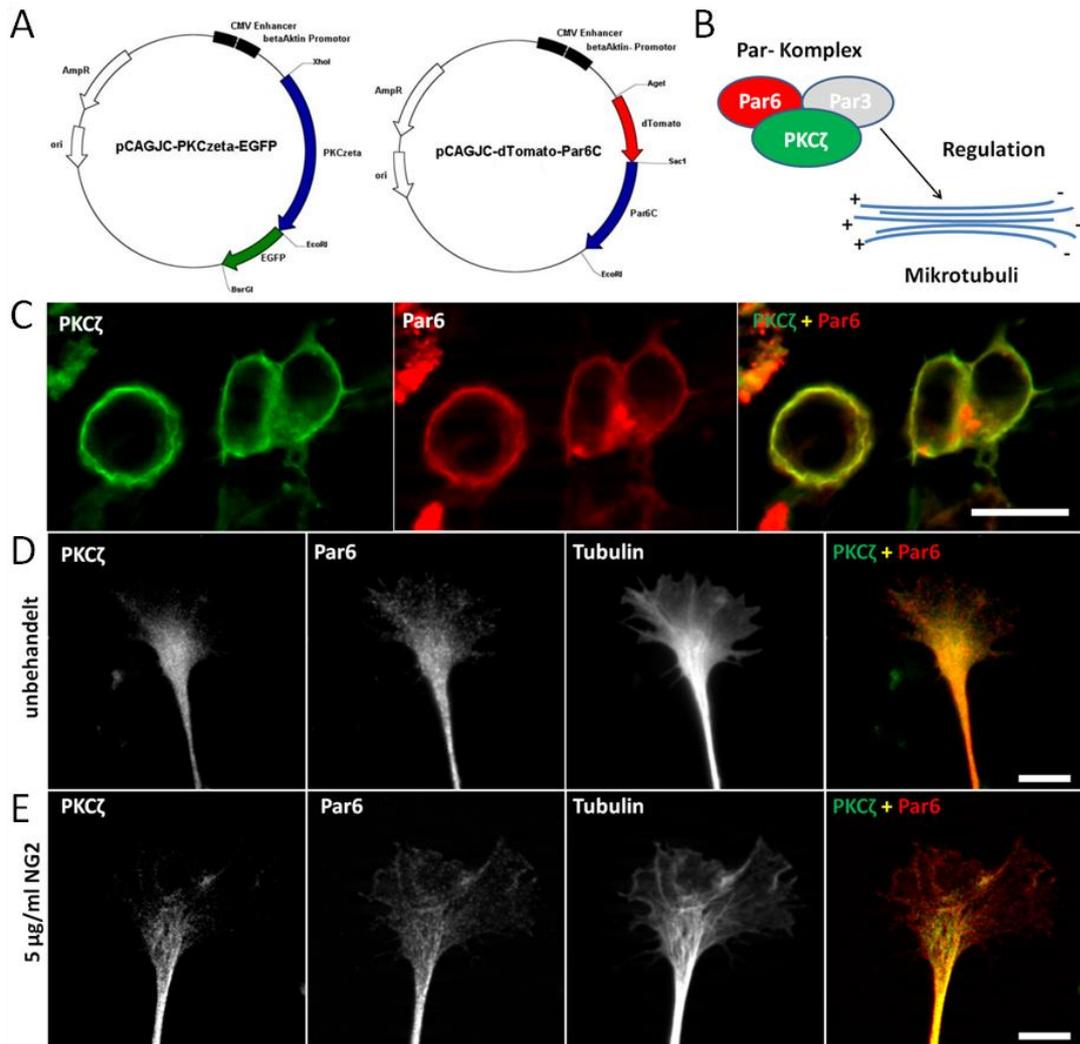


**Abbildung 3.1: Ein PKC $\zeta$ -Inhibitor hebt die repulsive Wirkung von NG2 auf Axone retinaler Ganglienzellen auf.** **A:** Axone retinaler Ganglienzellen (Phalloidininfärbung in grün) vermeiden NG2 (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Streifen in magenta) und wachsen auf Laminin (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , schwarze Streifen). **B:** In Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  eines PKC $\zeta$ -Inhibitors (MYR PKC Zeta Pseudosubstrate, Life Technologies) wachsen Axone auf beiden Streifen. **C:** Der Inhibitor hat keinen Einfluss auf die repulsive Wirkung von ephrin-A5 in der Positivkontrolle. **D:** Das homogene Auswachsen der Axone auf Streifen von Fc und Laminin in der Negativkontrolle wird nicht durch den mit ProteinaseK und Hitze inaktivierten Inhibitor beeinträchtigt. Maßstab 50  $\mu\text{m}$ . **E:** Das Diagramm zeigt die Quantifizierung aller getesteten Konditionen. Die repulsive Wirkung von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  NG2 entspricht der von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ephrin-A5, wird durch Zugabe des PKC $\zeta$ -Inhibitors aber deutlich verringert (NG2 PKC $\zeta$ -Inhibitor gegen NG2, PKC $\zeta$ -Inhibitor inaktiviert; zweiseitiger t-Test,  $p < 0,001$ ). In allen Fällen gilt die Anzahl unabhängiger Experimente  $n \geq 4$  (ein unabhängiges Experiment umfasst ein Deckglas mit einem Streifenmuster und zwei Explantatstreifen). Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Da vorangegangene Experimente des Kooperationspartners mit verschiedenen Neuronentypen aus dem Zentralnervensystem der Ratte eine Beteiligung von PKC $\zeta$  an der NG2 vermittelten Inhibition des Wachstums zeigten, stellte sich auch die Frage nach deren Beteiligung an der Vermittlung der repulsiven Wirkung des NG2 auf die Axone der RGCs. In der Tat konnte die repulsive Wirkung des NG2 auf die Axone (Abbildung 3.1 A) durch Anwesenheit eines Pseudosubstrats der PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$ -Inhibitor) im Kulturmedium aufgehoben werden (Abbildung 3.1 B). Dies ist weder mit dem Protease K und anschließend Hitze behandelten inaktivierten Pseudosubstrat, noch mit der Hitze inaktivierten Protease K alleine möglich (Abbildung 3.1 E). Der Inhibitor hat keinen Einfluss auf die Reaktion der retinalen Ganglienzellen im klassischen ephrin-A5 Streifenassay (Abbildung 3.1 C und E). Es scheint also einen spezifischen Effekt von PKC $\zeta$  auf die NG2 vermittelte Vermeidungsreaktion von RGC-Axononen zu geben, der dem Effekt auf das Auswachsverhalten von Rattenneuronen (Lee et al., 2013) ähnelt.

### 3.1.2 Die Kolokalisation der koexprimierten Par-Komplex-Komponenten Par6c und PKC $\zeta$ mit dem Tubulinzytoskelett kann durch NG2 beeinflusst werden

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen die Beteiligung der PKC $\zeta$ , was die Beteiligung des gesamten Par-Komplexes bei der NG2-vermittelten Vermeidungsreaktion nahe legte. Daher stellte sich die Frage nach der Lokalisation der Interaktionspartner PKC $\zeta$  und Par6, die sich wechselseitig aktivieren. Mittels *ex ovo* Elektroporation wurden Retinae (E6) mit den Konstrukten pCAGJC-PKC $\zeta$ -EGFP und pCAGJC-dTomato-PAR6c (kloniert von Seong-il Lee, Stony Brook, NY, USA) transfiziert. Beide Plasmide enthalten kodierende Sequenzen für Fusionsproteine bestehend aus einer Komponente des Par-Komplexes (PKC $\zeta$  oder Par6) und einem fluoreszierenden Protein (EGFP, C-terminal oder dTomato, N-terminal) unter Kontrolle eines CMV-Enhancer-Elements und dem  $\beta$ -Aktin-Promotor des Huhns. Die Plasmidkarten sind in Abbildung 3.2 A dargestellt. Verwendet wurde hierfür die noch nicht optimierte Methode (siehe Teil 3.2) weshalb nur wenige Explantate mit transfizierten Wachstumskegeln verfügbar waren. Abbildung 3.2 zeigt daher nur ein Beispiel für den qualitativen Effekt von NG2 auf die Verteilung der Fusionsproteine dTomato-PAR6c und PKC $\zeta$ -EGFP. Beide Plasmide wurden erfolgreich exprimiert und die kodierten Proteine kolokalisieren stark im Soma und partiell im Wachstumskegel der transfizierten Zellen (Abbildung 3.2 C und D). Von besonderem Interesse für eine Beteiligung des Par-Komplexes an der axonalen Lenkung war die Lokalisation von PKC $\zeta$  und Par6 im Wachstumskegel. Beide sind tendenziell abnehmend vom Zentrum zur Peripherie des Wachstumskegels lokalisiert. Vor allem in der C-Zone kolokalisieren dTomato-Par6c und PKC $\zeta$ -EGFP. Zugabe von NG2 führt nicht zu einem Kollaps der Axone, aber zu einer Konzentration beider Proteine im Bereich der Mikrotubuli (Abbildung 3.2 E). Ein *Linescan* mit ImageJ entlang der äußeren P-Zone und Kreuzkorrelation der Messwerte bestätigt diese Beobachtung. Das Bestimmtheitsmaß der Pearson-Regression für die Kreuzkorrelation der Tubulin und Par6 Messwerte beträgt  $r = 0,52$  für naive und  $r = 0,82$  für NG2 behandelte Wachstumskegel. Für die übrigen Korrelationen konnten nur schwache Veränderungen errechnet werden, die aber in die gleiche Richtung weisen (Par6 und PKC $\zeta$ : naiv  $r = 0,38$  und behandelt  $r = 0,51$ ; PKC $\zeta$  und Tubulin: naiv  $r = 0,61$  und behandelt  $r = 0,65$ ). Dieser beobachtete Effekt ist konsistent mit der bekannten Mikrotubuli regulierenden Wirkung des Par-Komplexes (Abbildung 3.2 B) sowie den publizierten Ergebnissen der Experimente an Rattenneuronen (Lee et al., 2013). Somit konnten zwar interessante Einblicke in die Proteoglycan-vermittelte Repulsion retinaler Wachstumskegel gewonnen werden, der Test zu Effizienz und Verwendbarkeit der gängigen *ex ovo* Elektroporation für *in vitro* Experimente mit retinalen Explantatstreifen fiel aber eher ernüchternd aus. Daher beschäftigt sich der nächste Teil der Arbeit mit der Optimierung der Methode.



**Abbildung 3.2: NG2 verändert die Lokalisation koexprimierter Par-Komplex-Komponenten.** **A:** Verwendete Plasmide für neuronale Expression der Fusionsproteine PKC $\zeta$ -EGFP und Par6c-dTomato (Lee et al., 2013). **B:** Schematische stark vereinfachte Darstellung der Wirkungsweise des Par-Komplexes. Aktivierung führt zu Kolokalisation und wechselseitiger Aktivierung von Par6, PKC $\zeta$  und Par3. Die aktivierten Komponenten interagieren direkt und indirekt auf das Tubulinzytoskelett und tragen so zur Regulation des gerichteten Wachstums bei. **C:** Mittels *ex ovo* Elektroporation kotransfizierte RGCs exprimieren PKC $\zeta$ -EGFP und dTomato-PAR6c im Soma. Par6 und PKC $\zeta$  sind stark kolokalisiert. **D:** Par6 und PKC $\zeta$  sind ebenfalls in den Wachstumskegeln transfizierter RGCs detektierbar. Es ist eine partielle Kolokalisation zu erkennen (gelb). **E:** Zugabe von 5  $\mu\text{g/ml}$  NG2 führt zu einer Lokalisation von PAR6c (rot) und PKC $\zeta$  (grün) im Bereich der Mikrotubuli. Auch die Kolokalisation (gelb) erscheint im Bereich der Mikrotubuli. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Optimierung der Elektroporationsmethode für retinale Ganglienzellen

In diesem Teil der Dissertation wurden verschiedene Methoden zur Expression von Plasmid-DNA in retinalen Ganglienzellen des embryonalen Huhns getestet und optimiert. Optimiert werden sollte hierbei nicht nur die Transfektionsrate, also die Anzahl transfizierter Zellen pro Retina sowie die Expressionsstärke pro Zelle, sondern insbesondere die Verwendbarkeit der transfizierten Neurone für *in vitro* Experimente. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Erhöhung der Anzahl transfizierter Neurone mit gesunder Morphologie und gut ausgewachsenen Axonen in Kultur. Da anfängliche Versuche mit dissoziierten Retinae vor allem in diesem Punkt unzureichende Ergebnisse lieferten, konzentriert sich dieser Abschnitt auf zwei Methoden: *in ovo* Elektroporation und *ex ovo* Elektroporation. In beiden Fällen werden die Zellen innerhalb der Retina transfiziert, ohne diese vorher zu dissoziieren. So erhält man transfizierte Retinae, die für verschiedene Formen der Zellkultur verwendbar sind. Es ist eine anschließende Vereinzelnung der bereits transfizierten Zellen und anschließende Kultivierung, aber auch die hier verwendete Explantatkultur von Gewebestreifen möglich. Es stellte sich heraus, dass die *ex ovo* Elektroporation explantierter Retinae hierfür am besten geeignet ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine neu entwickelte präparative und enzymatische Vorbehandlung des retinalen Gewebes mit Accutase die Elektroporationseffizienz bisheriger Methoden (siehe auch Abschnitt 3.1) deutlich verbessert.

Um einen Eindruck über die Effizienz der Methoden zu erhalten, sind in Tabelle 3.1 Ergebnisse aus exemplarischen Versuchen dargestellt. Diese standen am Ende der Optimierungsversuche und zeigen daher Ergebnisse unter optimalen Bedingungen. Die Embryonen wurden mit p $\beta$ actEYFP unter Verwendung der Methode *in vivo* Elektroporation (3.2.1), *ex vivo* Elektroporation (3.2.2) ohne Hacken und Accutasebehandlung (*ex vivo* „alt“) oder *ex vivo* mit Hacken und Accutasebehandlung (*ex vivo* „neu“) transfiziert. Alle Explantatstreifen der transfizierten Retinae wurden 48 h auf Laminin beschichteten Deckgläsern kultiviert. Danach wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop die Anzahl der transfizierten Gewebestreifen und die Anzahl der Axone ermittelt. Für das verwendete Konstrukt bedeutet dies mit Hilfe der neuen Methode eine Verdopplung beziehungsweise ein Verfünffachen der Anzahl transfizierter Axone pro behandeltem Embryo.

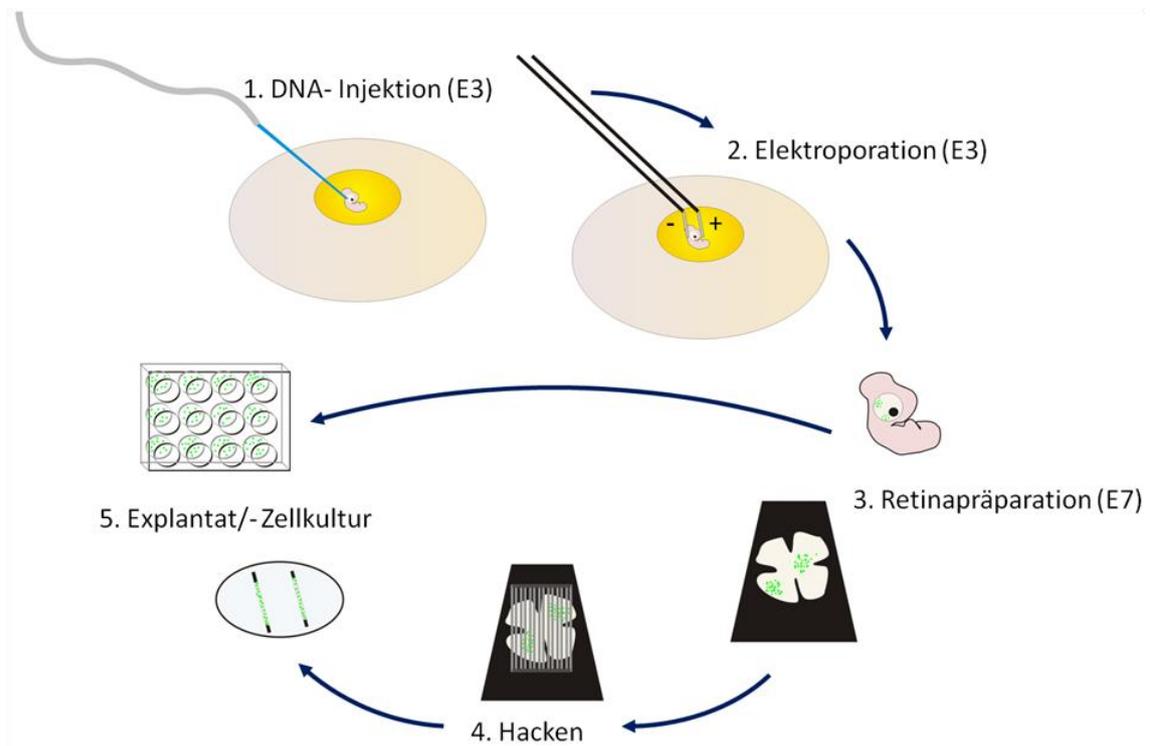
**Tabelle 3.1 Effizienz der Methoden mit p $\beta$ actEYFP\***

Methode	Anzahl der Embryonen	Anzahl der transfizierten Retinae	Anzahl der transfizierten Gewebestreifen	Anzahl der transfizierten Axone	Transfizierte Axone pro Embryo
in ovo	15	3	12	115	8
ex ovo „alt“	5	4	14	112	22
ex ovo „neu“	5	5	36	252	50

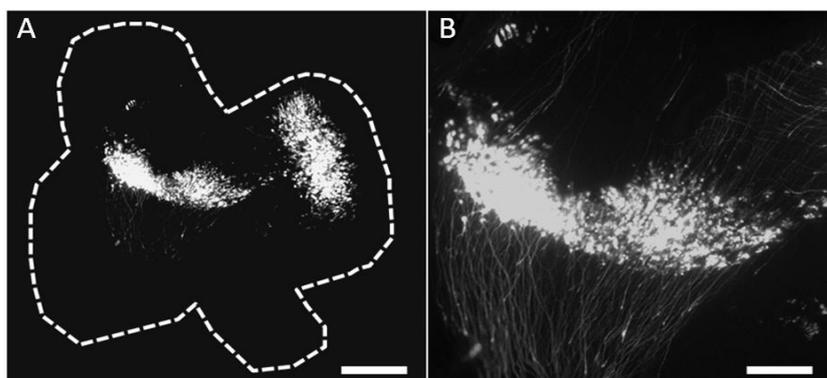
\*Es ist für jede Methode ein unabhängiges Beispielerperiment mit der jeweiligen Anzahl von Embryonen dargestellt, die an einem Tag elektroporiert wurden. Verwendete Parameter: 5 Pulse (50 ms; 950 ms Pause); 18 V; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l DNA *in ovo*; 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l *ex ovo*.

### 3.2.1 *In ovo* Elektroporation embryonaler Hühnerretina

Es wurde eine bereits publizierte Methode (Doh et al., 2010; Islam et al., 2012) leicht modifiziert. Der prinzipielle Ablauf der Methode ist in Abbildung 3.3 dargestellt und ist im Methodenteil unter 2.4.3 sowie bei Islam et al. 2012 ausführlich beschrieben. Als Kontrollplasmid wurde p $\beta$ actEYFP verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. E. Stoeckli, ETH Zürich). Dieses enthält eine kodierende Sequenz für das gelb fluoreszierende Protein EYFP unter Kontrolle des  $\beta$ -Aktin-Promoters des Huhns. Durchschnittlich überlebte die Hälfte der Embryonen die Prozedur. Die überlebenden Embryonen wiesen meistens eine normale Morphologie auf, nur selten war das injizierte Auge anormal verändert oder wies Hämatome auf. Wiederum die Hälfte der normal entwickelten Embryonen zeigten gelb fluoreszierende Zellen in der Retina. In Abbildung 3.4 A ist repräsentativ die explantierte Retina eines transfizierten Embryos zu sehen. Typischerweise zeigen diese Retinae ein bis zwei Regionen, die sehr stark transfiziert sind und sonst keine transfizierten Zellen. Diese Regionen entsprechen vermutlich den Injektionsstellen. Je nach Position der Kapillare durchbohrt diese ein oder zweimal die Retina. Dort entstehen stark transfizierte Bereiche. In der Detailansicht (Abbildung 3.4 B) sind gut Axone zu erkennen, die in Richtung des ONH wachsen. Es handelt sich bei den transfizierten Zellen demnach um retinale Ganglienzellen. Die *in ovo* Elektroporation eignet sich demnach zwar für die Transfektion retinaler Ganglienzellen, für *in vitro* Experimente mit Explantatstreifen ist die Methode auf Grund der geringen Ausbeute an transfizierten Axonen jedoch wenig geeignet.



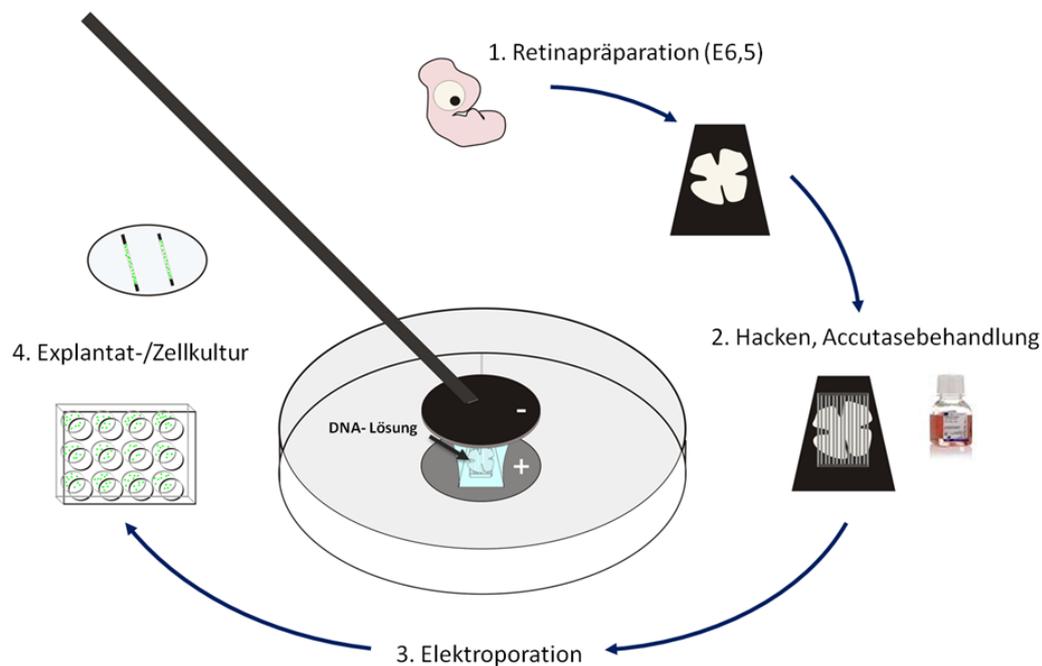
**Abbildung 3.3: Ablauf einer *in ovo* Elektroporation.** In die Schale eines Hühnereis wird nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank ein Fenster geschnitten. In den ventrikulären Spalt der embryonalen Retina (E3) wird mit einer feinen Kapillare Plasmid-DNA, gelöst in 0,25 % Trypanblau in PBS, injiziert. Die Elektroden werden so am injizierten Auge des Embryos positioniert, dass die Negativelektrode am Ort der Injektionsstelle platziert ist und die Positivelektrode an der gegenüberliegenden Seite des Auges. Es werden 5 Pulse für je 50 ms mit 18 V Spannung im Abstand von 950 ms appliziert. Danach wird das Ei mit einem transparenten Klebestreifen verschlossen und bis E7 inkubiert. Für Explantatkulturen wird die Retina präpariert, auf einer Membran ausgebreitet, in Streifen gehackt und die Explantatstreifen kultiviert. Alternativ wird die Retina enzymatisch und mechanisch dissoziiert und die vereinzelt Zellen in Kultur genommen.



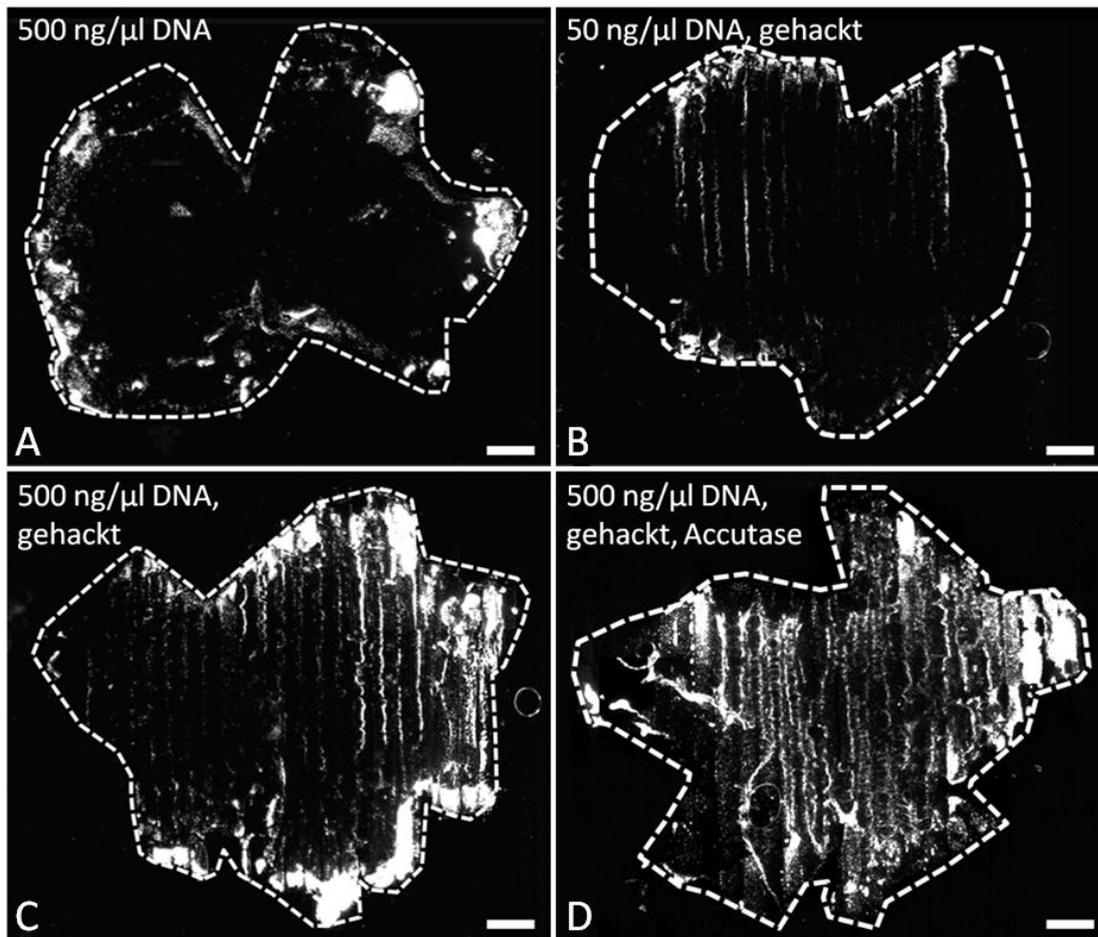
**Abbildung 3.4: Mittels *in ovo* Elektroporation transfizierte Retina.** **A:** Retinale Zellen exprimieren das auf dem Plasmid p $\beta$ actEYFP kodierte EYFP. Der Umriss der explantierten Retina ist durch eine weiße, gestrichelte Linie dargestellt. Es sind zwei stark transfizierte Bereiche zu erkennen. Maßstab 500  $\mu$ m. **B:** Vergrößerter Ausschnitt der Retina. Deutlich sind Axone transfizierter Neurone zu erkennen. Maßstab 250  $\mu$ m.

#### 3.2.2 *Ex ovo* Elektroporation embryonaler Hühnerretina

Die Ergebnisse aus Teil 3.1 und 3.2 legten Nahe, dass die *ex ovo* Elektroporation generell besser für die Kombination mit retinalen Explantatkulturen geeignet ist, als *in ovo* Elektroporation. Dennoch lieferte die in Teil 3.1 verwendete Technik – eine Variante der bereits publizierten Methode (Yuasa-Kawada et al., 2003; Shintani et al., 2009) – nicht die nötige Effizienz für quantitative Analysen (siehe auch Tabelle 3.1). Daher wurde sie optimiert und modifiziert. Der prinzipielle Ablauf ist in Abbildung 3.5 dargestellt und eine Beschreibung ist im Abschnitt 2.4.4 des Methodenteils zu finden. Als Kontrollplasmid wurde wie in Teil 3.2.1 pβactEYFP verwendet. In Abbildung 3.6 sind explantierte Retinae zu sehen, die unter verschiedenen Konditionen elektroporiert wurden. Als wichtigste Parameter stellten sich die DNA-Konzentration und eine neuentwickelte präparative und enzymatische Vorbehandlung der Retina heraus. Die DNA-Konzentration hat Einfluss auf die Transfektionseffizienz, aber vor allem auf die Expressionsstärke (Abbildung 3.6 B und 3.6 C). Eine Vorbehandlung der Retina durch hacken in Streifen von 300 µm Breite erhöhte deutlich die Transfektionseffizienz (Abbildung 3.6 A und 3.6 C), eine zusätzliche Behandlung mit Accutase verstärkte diesen Effekt (Abbildung 3.6 D). Eine kontrollierte Läsion des Gewebes durch das Hacken und enzymatische Perforation der extrazellulären Matrix vor der Elektroporation in Kombination mit einer relativ hohen DNA-Konzentration während der Elektroporation, führen zu einer deutlich höheren Expressionsstärke und zu einer breiteren Verteilung der transfizierten Zellen über die gesamte Retina. Entlang der Schnittkanten der Streifen ist dies besonders gut zu erkennen. Andere getestete Parameter wie die Anwesenheit bivalenter Kationen, Pulsanzahl und Elektrodenabstand spielten eine im Vergleich dazu eher geringe Rolle. Die Einflüsse der getesteten Parameter sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Besonders der direkte Vergleich von Abbildung 3.6 A und D zeigt, wie groß der Einfluss der neuen Vorbehandlung auf die Effizienz der oben erwähnten publizierten Methoden ist. Sehr gut ist hier zu erkennen, dass die Anzahl an Explantatstreifen gesteigert wird, die eine hohe Anzahl und breite Verteilung stark exprimierender Zellen aufweisen. Dies ist die Grundvoraussetzung für eine effiziente Kombination von genetischer Veränderung der retinalen Zellen und *in vitro* Assays. Die zweite wichtige Voraussetzung ist, dass unter den transformierten Zellen tatsächlich Neurone sind. Dies wird im folgenden Abschnitt gezeigt.



**Abbildung 3.5: Ablauf einer *ex ovo* Elektroporation.** Die Retina eines Hühnerembryos (E6,5) wird explantiert und so auf einer Membran ausgebreitet, dass diese die Lage des entfernten Pigmentepithels einnimmt und somit die innerste Schicht der embryonalen Retina nach oben zeigt. Es werden 300  $\mu\text{m}$  breite Streifen in die Retina und Membran gehackt, ohne diese an den Enden von der Membran zu trennen. Durch Anverdau von ECM-Proteinen für 5 min mit Accutase werden die Basallamina und das Gewebe durchlässiger. Die vorbehandelte Retina wird zwischen zwei Plattenelektroden gelegt und mit einer Plasmid-DNA-Lösung überschichtet. Der Elektrodenabstand beträgt circa 3 mm. Die Positivelektrode ist unten, sodass die negativ geladene DNA elektrophoretisch zur Retina transportiert wird. Es werden 5 Pulse für je 50 ms mit 15 V Spannung im Abstand von 950 ms appliziert. Die Explantatstreifen können nun kultiviert werden. Alternativ wird die Retina über Nacht inkubiert, enzymatisch sowie mechanisch dissoziiert und die vereinzelt Zellen kultiviert.



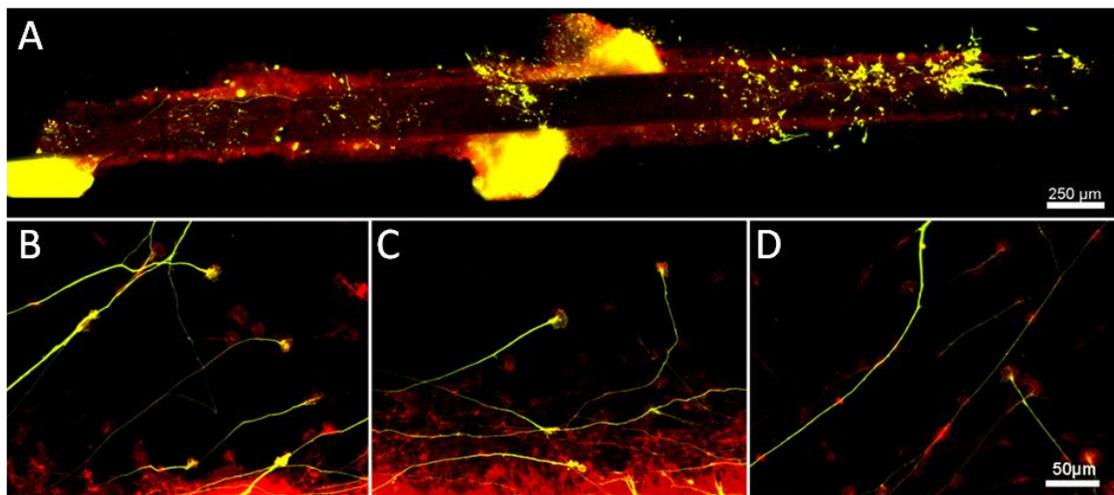
**Abbildung 3.6. Wichtige Parameter der *ex ovo* Elektroporation embryonaler Retinae.** Retinale Zellen exprimieren das auf dem Plasmid pBactEYFP kodierte EYFP. Der Umriss der explantierten Retina ist durch eine weiße, gestrichelte Linie dargestellt. Es sind die Einflüsse verschiedener Parameter gezeigt. **A:** Direkt nach der Explantation ohne weitere Vorbehandlung elektroporierte Retina. Vor allem Randbereiche sind stark transfiziert. **B, C:** Retinae, die vor der Elektroporation in 300 µm breite Streifen gehackt wurden. Neben den stark transfizierten Bereichen am Rand, sind auch transfizierte Zellen entlang der Schnittkanten im Zentrum zu erkennen. Deutlich ist auch der positive Einfluss der DNA-Konzentration (Faktor 10 von B zu C) auf die Effizienz und Expressionsstärke zu sehen. **D:** Eine zusätzliche Behandlung der gehackten Retina mit Accutase führt zu einer größeren Anzahl und einer noch breiteren Verteilung transfizierter Zellen. Maßstab 500 µm.

**Tabelle 3.2 Einflüsse verschiedener Parameter der *ex ovo* Elektroporation retinaler Ganglienzellen.**

Parameter	Getestet	Sonstige Konditionen	Ergebnisse
DNA - Konzentration	5; 50; 100; 200; 500; 1000 ng/μl	12 bis 18 V Puls: 5x 50 ms, 50 ms Pause 0 mM Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> keine Vorbehandlung	Ab 50 ng/μl detektierbare Expression in retinalen Zellen, Steigerung mit zunehmender Konzentration bis 500 ng/μl, keine erkennbare Steigerung von 500 zu 1000 ng/μl
Spannung	5; 10; 12; 15; 18; 50 V	DNA-Konzentration 100 ng/μl Puls: 5x 50 ms, 50 ms Pause 0 mM Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> keine Vorbehandlung	Spannungen unter 10 V zu gering, 50 V führte zum Absterben vieler Zellen, 12-18 V liefern gute Ergebnisse
Pulszahl	3; 5; 10; 15	DNA-Konzentration 100 ng/μl; Puls: 50 ms, 50 ms Pause; 15 V 0 mM Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> keine Vorbehandlung	keine erkennbaren Unterschiede
Pulspause	50; 100; 950 ms	DNA-Konzentration 100 ng/μl; Puls: 5 x 50 ms; 15 V 0 mM Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> keine Vorbehandlung	keine erkennbaren Unterschiede
Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> - Konzentration	0; 10 mM	DNA-Konzentration 200 ng/μl; Puls: 5 x 50 ms, 50 ms Pause; 15 V; keine Vorbehandlung	keine erkennbaren Unterschiede
Vorbehandlung Hacken	Streifenbreite: 250; 275; 300 μm	DNA-Konzentration 200 ng/μl; Puls: 50 ms, 950 ms Pause; 15 V; 0 mM Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Hacken erhöht die Anzahl transfizierter Zellen entlang der Schnittkanten
Vorbehandlung Accutase	5; 10 ; 15 min	DNA-Konzentration 200 ng/μ Puls: 5 x 50 ms, 950 ms Pause; 15 V 0 mM Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> gehackt	Accutase erweitert die Verteilung transfizierter Zellen über die Retina, 5 min reichen aus; 15 min führen zur Dissoziation der Retina

### 3.2.3 Transfizierte Axone in Explantatkulturen elektroporierter Retinae sind morphologisch intakt

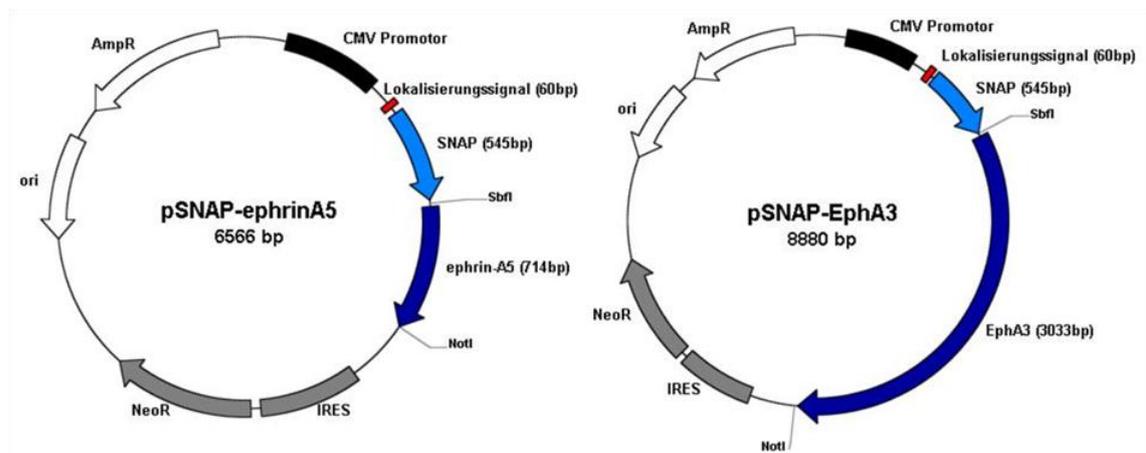
Trotz des relativ großen Entwicklungsunterschiedes der verwendeten Embryonen (E3 *in ovo*, E7 *ex ovo*) zum Zeitpunkt der Elektroporation, waren in erfolgreich transfizierten Explantatstreifen unter allen Bedingungen transfizierte Neurone an Hand der gelb fluoreszierenden Axone zu erkennen. Abbildung 3.7 zeigt einen mittels *ex ovo* Elektroporation transfizierten Explantatstreifen, der 48 h auf Laminin kultiviert wurde. Es sind untransfizierte und transfizierte Axone zu erkennen, die eine normale Morphologie aufweisen. Im Falle des pβactEYFP-Plasmids konnten pro erfolgreich transfiziertem Explantatstreifen, zwischen 3 und circa 30 transfizierte Axone beobachtet werden (eine exakte Anzahl ist auf Grund des faszikulierten Auswachsens der Axone nicht immer bestimmbar). Die Anzahl variiert stark, je nach Anzahl der transfizierten Zellen und allgemeinem Auswachsen transfizierter und untransfizierter Axone. Mit allen hier beschriebenen Elektroporationsmethoden konnten Streifen retinalen Gewebes mit transfizierten, auswachsenden retinalen Ganglienzellen kultiviert werden. Jedoch lieferte die optimierte *ex ovo* Elektroporation mit Hacken und Accutasebehandlung 8 bis 18 solcher Explantatstreifen pro Retina, die ohne nur 2 bis 4. Die *in ovo* Methode lieferte 4 bis 8 verwendbarer Explantatstreifen. Bezieht man hier jedoch mit ein, dass nur ein Viertel der *in ovo* elektroporierten Embryonen positive Ergebnisse lieferte, kann man pro behandelten Embryo einen verwendbaren Streifen erwarten (siehe auch Tabelle 3.1).



**Abbildung 3.7: Transfizierter retinaler Explantatstreifen nach 48 h Kultur auf Laminin.** Mit pβactEYFP transfizierte Zellen exprimieren EYFP. Phalloidin-färbung gegen Aktin in rot. **A:** Aufnahme des gesamten Explantats. Es sind stark und schwach transfizierte Bereiche zu erkennen. **B, C:** Nahaufnahmen aus Regionen nahe am Explantat. **D:** Nahaufnahme von einer Stelle circa 1 mm vom Explantat entfernt. Es sind transfizierte retinale Axone und deren Wachstumskegel mit gesunder Morphologie zu erkennen.

### 3.3 Erfolgreiche Herstellung und Expression der rekombinanten Fusionsproteine SNAP-EphA3 und SNAP-ephrin-A5

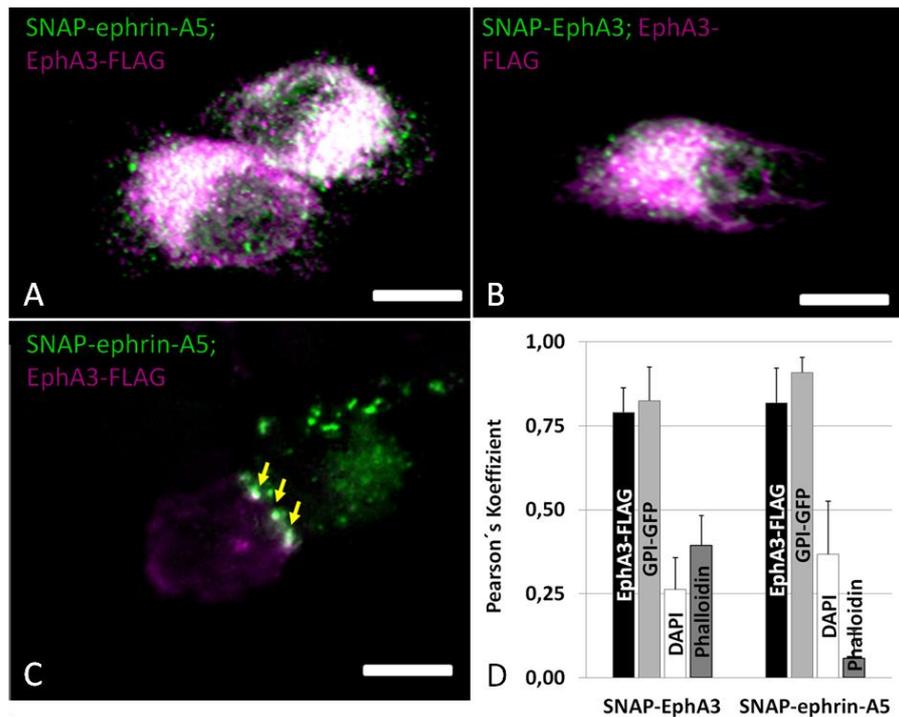
Für die Untersuchung der Oberflächendynamik der Rezeptortyrosinkinase EphA3 und ihres Liganden ephrin-A5 wurden Expressionsplasmide kloniert, die Fusionsproteine aus einem SNAP-Tag und dem jeweiligen Protein kodieren (siehe 2.2). Der SNAP-Tag ist eine modifizierte 19.4 kDa O-6-AGT (Keppler et al., 2004; Gautier et al., 2008). Dieses Enzym reagiert unter Zellkulturbedingungen mit Benzylguanin (BG) und Benzylchloropyrimidin (BP) unter Abspaltung des Guanins beziehungsweise des Pyrimidins. Dabei entsteht eine kovalente Bindung des SNAP-Tags zum Benzyl-Rest. Koppelt man diese Substrate zuvor durch NHS-Ester-Chemie an Fluorophore erhält man eine nicht toxische Sonde für den SNAP-Tag des Fusionsproteins, die im Idealfall nicht die Funktion des restlichen Proteins beeinträchtigt. Des Weiteren sind BP-Fluorophore potentiell Zellmembran permeabel, BG-Fluorophore nicht. So können durch verschiedene Substrat-Fluorophor-Kombinationen extra- und intrazelluläre Subpopulationen desselben Fusionsproteins markiert werden. Die in Abbildung 3.8 dargestellten Plasmide, die künstliche Gene für SNAP-ephrin-A5 oder SNAP-EphA3 enthalten, wurden kloniert und in verschiedenen Zelltypen exprimiert.



**Abbildung 3.8: Expressionsplasmide für die Fusionsproteine SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3.** Die mit PCR aus cDNA amplifizierte kodierende Sequenzen wurden in den Vektor pSNAPtag (NEB, Frankfurt) kloniert, sodass die Sequenzen für Fusionsproteine mit N-terminalem (extrazellulärem) SNAP-Tag kodiert werden. Für eine Membranlokalisation der Proteine wurden die Sequenzen für die annotierten Signalpeptide von ephrin-A5 beziehungsweise EphA3 N-terminal des SNAP-Tags eingefügt. Die Expression erfolgt unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Die Neomycinresistenz unter Kontrolle der *internal ribosomal entry site* (IRES) wird bicistronisch exprimiert und dient der Selektion eukaryotischer Zellen, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht genutzt.

#### **3.3.1 SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 kolokalisieren mit den etablierten rekombinanten Proteinen EphA3-FLAG und GPI-GFP**

Um einen Eindruck über die Lokalisation von SNAP-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 zu erhalten, wurden diese mit den bereits charakterisierten Fusionsproteinen EphA3-FLAG und GPI-GFP (Maus-EphA3 mit C-terminalem FLAG-Tag beziehungsweise GFP mit Signalpeptid zum anbringen eines GPI-Ankers, unter Kontrolle eines CMV-Promotors (Carvalho et al., 2006)) in HeLa-Zellen koexprimiert. Hierzu wurde die Plasmid-DNA der SNAP-Konstrukte zusammen mit der der anderen Fusionsproteine mittels Lipofektion in HeLa-Zellen eingebracht. Die Zellen exprimierten die Proteine über Nacht und wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen SNAP und FLAG gefärbt. Es folgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der gefärbten Proteine und des fluoreszierenden GPI-GFP. In Abbildung 3.9 A und B ist zu sehen, dass sowohl SNAP-ephrin-A5, als auch SNAP-EphA3 mit EphA3-FLAG partiell kolokalisieren. Demnach befindet sich das SNAP-EphA3 in vergleichbaren Kompartimenten der Zellen, wie das etablierte EphA3-FLAG. SNAP-ephrin-A5 ist mit FLAG-ephrin-A5 kolokalisiert, was ebenfalls konsistent mit den Literaturangaben ist. In einem weiteren Experiment wurden Zellen, die nur SNAP-ephrin-A5 oder EphA3-FLAG exprimieren kokultiviert. Interessanter Weise konnte in den Fällen, in denen sich SNAP-ephrin-A5 und EphA3-FLAG exprimierende Zellen berührten, ebenfalls vereinzelte Kolokalisationsereignisse der Antikörperfärbungen gegen FLAG und SNAP im Kontaktbereich der Zellmembranen beobachtet werden (Abbildung 3.9 C). Dies deutet auf eine Oberflächenlokalisierung und eine Rezeptor-Liganden-Interaktion von EphA3-FLAG und SNAP-ephrin-A5 hin. Das Diagramm (Abbildung 3.9 D) zeigt die Quantifizierung der Kolokalisationsexperimente. Hier sind auch weitere, nicht bildhaft dargestellte Koexpressionsexperimente mit GPI-GFP integriert. SNAP-EphA3 kolokalisiert mit EphA3-FLAG und GPI-GFP, nicht aber mit einer Phalloidin färbung gegen Aktin oder einer Kernfärbung mit DAPI. Dasselbe gilt für SNAP-ephrin-A5. Diese Ergebnisse sind ein erster Hinweis darauf, dass die neu entwickelten Fusionsproteine SNAP-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in den zu erwartenden Kompartimenten innerhalb der Zelle und an der Zelloberfläche lokalisiert sind.

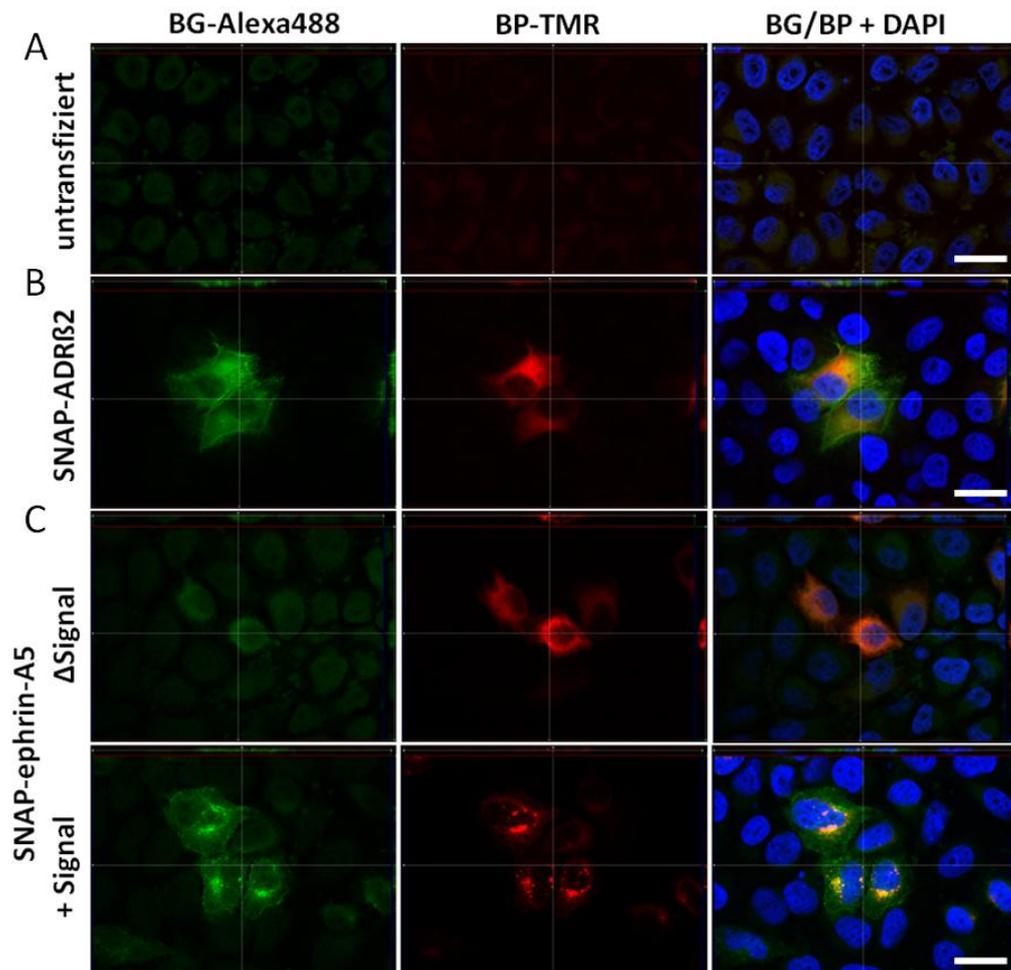


**Abbildung 3.9: Lokalisation der SNAP-Konstrukte in HeLa-Zellen.** **A, B:** Transiente Koexpression von SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 mit EphA3-FLAG in humanen Cervixkarzinomzellen der HeLa-Linie. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und die exprimierten Fusionsproteine an Hand ihres Tags immunhistochemisch mit anti-SNAP und anti-FLAG Antikörpern nachgewiesen. Die Signale kolokalisieren im Zytosol und perinukleär. **C:** Kokultur von SNAP-ephrin-A5 mit EphA3-FLAG exprimierenden Zellen. Im Kontaktbereich der Zellen ist eine partielle Kolokalisation der Proteine zu erkennen. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ . **D:** Quantifizierung aller getesteten Koexpressionen. Der Pearson- Koeffizient ( $r$ ) gibt die lineare Korrelation der Signalintensitäten (Intensitäten grüner Kanal|Intensitäten roter Kanal) an. Die Konstrukte SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 kolokalisieren mit EphA3-FLAG und GPI-GFP;  $r > 0,75$ . nicht aber mit Aktin (Phalloidin-Färbung) oder dem Zellkern (DAPI-Färbung);  $r < 0,5$ . In allen Fällen gilt: Die Anzahl unabhängiger Experimente  $n \geq 3$  (ein unabhängiges Experiment umfasst ein Deckglas auf dem 20 transfizierte Zellen ausgewertet wurden). Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

### 3.3.2 An Benzylguanyl und Benzylchloropyrimidin gekoppelte Fluorophore färben unterschiedliche Subpopulationen des gleichen SNAP-Proteins

Zur Unterscheidung zwischen oberflächenständigen und intrazellulären SNAP-ephrin-A5-Molekülen wurden entsprechende Plasmide mittels Lipofektion in HeLa-Zellen eingebracht und die kodierten SNAP-Proteine exprimiert. Verwendet wurde SNAP-ephrin-A5 und SNAP-ephrin-A5 $\Delta$ Signal, bei dem kein Membranlokalisierungssignal vor dem N-terminalen SNAP-Tag eingebracht wurde. Außerdem wurde SNAP-ADR $\beta$ 2, das für ein Fusionsprotein aus dem Beta-2 Adrenorezeptor und 5HT3A Serotoninrezeptor-Signalpeptid kodiert (NEB Nr. N9184S) als Positivkontrolle verwendet. Es folgte eine serielle Behandlung mit den Fluorophor-gekoppelten SNAP-Substraten BG-Alexa488, das nicht Zellmembran-permeabel ist (Keppler et al., 2004) und dem Zellmembran-permeablen BP-TMR. Hierfür wurden die Zellen in serumhaltigem Medium

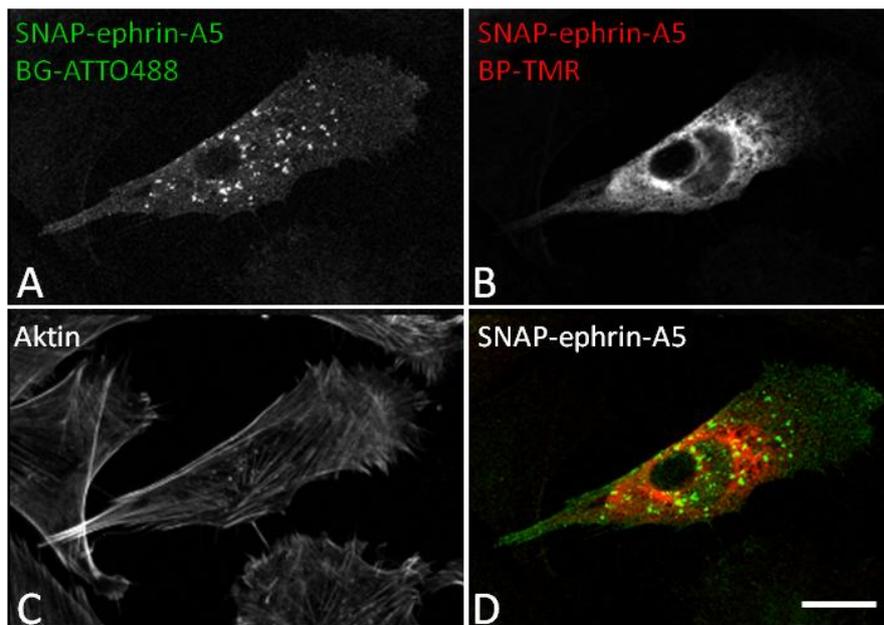
zuerst 30 min mit BG-Alexa488 behandelt, anschließend mit Medium gewaschen, danach 30 min mit BP-TMR gefärbt und nach einer 30 minütigen Erholungsphase fixiert. Durch diese serielle Färbung vor der Fixierung der Zellen sollen alle SNAP-Fusionsproteine, die während der Inkubationsphase mit BG-Alexa488 an der Zelloberfläche lokalisiert waren grünfluoreszierend, alle anderen SNAP-Proteine rotfluoreszierend markiert werden. In Abbildung 3 10 ist zu sehen, dass SNAP-ADRB $\beta$ 2 (3.10 B) und SNAP-ephrin-A5 (3.10 C oben) deutliche Färbungen mit BG-Alexa488 im grünen Kanal aufweisen, nicht jedoch SNAP-ephrin-A5 $\Delta$ Signal (3.10 C unten) und untransfizierte Zellen (3.10 A). Dies belegt die Oberflächenlokalisierung von SNAP-ADRB $\beta$ 2 und SNAP-ephrin-A5, sowie die Funktionalität des verwendeten Signalpeptids von ephrin-A5 für die Membranlokalisierung. Außerdem ist ein Unterschied in der intrazellulären BG-Alexa488-Färbung zwischen SNAP-ADRB $\beta$ 2 und SNAP-ephrin-A5 zu erkennen. Beide zeigen grüne Fluoreszenz im Bereich des zytosolischen Membransystems um den Nukleus. Im Falle des SNAP-ephrin-A5 scheint diese Färbung besonders in der Region des Golgi-Apparates zu akkumulieren, dies ist bei SNAP-ADRB $\beta$ 2 in diesem Ausmaß nicht zu beobachten. Hier nicht gezeigte immunhistochemische Färbungen gegen GM130 (mouse anti Golgi Marker 130, Abcam, Cambridge, GB) bestätigen dies. Das Muster der Färbung könnte auch endosomale und lysosomale Strukturen einschließen. Die BP-TMR-Färbung beschränkt sich auf intrazelluläre Bereiche. Im Falle des SNAP-ADRB $\beta$ 2 erscheint die Färbung eher zytosolisch und kolokalisiert partiell mit der BG-Färbung. In den SNAP-ephrin-A5 $\Delta$ Signal exprimierenden Zellen scheint die Färbung insbesondere perinukleäre Regionen zu betreffen. Die BP-TMR Färbung des SNAP-ephrin-A5 ist ebenfalls in der Nähe des Kerns besonders stark und zeigt eine partielle Kolokalisation mit der BG-Alexa488 Färbung, insbesondere der Region des Golgi. Die BG-Fluorophore reagieren demnach mit den SNAP-gekoppelte Proteinen, die an der Oberfläche lokalisiert sind und jenen, die während der 30 minütigen Reaktion an der Oberfläche lokalisiert waren. Während der kompletten 90 minütigen Färbeprozedur können diese Proteine endozytiert, recycelt, wieder in die Membran eingebaut oder auch abgebaut werden. Daher schließt eine BG-Fluorophor-Färbung nicht nur die Zelloberfläche, sondern auch Teile des zytosolischen Membransystems ein. Das BP-Fluorophor kann anschließend mit allen SNAP-Proteinen reagieren, die noch nicht mit dem BG-Fluorophor reagiert haben. Dies betrifft vor allem SNAP-Proteine, die sich in Kompartimenten befinden, in denen die Proteinsynthese- und Prozessierung stattfindet, also vor allem raues ER, ER und Golgi. Auch Transportvesikel könnten betroffen sein, ebenso lysosomale Strukturen, in denen auch falsch gefaltete Proteine abgebaut werden. Auf Grund der BG-Färbung lässt sich also auf eine hohe Dynamik des SNAP-ephrin-A5 an der Zelloberfläche schließen. Da aber keine BP-Färbung an der Oberfläche zu sehen ist, kann man davon ausgehen, dass neusynthetisiertes Protein bei der Oberflächendynamik von SNAP-ephrin-A5 im Zeitraum der seriellen SNAP-Färbung von 90 Minuten eine untergeordnete Rolle spielt.



**Abbildung 3.10: Serielle Färbung mit verschiedenen fluoreszenten SNAP-Substraten ermöglicht die differenzielle Färbung intra- und extrazellulärer Subpopulationen eines Proteins.** Serielle SNAP-Färbung unfixierter HeLa-Zellen: 30 min BG-Alexa-488, 30 min mit Zellmembran permeablen BP-TMR, jeweils 25 pmol/ml. Nach 30 min PFA-Fixierung und DAPI-Färbung. **A:** Untransfizierte Zellen zeigen keine Färbung. **B:** SNAP-ADRB<sub>2</sub>-Kontrollkonstrukt mit Signalpeptid zur Membranlokalisierung N-terminal des SNAP-Tags. BG-Alexa488 färbt die Oberfläche und Peripherie der Zellen aber auch intrazelluläre Bereiche. BP-TMR färbt intrazelluläre Kompartimente. Die Färbungen sind klar differenziert mit geringer Kolokalisation im intrazellulären Membransystem. **C:** Im Falle des SNAP-ephrin-A5 $\Delta$ Signal ist keine differenzielle Färbung im grünen Kanal zu erkennen. Im roten Kanal sind eine schwache zytosolische sowie eine starke perinukleäre Färbung auszumachen. Durch das N-Terminale Signalpeptid wird SNAP-ephrin-A5 (unterste Reihe) in die Membran transportiert. BG-Alexa488 färbt die Zelloberfläche sowie diskrete Regionen um den Kern, die auch Teile des Golgi-Apparates einzunehmen scheinen, aber auch spät-endosomal sein könnten. Das Signal im roten Kanal der BP-TMR-Färbung kolokalisiert perinukleär mit der BG-Färbung. BG-Alexa488 färbt demnach alle SNAP-Proteine die während der 30 minütigen Färbung an der Oberflächen waren und dort verblieben sind, oder während der restlichen 60 Minuten der Färbeprozedur endozytiert beziehungsweise recycelt wurden. Die anschließende BP-TMR-Färbung markiert alle übrigen SNAP-Proteine. Beide Färbungen kolokalisieren in Kompartimenten des intrazellulären Membransystems. Maßstab 20  $\mu$ m.

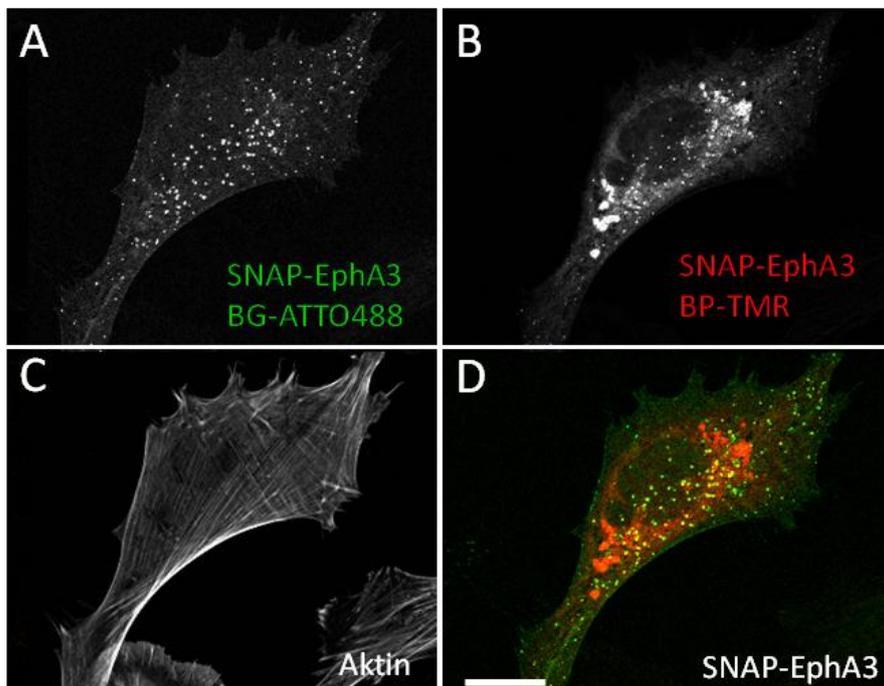
### 3.3.3 SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 sind in primären Hühnerfibroblasten ähnlich lokalisiert

Mit der in 3.3.2 etablierten seriellen SNAP-Färbung wurde nun um die Lokalisation der SNAP-Konstrukte genauer zu beurteilen, SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 in primären Hühnerfibroblasten exprimiert. Diese sind etwas größer als HeLa-Zellen und zeigen normalerweise deutliche Lamellipodien. Diese morphologischen Eigenschaften machen es einfacher die Lokalisation der SNAP-Proteine zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil ist, dass primäre Hühnerfibroblasten näher am Zielsystem, den retinalen Ganglienzellen des Huhns, sind als humane Cervixkarzinomzellen. SNAP-ephrin-A5 beziehungsweise SNAP-EphA3 wurde mit Hilfe von Elektroporation in primären Fibroblasten aus der Rückenhaut von Hühnerembryonen exprimiert (2.4.2). Die Fibroblasten wurden auf PLL/FN-Deckgläsern kultiviert, seriell jeweils 30 Minuten mit BG-ATTO488 und BP-TMR gefärbt, anschließend fixiert und mit Phalloidin-Alexa647 das Aktinzytoskelett gefärbt. Die Färbungen des SNAP-ephrin-A5 in den Fibroblasten ähneln denen in den HeLa-Zellen; es sind aber auch Unterschiede auszumachen (Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11: Lokalisation von SNAP-ephrin-A5 in primären Hühnerfibroblasten.** SNAP-ephrin-A5 wurde in primären Hühnerfibroblasten exprimiert, seriell jeweils 30 min mit BG-ATTO488 und BP-TMR gefärbt, fixiert und mit Phalloidin das Aktinzytoskelett gefärbt. **A:** Die BG-ATTO488-Färbung markiert SNAP-ephrin-A5 an der Zelloberfläche und in Aggregaten, die in einem großen Bereich um den Kern zu finden sind. **B:** BP-TMR gefärbtes SNAP-ephrin-A5 ist vor allem in Regionen des intrazellulären Membransystems (ER, Golgi) zu erkennen, kolokalisiert aber auch mit der BP-Färbung in den eventuell endosomalen Aggregate. **C:** Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts von transfizierten und untransfizierten Zellen. **D:** Die Überlagerung beider SNAP-Färbungen verdeutlicht, dass sich zwei Subpopulationen von SNAP-ephrin-A5 anfärben lassen (Oberflächen assoziiert und intrazellulär), die in vermutlich endosomalen Strukturen kolokalisieren. Maßstab 20 µm.

Die BG-Färbung (Abbildung 3.11 A) ist über die gesamte Zelloberfläche verteilt, zeigt aber auch Aggregate, die sich eher im Zentrum der Zelle befinden. Diese erinnern stark an endosomale Strukturen. Die in den HeLa-Zellen beobachtete BG-Färbung in den Kompartimenten des zytosolischen Membransystems und des Golgi (Abbildung 3.10 C) fehlt fast gänzlich. Die BP-Färbung hingegen ist vor allem in diesen Kompartimenten zu erkennen (Abbildung 3.11 B). Sie ist aber nicht so stark auf die perinukleäre Region und den Golgi beschränkt wie in den HeLa-Zellen. Interessanterweise sind Kollokalisationsereignisse der BG- und BP-gefärbten SNAP-ephrin-A5 Moleküle (Abbildung 3.11 D) nur vereinzelt zu beobachten. Insbesondere die starke Kollokalisierung bei den HeLa-Zellen im Bereich des Golgi (Abbildung 3.10 C) fehlt gänzlich. SNAP-EphA3 (Abbildung 3.12) zeigt eine insgesamt ähnliche Verteilung in der Zelle wie SNAP-ephrin-A5, was durch Koexpressionsexperimente (siehe 3.9) zu erwarten war.



**Abbildung 3.12: Lokalisation von SNAP-EphA3 in Hühnerfibroblasten.** SNAP-EphA3 wurde in primären Hühnerfibroblasten exprimiert, seriell jeweils 30 min mit BG-ATTO488 und BP-TMR gefärbt, fixiert und mit Phalloidin das Aktinzytoskelett gefärbt. **A:** Die BG-ATTO 488-Färbung markiert SNAP-EphA3 an der Zelloberfläche und in Aggregaten zwischen Zellkern und äußerer Zellmembran. **B:** BP-TMR gefärbtes SNAP-EphA3 ist vor allem in Kompartimenten des intrazellulären Membransystems (ER, Golgi) zu erkennen, wo es größere Kompartimente anfärbt. Es koloalisiert aber auch mit der BP-Färbung im in potentiell endosomalen Aggregaten. **C:** Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts von transfizierten und untransfizierten Zellen. **D:** Die Überlagerung beider SNAP-Färbungen verdeutlicht, dass sich zwei Subpopulationen von SNAP-EphA3 anfärben lassen (Oberflächen-assoziiert und intrazellulär), die in vermutlich endosomalen Strukturen koloalisieren. Maßstab 20 µm.

Die BG-ATTO488-Färbung ist auf die Zelloberfläche und die vermutlich endosomalen Strukturen beschränkt (Abbildung 3.12 A). Die BP-TMR-Färbung (Abbildung 3.12 B) ist zwar ähnlich wie die SNAP-ephrin-A5-Färbung lokalisiert, also in Kompartimenten des intrazellulären

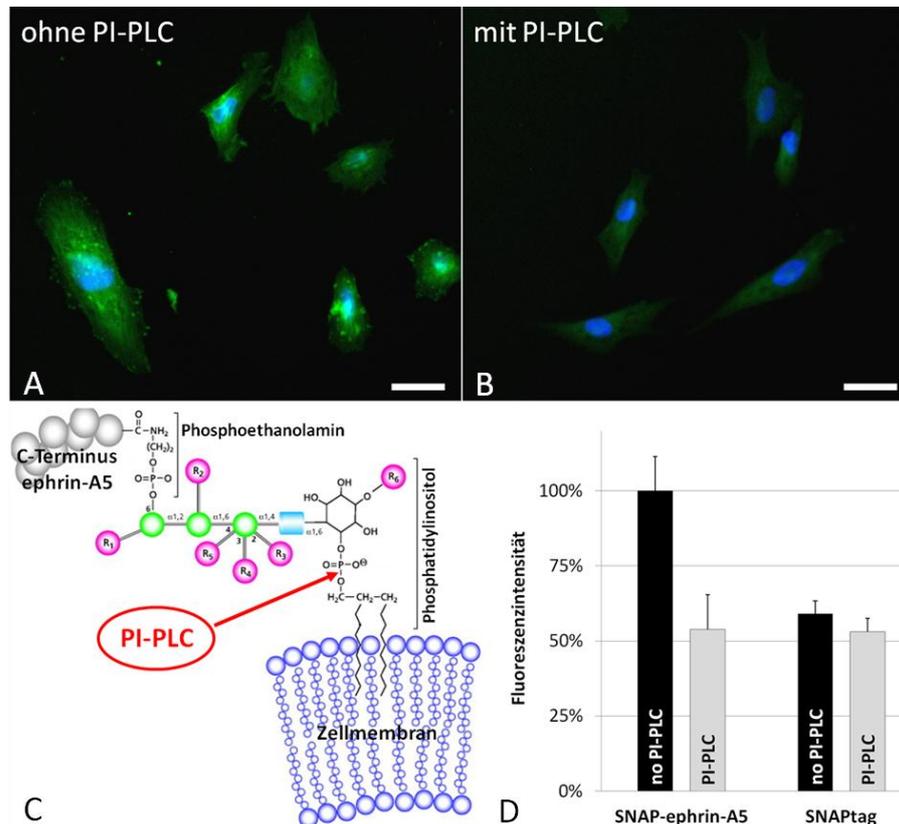
Membransystems, aber auch in diskreten Aggregaten in denen sie partiell mit der BG-Färbung kolokalisiert (Abbildung 3.12 C). Diese kolokalisierten Bereiche könnten in beiden Fällen (SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3) Zellkompartimente sein, in denen sich Proteinreifung und Endozytose überschneiden. In den folgenden Experimenten wird der Fokus von der Lokalisierung auf die Funktionalität der SNAP-Proteine verschoben.

#### **3.3.4 SNAP-ephrin-A5 wird korrekt in der Membran verankert und bindet die extrazelluläre Domäne seines Rezeptors EphA3**

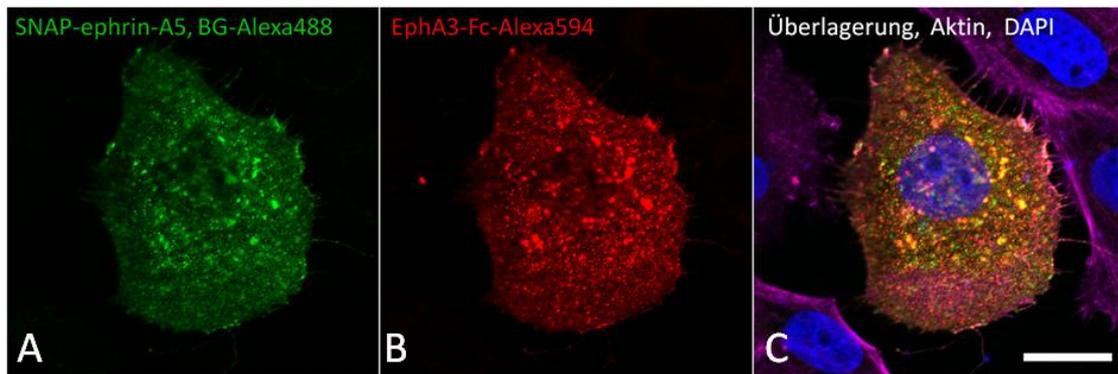
Die bisherigen Experimente befassten sich vor allem mit der Lokalisierung der SNAP-Fusionsproteine und zeigten unter anderem, dass diese auch mit nicht Zellmembran-permeablem BG-Fluorophor reagieren und daher an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Um zu überprüfen, ob diese Oberflächenlokalisierung im Falle des SNAP-ephrin-A5 tatsächlich auf einen korrekt an das Fusionsprotein angefügten GPI-Anker zurückzuführen ist, wurden Experimente mit einer Phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) durchgeführt (Abbildung 3.13 C). Dafür wurde SNAP-ephrin-A5 in primären Hühnerfibroblasten exprimiert, 30 min mit BG-ATTO488 die oberflächenständigen SNAP-Proteine gefärbt und anschließend 30 min bei 37°C mit 0,3 U/ml PI-PLC (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in serumfreiem Medium behandelt (Abbildung 3.13 B) oder nur in serumfreiem Medium inkubiert (Abbildung 3.13 A). Anschließend wurden die Zellen fixiert und eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. In einem Versuchsansatz konnte durch PI-PLC Behandlung das BG-ATTO488 Signal um die Hälfte reduziert werden (Abbildung 3.13 D). Eine Reproduktion mit PI-PLC aus einer anderen Charge des gleichen Herstellers oder mit PI-PLC eines anderen Herstellers (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in gleichem Ausmaß war jedoch nicht möglich. In Abbildung 3.13 ist das Ergebnis des positiven Versuchs gezeigt. Prinzipiell scheint eine Abspaltung des SNAP-ephrin-A5 mit PI-PLC demnach möglich. Dies deutet auf eine korrekte Verankerung des SNAP-ephrin-A5 über den GPI-Anker in der Zellmembran hin.

Um die richtige Verankerung in der Membran zu bestätigen und gleichzeitig zu prüfen, ob SNAP-ephrin-A5 in der Lage ist, seinen Rezeptor zu binden, wurden Versuche mit EphA3-Fc durchgeführt. Dieses rekombinante Protein besteht aus der extrazellulären Domäne des EphA3 und einem Fc-Tag. Bevor es zu SNAP-ephrin-A5 exprimierenden HeLa-Zellen gegeben wurde, erfolgte eine Präinkubation mit einem fluoreszent markierten Antikörper gegen den Fc-Tag. Dieser Komplex aus EphA3-Fc und Antikörper diente als Affinitätssonde gegen BG-Alexa488 gefärbtes SNAP-ephrin-A5 (Abbildung 3.14). Die Affinitätssonde kolokalisiert stark mit SNAP-ephrin-A5 in Aggregaten nahe der Zelloberfläche und in endosomalen Strukturen. Dies zeigt, dass SNAP-ephrin-A5 an EphA3-Fc bindet und die Komplexe vermutlich endozytiert werden.

Vereinzelte Signale der Affinitätssonde, die nicht mit der BG-Färbung kolokalisieren (nur rot), sind vermutlich auf endogen exprimiertes ephrin-A1 zurückzuführen (Alford et al., 2010). Die BG-gefärbten Aggregate, die nicht mit der Affinitätssonde kolokalisieren (nur grün), enthalten vermutlich SNAP-ephrin-A5, das endosomal lokalisiert ist. Dies könnte auf eine Regulation des ephrin-A5 über das langsame Proteinrecycling hinweisen.



**Abbildung 3.13: Das Oberflächensignal von SNAP-ephrin-A5 lässt sich mit PI-PLC reduzieren.** Primäre Hühnerfibroblasten wurden mit SNAP-ephrin-A5 transfiziert, 30 min mit BG-ATTO488 gefärbt und weitere 30 min in serumfreien Medium mit oder ohne 0,3 U/ml PI-PLC (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) inkubiert, gewaschen, fixiert, mit DAPI der Kern gefärbt und mit gleicher Belichtungszeit fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Anmerkung: im Gegensatz zu den bisher in dieser Arbeit dargestellten Aufnahmen wurde kein Apotome-Modus verwendet). **A:** Es ist eine deutliche BG-Färbung des SNAP-ephrin-A5 in unbehandelten Hühnerfibroblasten zu erkennen. **B:** Durch die PI-PLC-Behandlung wird das Signal deutlich reduziert. Maßstab 20  $\mu$ m. **C:** Angriffsstelle der PI-PLC. Diese Phospholipase schneidet spezifisch Phosphatidylinositol. Dadurch können GPI verankerte Proteine aus der Zellmembran entfernt werden. Schematisch ist der Trimanosyl-Glucosamin-Kern (grün, hellblau) des GPI-Ankers und seine möglichen Modifikationen (magenta) dargestellt. Der C-Terminus des ephrin-A5 ist über eine Phosphodiesterbindung mit dem Phosphoethanolamin-Rest mit dem Moleküllern verbunden. Am Glucosamin ist das Glycoprotein über das Phosphatidylinositol mit seinem hydrophoben Anteil in der Zellmembran verankert. (Abbildung verändert, Produktkatalog Sigma-Aldrich). **D:** Quantifizierung der Ergebnisse. Die Fluoreszenzintensität der BG-ATTO488 Färbung des SNAP-ephrin-A5 wird durch die PI-PLC-Behandlung um fast die Hälfte verringert. Als Negativkontrolle dient pSNAPtag, bei dem kein Einfluss der PI-PLC auf die Signalintensität auf die BG-ATTO488-Färbung zu erkennen ist. Die Anzahl unabhängiger Experimente ist  $n = 1$ ; 25 Zellen pro Kondition. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

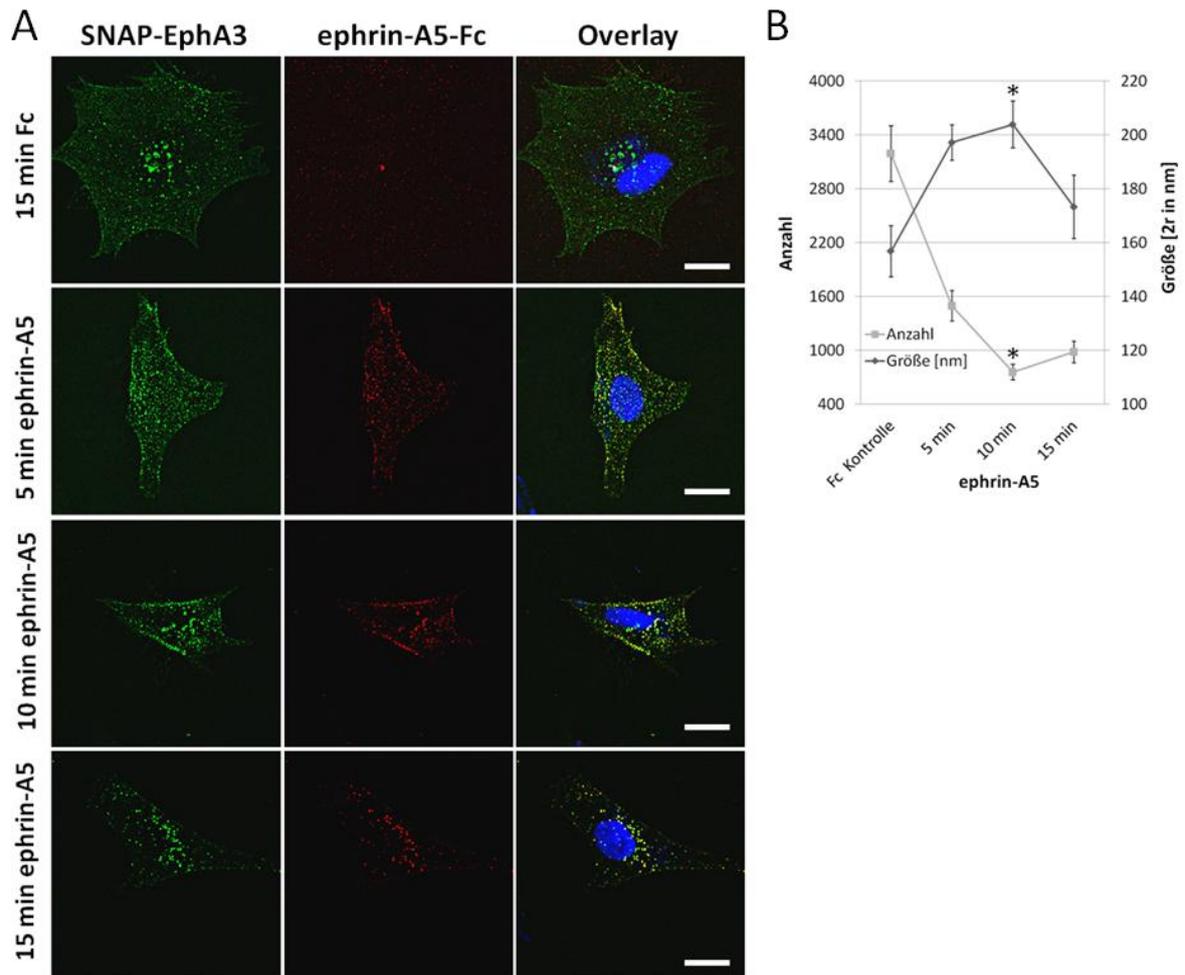


**Abbildung 3.14: SNAP-ephrin-A5 bindet die extrazelluläre Domäne von EphA3-Fc.** Mit SNAP-ephrin-A5 transfizierte HeLa-Zellen wurden 30 min mit BG-Alexa488 gefärbt und anschließend 20 min mit einem Konjugat aus EphA3-Fc und anti-Fc-Alexa594 behandelt. **A:** Die BG-Färbung des SNAP-ephrin-A5 zeigt kleine Cluster an der Oberfläche und größere Aggregate, die vor allem perinukleär lokalisiert sind. **B:** Das Signal des EphA3-Fc-Antikörper-Konjugats zeigt eine sehr ähnliche Verteilung wie die BG-Färbung. **C:** Große Anteile der Färbung kolokalisieren (gelb), vor allem in den vermutlich intrazellulären, endosomalen Aggregaten. Dies deutet auf Bindung von EphA3-Fc an SNAP-ephrin-A5 und Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes hin. Zusätzliche Färbungen: Phalloidin-Alexa647 (magenta), DAPI (blau). Maßstab 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.5 Lösliches ephrin-A5-Fc induziert Aggregation von SNAP-EphA3.

Um zu überprüfen ob SNAP-EphA3 seinen Liganden ephrin-A5 bindet, wurden primäre Hühnerfibroblasten mit pSNAP-EphA3 transfiziert, auf PLL/FN-Deckgläsern kultiviert und 30 min mit BG-ATTO488 gefärbt. Der Ligand ephrin-A5-Fc wurde mit einem Alexa594-gekoppelten Antikörper gegen den Fc-Anteil im molaren Verhältnis 1:1 geclustert und in das Zellkulturmedium gegeben. Als Kontrolle diente eine 15 minütige Behandlung mit Fc-Protein, das mit dem gleichen Antikörper präinkubiert wurde. Nach 5; 10 und 15 min wurden die Ansätze fixiert und mit *Structured Illumination Microscopy* ausgewertet. In Abbildung 3.15 A sind optische Schnitte aus dem Kontaktbereich der jeweiligen Zelle zum Substrat zu sehen. Die Ebene ist so gewählt, dass Signale detektiert werden, die aus der Zelloberfläche oder oberflächennahen Regionen (bis maximal 1  $\mu\text{m}$  ins Zellinnere) stammen. Bei allen untersuchten Konditionen ist ein Signal der BG-Färbung deutlich zu erkennen. Zellen die mit Fc behandelt wurden, zeigen sowohl eine eher homogene Oberflächenfärbung, als auch kleinere eher in der Peripherie lokalisierte Aggregate, sowie größere Aggregate in der Nähe des Zellkerns. Dies ähnelt stark der BG-Färbung, die in Abbildung 3.12 zu sehen ist. Im roten Kanal ist kein spezifisches Signal zu erkennen. Doch bereits nach 5 min Behandlung mit dem ephrin-A5-Fc-Antikörperkonjugat ist ein starkes Signal dieser Affinitätssonde zu erkennen, das fast gänzlich mit der BG-Färbung kolokalisiert. Dies legt eine Interaktion des Rezeptor/Liganden-Paares nahe. Interessanter Weise verändert sich die Struktur der BG-Färbung mit zunehmender Behandlungsdauer. Es bilden sich zunehmend Aggregate von SNAP-EphA3 an oder knapp unterhalb der Oberfläche, deren Anzahl

über die Zeit ab- und deren Durchmesser leicht zunimmt. Nach 10 min ist das Maximum dieses Effekts erreicht. Die durchschnittlich 3000 SNAP-EphA3 Aggregate mit einer mittleren Größe von 160 nm verringern sich auf unter 1000 mit einem mittleren Durchmesser von etwas über 200 nm (Abbildung 3.15 B). Weitere Effekte sind die Abnahme der Zellgröße um knapp 40 %, sowie eine leichte Konzentration der Aggregate zum Zentrum hin. Im Gegensatz zur Aggregation selbst, sind diese Effekte jedoch nicht statistisch signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, dass SNAP-EphA3 seinen Liganden binden kann und diese Interaktion die Dynamik des Proteins deutlich beeinflusst. Die Aggregation des BG-Signals kann sowohl die Bildung von Clustern in der Zellmembran, als auch endozytotische Ereignisse widerspiegeln. Auf Grund der Größe der Aggregate ist eine endosomale Akkumulation wahrscheinlich. Die Kollokalisierung dieser Aggregate mit dem Signal der Affinitätssonde sowie der zeitliche Ablauf der Aggregatbildung sind klare Indizien dafür, dass diese von ephrin-A5 induziert werden und dafür, dass die SNAP-EphA3-ephrin-A5-Komplexe endozytiert werden. Die Verringerung der Zellgröße könnte ein zellulärer Effekt der Eph/ephrin Signaltransduktion sein und damit ein Hinweis auf die Funktionalität des SNAP-EphA3. Zusammen zeigen die Ergebnisse aus diesem Versuch, dass SNAP-EphA3 seinen Liganden ephrin-A5 an der Zelloberfläche bindet und demnach die Ligandenbindung nicht vom SNAP-Tag gestört wird. Die Beobachtung der Aggregation der EphA3-ephrin-A5-Komplexen und deren Dynamik bezüglich der Größe und Lokalisation stehen darüber hinaus in Einklang mit bereits beschriebenen Phänomenen innerhalb des Eph/ephrin-Systems, wie der Bildung von Clustern (Torres et al., 1998; Wimmer-Kleikamp et al., 2004; Seiradake et al., 2013) und Koendozytose (Marston et al., 2003; Zimmer et al., 2003; Cowan et al., 2005; Egea und Klein, 2007), was die Funktionalität des SNAP-EphA3 bestätigt.



**Abbildung 3.15: Lösliches ephrin-A5 induziert Aggregation von SNAP-EphA3.**

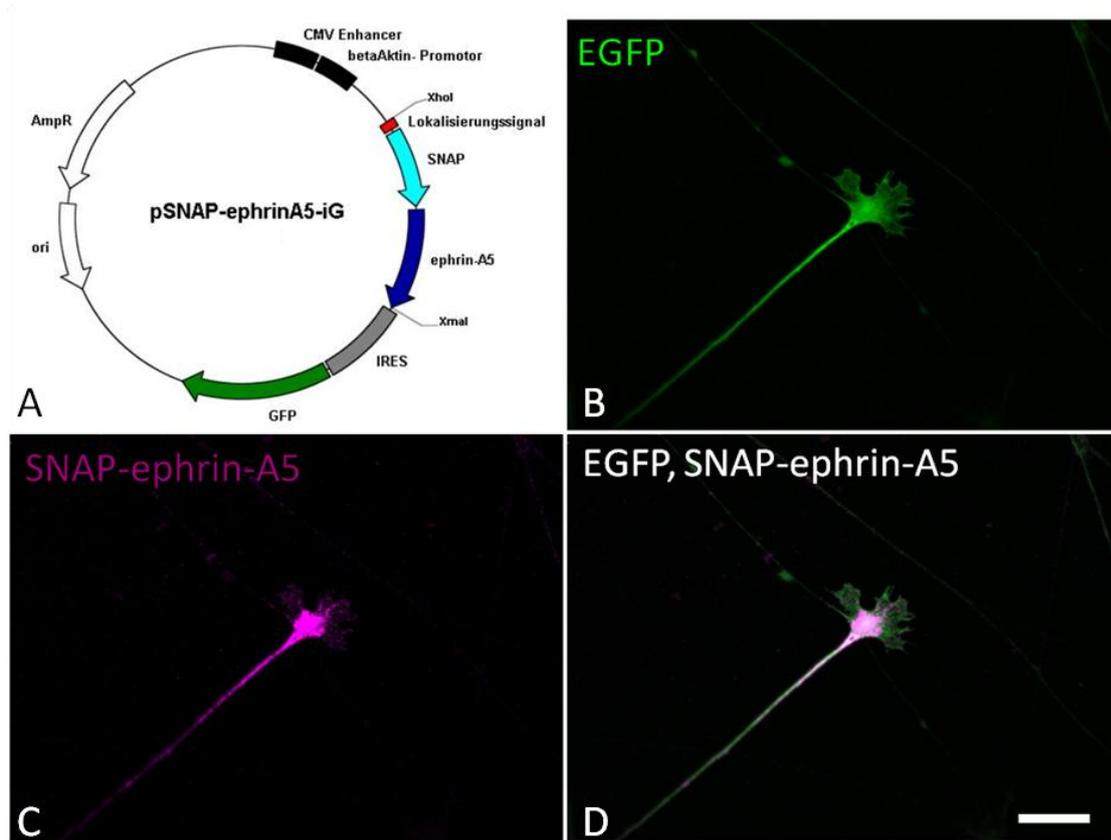
SNAP-EphA3 exprimierende PCFs wurden 30 min mit BG-Alexa488 gefärbt. Rekombinantes ephrin-A5-Fc wurde mit einem anti-Fc-Alexa594-Antikörper präinkubiert und zu den bereits gefärbten Zellen gegeben. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Zellen mit PFA fixiert. Als Kontrolle diente geclustertes Fc- Protein in der gleichen Konzentration (100 ng/ml Endkonzentration). **A:** Es ist jeweils die Färbung des BG-Alexa488 (grün) und der Affinitätssonde (rot) zu sehen. Im Overlay ist zusätzlich die Zellkernfärbung dargestellt (DAPI, blau). Die ephrin-A5-Fc-Alexa594-Sonde bindet an das exprimierte SNAP-EphA3 (gelb im Overlay), die Fc-Alexa594-Sonde nicht. Über die Zeit bilden sich größere Aggregate von EphA3 in den Bereichen, in denen der Ligand gebunden wurde. Des Weiteren nimmt die Zellfläche ab. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . **B:** Quantifizierung der Aggregate. Nach Setzen eines Schwellenwertes wurde die Größe und die Anzahl vorhandener Partikel der SNAP-Färbung bestimmt. Nach 10 min ist der maximale Effekt zu erkennen. Die Aggregate werden weniger und ihr Durchmesser nimmt zu. 5 Zellen pro Kondition. T-Test Fc gegen 10 min ephrin-A5  $p < 0,05$ .

### **3.4 Untersuchungen der Proteindynamik membranständiger SNAP-ephrin-A5 Moleküle in Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen in Abhängigkeit des Substrats.**

In diesem Teil der Doktorarbeit wurden die methodischen Ergebnisse und Erfahrungen aus Teil 3.1 und 3.2 mit den erfolgreich klonierten SNAP-Fusionsproteinen aus Teil 3.3 kombiniert, um diese in retinalen Ganglienzellen funktionell zu exprimieren. Von besonderem Interesse war die Fragestellung, ob sich die Menge an Oberflächenproteinen durch die Verwendung verschiedener Substrate beeinflussen lässt. Hierzu wurden die kodierenden Sequenzen für SNAP-ephrin-A5 inklusive der Lokalisierungssignale aus pSNAP-ephrin-A5 in pCAGJCiresGFP umklontiert und mittels der optimierten Elektroporationsmethode in retinalen Ganglienzellen exprimiert. Ebenso wurde SNAP-EphA3 umklontiert. Da aber nur das SNAP-ephrin-A5 erfolgreich in ausreichendem Maße exprimiert werden konnte, sind keine verwertbaren Daten mit SNAP-EphA3 in retinalen Ganglienzellen produziert worden. Hier sind daher nur Ergebnisse zur Expression von SNAP-ephrin-A5 aufgeführt.

#### **3.4.1 Expression von SNAP-ephrin-A5 in retinalen Ganglienzellen**

SNAP-ephrin-A5 wurde aus pSNAP-ephrin-A5 in pCAGJCiresGFP (erhalten von Dr. Joel Levine, Stony Brook, NY, USA) umklontiert (Abbildung 3.16 A). Dieser Vektor enthält denselben CAG Promotor, dessen Funktionalität in 3.1 gezeigt wurde. Die ebenfalls im Plasmid enthaltene IRES ermöglicht eine Translation von EGFP, abgelesen von der gleichen mRNA wie SNAP-ephrin-A5 und dient als Marker für erfolgreiche Transfektion. Das Plasmid wurde mittels der optimierten *ex ovo* Elektroporationsmethode (siehe 2.4.4 und Abbildung 3.5) in retinale Zellen eingebracht und Streifenexplantate 48 h auf Laminin inkubiert. Die Explantatkulturen wurden fixiert, permeabilisiert und der SNAP-Tag des exprimierten SNAP-ephrin-A5 immunhistochemisch nachgewiesen. Die erfolgreiche Expression im Axon und Wachstumskegel einer retinalen Ganglienzelle ist in Abbildung 3.16 an Hand von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu sehen. Sowohl der Transfektionsmarker EGFP (Abbildung 3.16 B) als auch das immunhistochemisch nachgewiesene SNAP-ephrin-A5 (Abbildung 3.16 C) ist zu erkennen. Beide Signale sind deutlich stärker, als die durch die Fixierung induzierte Fluoreszenz, deren Signal an den umliegenden, nicht transfizierten Axonen auszumachen ist. Während das zytosolische EGFP eher gleichmäßig in Axon und Wachstumskegel verteilt ist, zeigt die immunhistochemische Färbung von SNAP-ephrin-A5 eine stärkere Färbung in der C- Zone und des Axonschafts, die vermutlich auf intrazelluläres SNAP-ephrin-A5 zurückzuführen ist. Um dies zu klären und den Fokus auf die Fragestellung der Oberflächendynamik zu legen, wurde zunächst eine Färbung des oberflächenständigen SNAP-ephrin-A5 etabliert (3.4.2).

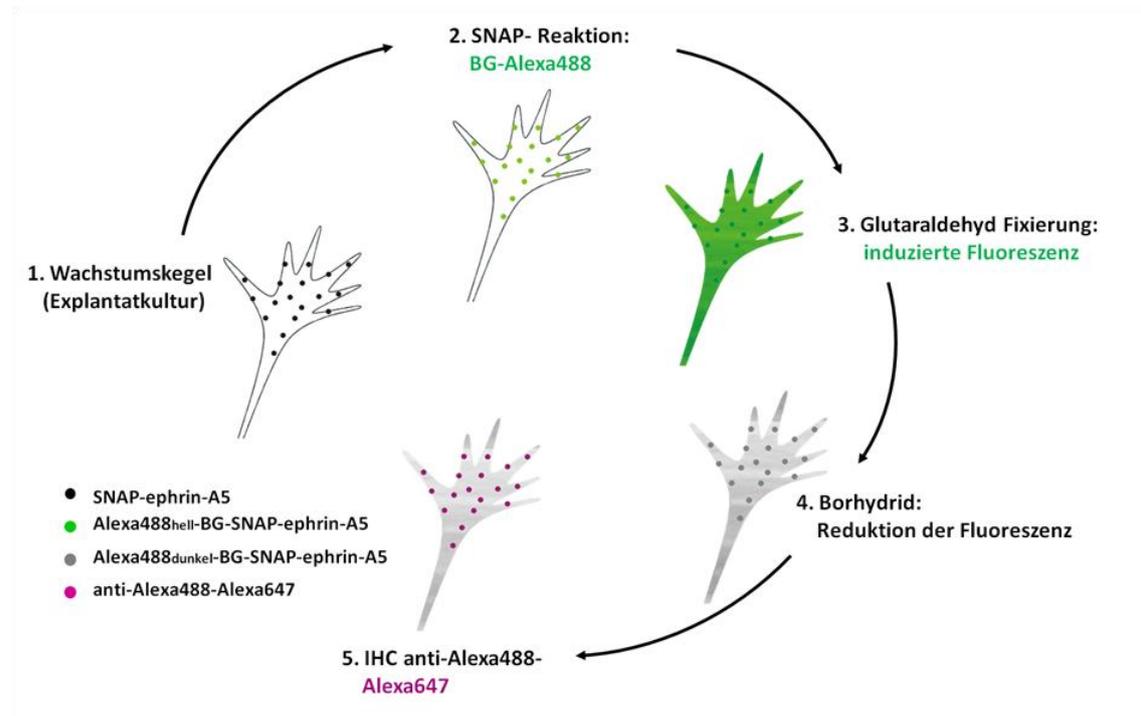


**Abbildung 3.16: Bicistronische Expression von SNAP-ephrin-A5 und EGFP in retinalen Ganglienzellen führt zu unterschiedlichen Lokalisationen der Expressionsprodukte im Axon. A:** Plasmidkarte pSNAP-ephrin-A5-iG. Unter der Kontrolle des CMV- $\beta$ -Aktin-Fusionspromotors CAG werden bicistronisch zwei Proteine kodiert: SNAP-ephrin-A5 und EGFP. Nach der Transkription einer gemeinsamen mRNA werden SNAP-ephrin-A5 und durch die IRES (*internal ribosomal entry site*) EGFP translatiert. **B-C:** Fixiertes und permeabilisiertes Axon einer retinalen Ganglienzelle. **B:** Homogenes, zytosolisches Signal des Transfektionsmarkers EGFP. **C:** Immunhistochemische Färbung von SNAP-ephrin-A5. Das Signal befindet sich im Axon und dem Wachstumskegel. Besonders stark ist es im Axonschaft und der C-Zone des Wachstumskegels. **D:** Überlagerung von B und C verdeutlicht die unterschiedliche Lokalisation des EGFP und SNAP-ephrin-A5, was auf eine aktive Regulation der Lokalisation des SNAP-ephrin-A5 im Axon hinweist. Maßstab 10  $\mu$ m.

### 3.4.2 Färbung von oberflächenständigem SNAP-ephrin-A5

Die Färbung mit BG-gekoppelten Fluorophoren lieferte keine ausreichende Signalstärke auf dem fluoreszierenden Hintergrund, der durch die Fixierung entsteht. Im Gegensatz zu den Zellen, die in Teil 3.3 verwendet wurden, ist für den Erhalt der Morphologie der Wachstumskegel eine Fixierung mit 4 % PFA und 0,15 % Glutaraldehyd nötig. Der Glutaraldehyd induziert konjugierte Doppelbindungen und damit eine Hintergrundfluoreszenz in allen Kanälen. Es wurden BG-ATTO549, BG-ATTO488, BG-DY647 und BG-Alexa594 getestet. In keinem Fall war ein ausreichend starkes, spezifisches Signal zu erkennen. Grünfluoreszierende BG-Fluorophore wurden zunächst nicht getestet, da sie nicht vom detektierbaren Signal des gekoppelt exprimierten

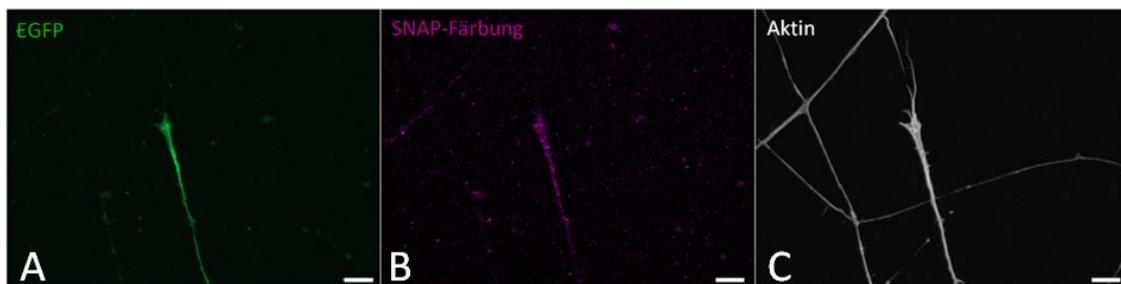
EGFP zu unterscheiden wären. Zur Verbesserung des Signal-Hintergrund-Verhältnisses wurde Natriumborhydrid verwendet. Dies reduziert die Hintergrundfluoreszenz, aber auch das spezifische Fluoreszenzsignal, das durch die Reaktion mit den BG-Fluorophoren entsteht. Das Signal des gekoppelt exprimierten EGFP wird jedoch nur in geringem Ausmaß beeinflusst.



**Abbildung 3.17: Färbeprozedur zum Nachweis des membranständigen SNAP-ephrin-A5.** Nach Färbung der lebenden Explantatkulturen für 35 min mit BG-Alexa488 erfolgt eine Fixierung mit 4 % PFA und 0,15 % Glutaraldehyd. Glutaraldehyd ist notwendig, um die Struktur der Wachstumskegel zu erhalten und deren Kollabieren während der Fixierung zu verhindern. Die Glutaraldehydfixierung induziert jedoch eine starke Hintergrundfluoreszenz in allen Kanälen. Diese wird mit Natriumborhydrid reduziert. Das Natriumborhydrid reduziert ebenso die Fluoreszenz des gebundenen SNAP-Substrates. Durch eine immunhistochemische Färbung des gebleichten Fluorophors, erhält man wieder ein detektierbares Signal der SNAP-ephrin-A5-Benzyl-Alexa488-Verbindungen.

Um dennoch die Verbindung aus SNAP-ephrin-A5 und Fluorophor zu detektieren, wurde eine Antikörperfärbung gegen das, nach der SNAP-BG-Fluorophor-Reaktion kovalent an den SNAP-Tag gebundene, Fluorophor ergänzt. Die einzige kommerziell erhältliche Kombination von BG-Fluorophor und spezifischem Antikörper war zu diesem Zeitpunkt BG-Alexa488 und anti-Alexa488 Antikörper. Die Färbeprozedur ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Das gekoppelt exprimierte EGFP ist in dieser Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. In Abbildung 3.18 ist ein transfiziertes und gefärbtes Axon in der Umgebung anderer Phalloidin-Alexa594 gefärbter Axone zu sehen. Das EGFP ist deutlich detektierbar und das Signal zeigt auch

nach der Natriumborhydrid-Behandlung eine ausreichende Intensität (Abbildung 3.18 A). Das Signal der BG-488/anti-Alexa488-Färbung (magenta) des SNAP-ephrin-A5 (Abbildung 3.18 B) färbt spezifisch, das transfizierte Axon. Umliegende nicht transfizierte Axone sind nur in der Aktinfärbung deutlich zu erkennen. Die BG-Färbung des Wachstumskegels besteht aus einer homogenen Oberflächenfärbung und ebenfalls homogen verteilten größeren Aggregaten. Diese Verteilung erinnert an die BG-Färbung der primären Hühnerfibroblasten im des Lamellipodiums (Abbildung 3.11 A) in kleinerem Maßstab. Die Kombination aus Färbung mit BG-Alexa488 und Immunhistochemie ist demnach geeignet um SNAP-Fusionsproteinen im Wachstumskegel nachzuweisen, wie auch die folgenden Experimente zeigen.



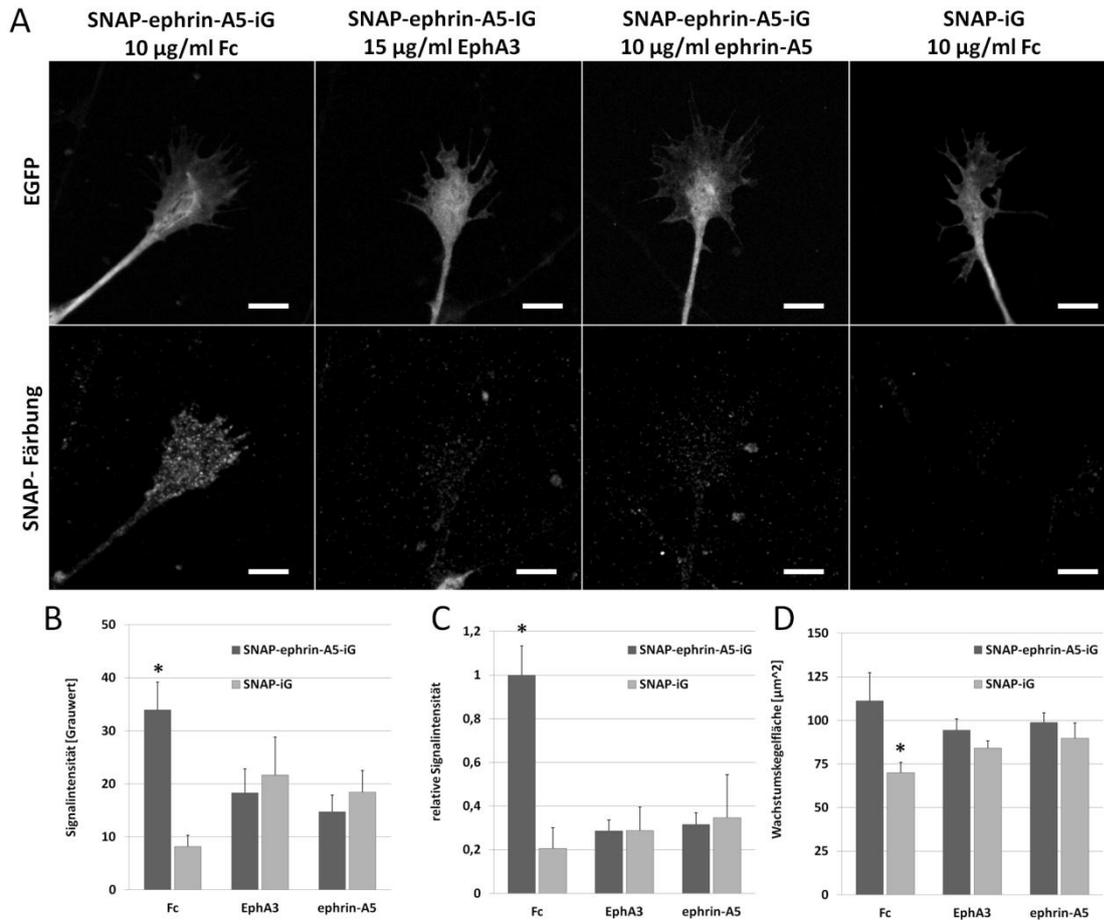
**Abbildung 3.18: SNAP-ephrin-A5 ist in der Membran von retinalen Axonen detektierbar.**

Explantatkulturen pSNAP-ephrin-A5iG transfizierter Retinae wurde wie in Abbildung 3.17 dargestellt gefärbt. **A:** Auch nach der langen Färbeprozedur ist der Transfektionsmarker EGFP noch detektierbar. **B:** Die Kombination aus BG-Färbung und Immunhistochemie liefert ein ausreichendes Signal auf dem transfizierten Axon. **C:** Phalloidin-Färbung gegen das Aktinzytoskelett zeigt transfizierte und untransfizierte Axone. Maßstab 10 µm.

#### **3.4.3 Das axonale Lenkungsmolekül ephrin-A5 wird auf Oberflächen retinaler Wachstumskegel durch exogenes, substratgebundenes EphA3 und ephrin-A5, stark reduziert**

Die bisherigen in Teil 3.4 gezeigten Ergebnisse zeigten, dass das SNAP-ephrin-A5-iG Plasmid erfolgreich in retinalen Ganglienzellen exprimiert werden kann und das SNAP-ephrin-A5 an der Oberfläche von Axonen und Wachstumskegeln lokalisiert ist. Die Funktionalität des oberflächenständigen SNAP-ephrin-A5 konnte bereits in Teil 3.3 gezeigt. Um die Wirkung des *forward* und *reverse signalings* auf die SNAP-ephrin-A5-Lokalisation in auswachsenden Axonen zu untersuchen, wurden zunächst homogen beschichtete Deckgläser verwendet. Hierzu wurden gereinigte Deckgläser mit Poly-L-Lysin und anschließend mit ephrin-A5-Fc oder EphA3-Fc oder Fc- Protein überschichtet. Es folgte eine finale Überschichtung mit Laminin, um axonales Auswachsen zu gewährleisten. Im Folgenden werden die kombinierten Proteinsubstrate vereinfacht als Fc-, EphA3- und ephrin-A5-Substrat bezeichnet. Streifenexplantate von mit pSNAP-ephrin-A5-iG transfizierten Retinae wurden 48 h auf diesen Substraten inkubiert. Es

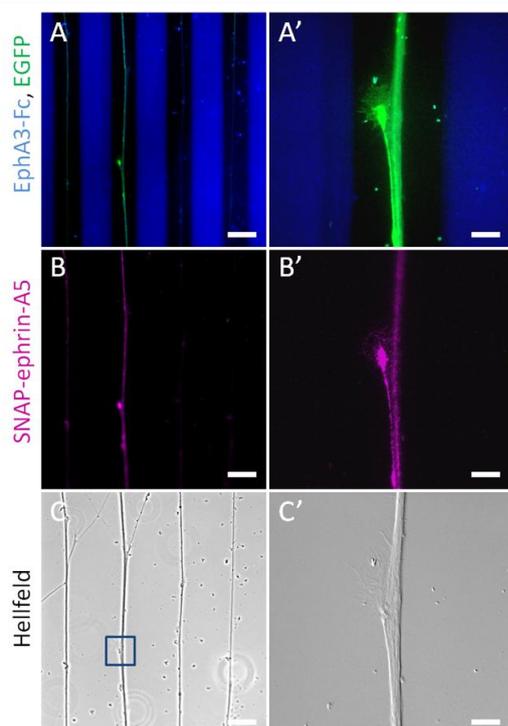
folgte eine 35 minütige Inkubation mit BG-Alexa488, Fixierung und der immunhistochemische Nachweis der BG-Alexa488 gefärbten SNAP-ephrin-A5-Moleküle (Abbildung 3.17). Anhand der EGFP-Expression wurden transfizierte Wachstumskegel unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und Aufnahmen im EGFP und Alexa647 Kanal gemacht (Abbildung 3.19). Auf Fc-Substraten kultivierte Wachstumskegel zeigen eine Oberflächenfärbung und homogen verteilte Aggregate von SNAP-ephrin-A5 (3.19 A, links). Dies ähnelt der BG-Färbung Färbung von SNAP-ephrin-A5 im Lamellipodium primärer Fibroblasten (Abbildung 3.11). Es sind in den Wachstumskegeln aber deutlich mehr Aggregate zu erkennen, was auf eine höhere endozytotische Aktivität hinweisen könnte. Auf EphA3-Substraten ist die Oberflächenfärbung interessanterweise stark reduziert, nur schwach fluoreszierende Aggregate sind zu erkennen. Es ist keine intrazelluläre Akkumulation der BG-Färbung zu beobachten, wie es im Falle der nichtneuronalen Zellen zu sehen war. Demnach war während der 35 minütigen BG-Färbung nur sehr wenig SNAP-ephrin-A5 an der Zelloberfläche. Die wohl erstaunlichste Beobachtung in diesem Experiment ist jedoch die Reduktion der BG-Fluorophor gefärbten SNAP-ephrin-A5-Moleküle auf ephrin-A5-Substraten. Obwohl SNAP-ephrin-A5 nicht direkt an der Detektion des ephrin-A5-Substrats beteiligt ist, wird es in gleicher Art und in gleichem Ausmaß reguliert. Die Quantitative Auswertung dieser Reduktion ergab einen signifikanten Unterschied der mittleren Intensität der BG-Färbung, zwischen Wachstumskegeln auf Fc- und EphA3- beziehungsweise ephrin-A5-Substrat (Abbildung 3.19 B). Ein vergleichbarer Unterschied konnte in Wachstumskegeln, die das Kontrollplasmid pSNAP-iG exprimieren nicht detektiert werden. Um Schwankungen in der Transkriptionsstärke des Plasmids heraus zurechnen, wurde das SNAP-Signal auf das EGFP-Signal normiert. Der Effekt ist nun noch deutlicher zu erkennen (Abbildung 3.19 C). Die Flächen der Wachstumskegel sind innerhalb der SNAP-ephrin-A5 exprimierenden RGCs vergleichbar (Abbildung 3.20 D). Dies gilt auch innerhalb der mit dem Kontrollplasmid transfizierten RGCs. Generell sind die untersuchten Wachstumskegel, die pSNAP-ephrin-A5-iG exprimieren, jedoch etwas größer als die, die das Kontrollplasmid pSNAPiG exprimieren. Da die Wachstumskegelfläche bei der Normalisierung heraus gekürzt wird, ist dies jedoch nicht die Ursache für den beobachteten Reduktions-Effekt. Es konnte also erstmals gezeigt werden, dass Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen bei andauernder Stimulation mit homogen verteiltem, substratgebundenem EphA3 oder ephrin-A5, oberflächenständiges ephrin-A5 stark reduzieren. Die Ähnlichkeit in Qualität und Quantität dieses Effekts auf unterschiedlichen Substraten deutet auf einen ähnlichen Mechanismus hin. Es scheint eine bisher nicht beschriebene Koregulation der Dynamik des Rezeptor-Liganden-Paares im retinalen Wachstumskegel stattzufinden. In Verbindung mit weiteren, bisher unveröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe könnte dies auf eine koadaptive Regulation des ephrin-A5 und EphA3 hinweisen (siehe Diskussion).



**Abbildung 3.20: Reduktion des membranständigen SNAP-ephrin-A5 durch substratgebundenes EphA3 und ephrin-A5.** Transfizierte Explantatstreifen wurden 48h auf beschichteten Deckgläsern kultiviert und wie in Abbildung 3.17 dargestellt gefärbt und fixiert. **A:** Die obere Reihe zeigt die Expression des Transfektionsmarkers EGFP. Das Expressionslevel der gezeigten Wachstumskegel ist auf Fc, EphA3 und ephrin-A5 vergleichbar. Die untere Reihe zeigt die Färbung des BG-Fluorophor- gefärbten SNAP-ephrin-A5. Das Signal auf EphA3-Fc und auch auf ephrin-A5-Fc Substraten ist deutlich geringer als auf Fc-Substraten. Dies weist auf eine interessante Koregulation hin. Als Kontrolle dient das Plasmid pSNAPiG, in dem Lokalisierungssignal und ephrin-A5 fehlt. Somit wird zytosolisch SNAP und EGFP exprimiert. Maßstab 10 µm. **B, C, D:** Quantifizierung der Daten aus A. **B:** Intensität des SNAP-ephrin-A5 Signals als Grauwert. Der Unterschied des SNAP-ephrin-A5- Signals auf Fc- zu dem auf EphA3- und ephrin-A5-Substraten ist signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ). **C:** Intensitäten in Abhängigkeit zum Expressionsniveau. Relative Signalintensität: Quotient der Signalintensitäten von SNAP-ephrin-A5 und EGFP, normiert auf den Wert des Quotienten des Fc- Ansatzes. Der Unterschied des SNAP-ephrin-A5 Signals auf Fc zu allen anderen Konditionen ist signifikant (t-Test,  $p > 0,01$ ). **D:** Die Flächen der Wachstumskegel sind vergleichbar. Signifikante Unterschiede innerhalb der SNAP-ephrin-A5 Ansätze sind nicht ermittelbar. Jedoch ist bei Expression von SNAP-iG die Wachstumskegelfläche auf Fc-Substrat signifikant kleiner als bei Expression von SNAP-ephrin-A5 auf Fc (t-Test,  $p < 0,01$ ). Pro Kondition wurden mindestens 19 Wachstumskegel aus 7 unabhängigen Experimenten ausgewertet, ein unabhängiges Experiment entspricht einem Deckglas mit zwei transfizierten Explantatstreifen. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

### 3.4.4 Im EphA3-Streifenassay akkumuliert SNAP-ephrin-A5 in der C-Zone des Wachstumskegels

Um die Reaktion der SNAP-ephrin-A5-iG transfizierten Axone auf die Anwesenheit von inhomogen verteilten EphA3 zu testen, wurde ein Streifenassay mit EphA3-Fc durchgeführt. Transfizierte wie untransfizierte Axone vermeiden die EphA3-Fc- Streifen und wachsen auf den Laminin-Streifen (Abbildung 3.20 A-C). Dies entspricht früheren Beobachtungen untransfizierter Axone (Gebhardt et al., 2012) und schließt einen dominant-negativen Effekt des SNAP-ephrin-A5 auf das ephrin/Eph *reverse signaling* aus. Interessant ist, dass in diesem Fall, also auf strukturiertem EphA3-Substrat, die BG-Färbung des SNAP-ephrin-A5 verstärkt in der C-Zone des Wachstumskegels lokalisiert ist (Abbildung 3.20 A'-C'). Dies könnte auf eine kontaktvermittelte Endozytose hinweisen. Separate Wachstumskegel waren auf Grund des stark faszikulierten Wachstums im Streifenassay selten. Insbesondere weitere Wachstumskegel transfizierter Neurone waren nicht eindeutig zu identifizieren.



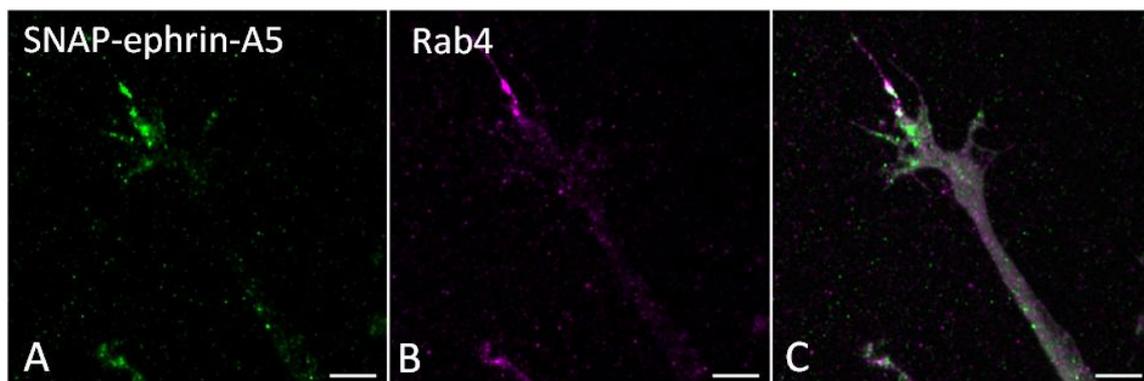
**Abbildung 3.20: Im EphA3-Streifenassay akkumuliert SNAP-ephrin-A5 in der C-Zone der Wachstumskegel.** Explantatkulturen einer mit pSNAP-ephrin-A5-iG transfizierten Retina wurden 48 h auf einem Streifensubstrat mit EphA3-Fc kultiviert. Es folgte die in Abbildung 3.17 dargestellte Färbung und Fixierung sowie eine Antikörperfärbung gegen den Fc-Anteil. **A bis C:** Die Axone, die den Transfektionsmarker EGFP exprimieren, vermeiden die blau dargestellten EphA3-Fc-Streifen (A) und zeigen auch die SNAP-Färbung (B). In der Hellfeldaufnahme (C) sind transfizierte und nichttransfizierte Axone zu erkennen, die faszikuliert wachsen und die EphA3-Fc-Streifen vermeiden. Maßstab 40  $\mu\text{m}$ . **A' bis C':** Die Detailaufnahme aus dem blau markierten Bereich in C zeigt einen transfizierten Wachstumskegel zwischen Faszikel und EphA3-Fc-Streifen. Die SNAP-Färbung ist stark in der C-Zone akkumuliert (A') aber auch auf dem übrigen Axon und Faszikel zu sehen. Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

Daher waren weitere Detailaufnahmen von transfizierten Wachstumskegeln und eine quantitative Auswertung des möglichen Effekts von strukturiertem EphA3-Substrat auf die Dynamik des SNAP-ephrin-A5 nicht möglich. Vergleicht man die Reduktion des SNAP-ephrin-A5 im Wachstumskegel auf homogenem Substrat mit der Akkumulation des SNAP-ephrin-A5 in der C-Zone des Wachstumskegels im Streifenassay, scheint entweder eine qualitativ unterschiedliche

Reaktion stattzufinden, oder es die gleiche endozytotische Reaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu sehen (siehe Diskussion).

#### 3.4.5 SNAP-ephrin-A5 kolokalisiert mit Rab4

Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen durch Endozytose regulierten Mechanismus der Adaptation des ephrin-A5 hin. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Beteiligung des schnellen Proteinrecyclings durch Rab4-positive Endosomen am gerichteten Wachstum in retinalen Axonen gezeigt (Falk et al., 2014). Um zu untersuchen ob auch das axonale Lenkungsmolekül ephrin-A5 über diesen Recyclingweg reguliert werden könnte, wurde eine Doppelfärbung mit BG-Alexa488 (Abbildung 3.21 A) und einem Antikörper gegen Rab4 (Abbildung 3.21 B) durchgeführt. Interessanterweise kolokalisieren SNAP-ephrin-A5 und Rab4 (Abbildung 3.21 C). Insbesondere in den Filopodien des Wachstumskegels scheint eine Beteiligung des schnellen Proteinrecyclings an der Regulation der Oberflächenkonzentration von ephrin-A5 vorzuliegen.



**Abbildung 3.21: Im retinalen Wachstumskegel kolokalisiert SNAP-ephrin-A5 mit Rab4.**

**A:** BG-Färbung gegen SNAP-ephrin-A5. (in grün dargestellt). **B:** BG-Färbung gegen SNAP-ephrin-A5 (in magenta dargestellt). **C:** Beide Färbungen kolokalisieren vor allem in den Filopodien. Dies deutet auf die Beteiligung des schnellen Proteinrecyclings über Rab-positive Endosomen bei der ephrin-A5-Regulation hin. Das Signal des Transfektionsmarkers EGFP ist in Graustufen dargestellt. Maßstab 10  $\mu\text{m}$

## 4. Diskussion

### 4.1 Koexpression der Par-Komplex-Komponenten PKC $\zeta$ und Par6 in retinalen Wachstumskegeln und der Einfluss von NG2 auf deren Lokalisation

Wie bereits in Teil 3.1 ausführlicher erklärt, fanden die dort beschriebenen Experimente im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Joel Levine (Stony Brook University, New York) statt und befassten sich mit der Rolle des Par-Komplexes bei der NG2-vermittelten inhibierenden Wirkung auf Axone. Teile der auch in dieser Dissertation dargestellten Ergebnisse (siehe 3.1.1) sind daher bereits publiziert (Lee et al., 2013). In dieser Publikation wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen NG2 vermittelter Inhibition axonalen Wachstums und dem Par-Komplex mit den Komponenten PKC $\zeta$ , Par6 und Par3 besteht. Für Neurone der Ratte (DRGCs: *dorsal root ganglion cell* und CGN: *cerebellar granule neurons*) wurde gezeigt, dass die Wachstum-inhibierende Wirkung des NG2 durch PKC $\zeta$  vermittelt wird. PKC $\zeta$  erwies sich hierbei als notwendig und hinreichend für die Wirkung des NG2. Außerdem wurde Cdc42 vermittelte Aktivierung von Par6 und PKC $\zeta$  sowie eine verstärkte Assoziation von Par6 und PKC $\zeta$  beobachtet. Ein weiterer Effekt war die Translokation von Par3 ins Zellinnere und eine damit verbundene Rac1 Aktivierung. Auch wenn der exakte Mechanismus noch nicht geklärt ist, konnte erstmals die direkte Beteiligung der Par-Komplex-Komponenten PKC $\zeta$ , Par6 und Par3 an der inhibitorischen Wirkung des CSPGs NG2 gezeigt werden. Da NG2 eine Hauptkomponente der nach einer Läsion des Zentralnervensystems gebildeten Glianarbe in höheren Vertebraten ist, liefern diese Ergebnisse einen neuen Ansatzpunkt für weitere Forschungen im Feld der Rückenmarksregeneration.

Um weitere Anhaltspunkte für die Wirkung des NG2 zu finden und um die Spezifität des PKC $\zeta$  vermittelten Mechanismus für die inhibitorische Wirkung des NG2 zu überprüfen, führte ich zusätzliche Versuche im visuellen System des Huhns durch. Dies schien geeignet, da NG2 auch im Bereich des optischen Nervs exprimiert wird (Butt et al., 2004). In der Tat konnte ich mit Hilfe des Streifenassays zeigen, dass retinale Axone auf binären Entscheidungssubstraten NG2 vermeiden (Abbildung 3.1) und, dass die Vermittlung dieses repulsiven Signals wie im Falle der DRGCs und CGNs abhängig von der Par-Komplex-Komponente PKC $\zeta$  ist. Ein inhibierendes Pseudosubstrat der PKC $\zeta$  hebt sowohl den repulsiven Effekt des NG2 auf retinale Axone, als auch die inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Rattenneurone auf. Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass PKC $\zeta$  als Teil des Par-Komplexes an der NG2-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist. Interessanter Weise konnte die repulsive Wirkung des axonalen Lenkungsmoleküls ephrin-A5 nicht mit dem PKC $\zeta$ -Inhibitor aufgehoben werden, was für eine

spezifische Wirkung der PKC $\zeta$  im NG2 Signalweg spricht. Um Hinweise darauf zu bekommen, ob der NG2 vermittelten repulsiven Wirkung auf die Axone retinaler Ganglienzellen ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegt wie der Inhibition des Wachstums in Rattenneuronen, überprüfte ich den Einfluss des NG2 auf die Lokalisation von Par6 und PKC $\zeta$ . Hierfür standen die bereits für neuronale Expression optimierten und getesteten Plasmide pCAGJC-dTomato-Par6c und pCAGJC-PKC $\zeta$ -EGFP (Abbildung 3.2) zur Verfügung. So konnte die Etablierung der Methode zur Transfektion retinaler Ganglienzellen mit einer konkreten Fragestellung im Rahmen einer Kooperation verknüpft werden. Koexpressionsexperimente mit den Fluorophor-gekoppelten Interaktionspartnern mit Hilfe der *ex ovo* Elektroporation (Yuasa-Kawada et al., 2003; Shintani et al., 2009) lieferten einen Eindruck über die Effizienz der Methode in Kombination mit retinalen Explantatstreifen, was ein Kernpunkt der Dissertation ist, aber auch Einblicke in einen möglichen Mechanismus der NG2-vermittelten Repulsion. Auf Laminin-Substraten ließ sich nach Zugabe von löslichem NG2 eine verstärkte Kolokalisation von Par6c und PKC $\zeta$  beobachten, vor allem aber eine verstärkte Assoziation der Par-Komponenten mit dem Tubulinzytoskelett. Die induzierte Kolokalisation von Par6 und PKC $\zeta$  wurde auch im Falle der Rattenneurone beobachtet, was die Annahme unterstützt, dass der NG2-vermittelten axonalen Repulsion der retinalen Axone ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde liegt, wie der Inhibition des axonalen Wachstums der Rattenneurone. Auch wurde in beiden Fällen eine Translokation des binären Komplexes aus Par6c und PKC $\zeta$  beobachtet, jedoch in unterschiedliche Kompartimente. Im Falle der Ratten-CGNs wurde eine Translokation in die äußere Plasmamembran des Somas beobachtet und im Falle der retinalen Ganglienzellen eine verstärkte Kolokalisation mit den Mikrotubuli. Dies könnte auf zwei unterschiedliche Varianten der PKC $\zeta$ -vermittelten Zellantwort hinweisen. Da die axonale Regeneration sowohl Aspekte des Wachstums, als auch der axonalen Lenkung beinhaltet, wäre eine solch vielseitige und zentrale Rolle des Par-Komplexes von großem Interesse. Auch wenn es ein bekanntes Phänomen ist, dass der Par-Komplex je nach Zelltyp und Kontext in sehr verschiedener Art und Weise agiert (Suzuki und Ohno, 2006) und auch eine direkte Interaktion von Par3 und Par6 mit Mikrotubuli beschrieben wurde (Homma et al., 2011; Chen et al., 2013), sind die Ergebnisse zur Lokalisation jedoch kritisch zu betrachten. Zum einen konnte in den Somata der retinalen Ganglienzellen ebenfalls eine Kolokalisation von Par6 und PKC $\zeta$  beobachtet werden, die zwar der in den CGNs ähnelt, aber unabhängig von NG2 zu sein scheint (vorläufige Ergebnisse, in dieser Arbeit nicht gezeigt), zum anderen ist die Beurteilung der Lokalisation auf Grund der Morphologie und geringen Größe neuronaler Zellen generell schwierig. Eine dafür nötige Berücksichtigung zahlreicher transfizierter Neurone und deren quantitative Auswertung war auf Grund der niedrigen Effizienz der verwendeten Methode (siehe Tabelle 3.1) in einem zeitlich vernünftigen Rahmen nicht möglich. Neben den interessanten Einblicken in die NG2-vermittelte, PKC $\zeta$ -abhängige Repulsion retinaler Axone verdeutlichten diese Experimente daher auch die Notwendigkeit einer optimierten Methode zur Retina-Transfektion.

## 4.2 Optimierung der Elektroporationsmethode für retinale Ganglienzellen

In dieser Arbeit wurde nach einem Weg gesucht, um das etablierte und bewährte *in vitro* Modell der retinalen Explantatkultur besser für genetische Techniken zugänglich zu machen. Grundsätzlich wird hierfür eine Methode benötigt, mit der man neuronale Zellen ohne deren Vereinzelung transfizieren kann. So kann die *in vitro* Kultur erweitert werden, ohne die bestehenden Vorteile der Explantatkultur gegenüber der Kultur vereinzelter Zellen, insbesondere das bessere Auswachen der Axone und die leichtere Identifikation der topographischen Identität, zu verlieren. Hierfür benötigt man eine Technik, die für die Transfektion postmitotischer Zellen geeignet ist, oder die Transfektion muss so früh stattfinden, dass im Zielgewebe noch proliferierende Vorläuferzellen vorhanden sind. Da relativ große rekombinante Proteine untersucht werden sollen, kommt das im Huhn gängige retrovirale RCAS-System nicht in Frage (siehe auch Einleitung 1.3). Chemische Transfektionsverfahren wie zum Beispiel Lipofektion sind eher für vereinzelte, sich teilende Zellen geeignet und daher hier ebenfalls ungeeignet. Die geeignetste Transfektionsmethode für die Expression größerer rekombinanter Proteine in der embryonalen Retina ist daher die Elektroporation. So ermöglicht Injektion von DNA in den subretinalen Spalt am dritten bis vierten Embryonaltag und anschließende Elektroporation auch die Transfektion von sich noch teilenden neuronalen Vorläufer-Zellen, die später zu retinalen Ganglienzellen ausdifferenzieren (Doh et al., 2010; Islam et al., 2012). Diese Methode wurde auch in dieser Arbeit angewendet (Abbildung 3.3). Betrachtet man nur die gelungene Transfektion der Retina als Erfolg, so liefert die *in ovo* Elektroporation der Retina zufriedenstellende Ergebnisse. In etwa jede fünfte Retina wird erfolgreich transfiziert und zeigt eine gesunde und intakte Morphologie. Auch wird bei der Betrachtung der Retinae deutlich, dass retinale Ganglienzellen transfiziert sind, deren Axone zum optischen Nervaustritt auswachsen und die somit ebenfalls gesund und intakt sind (Abbildung 3.4). Beurteilt man jedoch die Eignung für die Kombination mit Explantatkulturen, ist diese nur eingeschränkt vorhanden. Grund hierfür ist die Verteilung der transfizierten Zellen. Je nach Injektion entstehen ein bis zwei „Hotspots“ transfizierter Zellen, die nur einen Bruchteil des gesamten Gewebes umfassen. Da die Injektionsstelle am Präparationstag E7 verheilt ist, sind diese jedoch nicht beim Anlegen der Explantatkulturen erkennbar. Es wird daher die gesamte Retina verwendet und erst nach erfolgten Experimenten kann beurteilt werden, welche Streifen tatsächlich transfizierte Zellen enthalten. Somit muss der Großteil der angelegten Explantatkulturen verworfen werden. Eine Auswahl der transfizierten Streifen vor Anlegen der Explantatkulturen (zwischen Schritt 4 und 5, Abbildung 3.3) an Hand des fluoreszierenden Transfektionsmarkers schien daher angebracht. In der Tat konnte so der Ausschuss deutlich reduziert werden, jedoch wurde durch den zusätzliche Behandlungsschritt des frisch explantierten Gewebes das Auswachsen der Axone stark gestört. Explantatkulturen dieser Gewebestreifen zeigten immer eingeschränktes oder gar kein

Auswachsen, insbesondere der transfizierten Axone (vorläufige Ergebnisse, nicht im Ergebnisteil gesondert dargestellt). Ursache könnte ein fototoxischer Effekt oder einfach der zusätzliche Stress für das ohnehin beanspruchte Gewebe sein. Selbst wenn die Identifikation der transfizierten Gewebestreifen optimiert würde, etwa durch die Verwendung von fluoreszierenden Markern, die im Infrarotbereich angeregt werden können, oder durch längere Erholungsphasen für das retinale Gewebe, bliebe die Notwendigkeit eines fluoreszierenden Transfektionsmarkers und die nötige zusätzliche Mikroskopie, um die Methode erfolgreich in Kombination mit Explantatkulturen einzusetzen. Obwohl die *in ovo* Elektroporation eine exzellente Methode für die Transfektion für viele Regionen des Nervensystems im Huhn (De Vry et al., 2010) und auch der Retina ist, erwies sie sich für die Kombination mit *in vitro* Kulturen als weniger geeignet. Eine weitere Möglichkeit retinale Zellen innerhalb der embryonalen Retina zu transfizieren ist es, die Retina am gewünschten Embryonaltag (für Explantatkulturen E7) zu explantieren und danach *ex ovo* zu elektroporieren. Von den transfizierten Zellen können dann Kulturen angelegt werden (Yuasa-Kawada et al., 2003; Shintani et al., 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten mit der *ex ovo* Elektroporation Retinae transfiziert werden und zwar deutlich effizienter als mit der *in ovo* Methode. 80 bis 100 % der Retinae werden transfiziert. Aber auch hier zeigte sich die Verteilung der transfizierten Zellen als problematisch. Sie waren vor allem an den Randbereichen der Retina (Abbildung 3.6 A) und an Stellen mit Gewebeläsionen zu finden. Erfahrungsgemäß wachsen die Axone von Explantatkulturen aus diesen Regionen eher schlecht aus. Dennoch lieferte die beobachtete Verteilung einen klaren Ansatz zur Optimierung der Methode. Fügt man kontrollierte Läsionen im Gewebe vor der Elektroporation ein, indem man die Retina bereits vor der Elektroporation in Streifen hackt, lässt sich eine deutliche Erhöhung der Anzahl transfizierter Zellen im Bereich der Schnittkanten ausmachen (Abbildung 3.6 C). Hierfür können mehrere Ursachen in Betracht gezogen werden. Zunächst könnte die mechanische Perforation der Basallamina, die über den Zellen liegt, der DNA besseren Zugang zum retinalen Gewebe verschaffen. Außerdem ist eine durch die Läsion des Gewebes induzierte regenerative Proliferation denkbar, die die Aufnahme der DNA in den Zellkern sich teilender Zellen begünstigt. Ausgehend von diesen Ideen wurde die Basallamina nun auch enzymatisch perforiert. Durch Behandlung mit Accutase, einer Mischung aus proteolytischen insbesondere Kollagen-spaltenden Enzymen, werden die Hauptbestandteile der Basallamina anverdaut und die Basallamina dadurch durchlässiger gemacht. In der Tat führte die Behandlung zu einer breiteren Verteilung der transfizierten Zellen, was die erste Annahme bestätigte. Da Hacken und enzymatische Behandlung zu einer breiteren Verteilung transfizierter Zellen über die Retina führt, aber trotzdem noch entlang der Schnittkanten die Expression stärker ist (Abbildung 3.6 D), unterstützt dies auch die Annahme eines zweiten, vermutlich proliferativen Effekts. Da andere Parameter wie Pufferzusammensetzung und elektrische Konditionen innerhalb eines relativ breiten Rahmens ähnliche Ergebnisse liefern (Tabelle 3.2), sind die wichtigsten Einflüsse auf die

Effizienz der Methode die Zugänglichkeit des Gewebes für die DNA und die DNA-Konzentration, also vereinfacht: die Anzahl der DNA-Moleküle, die die Zellen erreichen. Auch die regenerative Proliferation scheint hilfreich. Einerseits ermöglicht die Zellteilung das Eindringen der DNA in den Zellkern, andererseits ist auch die Bildung von Klonen transfizierter Zellen denkbar. Die neue, modifizierte Methode der *ex ovo* Elektroporation eignet sich also insgesamt besser für die Kombination mit der *in vitro* Kultur retinaler Explantatstreifen als die *in ovo* Elektroporation und erweitert dieses *in vitro* System um eine wichtige Komponente.

Dennoch konnte im retinalen Wachstumskegel das SNAP-EphA3 nicht in ausreichender, detektierbarer Menge exprimiert werden. Das Signal des bicistronisch exprimierten Transfektionsmarkers EGFP war ebenfalls deutlich schwächer als im Falle des SNAP-ephrin-A5 und nur schwer von der durch die Fixierung induzierten Fluoreszenz zu unterscheiden. Vermutlich wurde auf Grund der längeren kodierenden Sequenz vor der IRES diese mit geringerer Effizienz genutzt. Die mRNA Transkriptionstärke ist auf Grund des gleichen Promotors wahrscheinlich vergleichbar. Auch die Anzahl der Plasmide die in die Zellen eindringen können, sollte vergleichbar sein. Zwar ist pSNAP-EphA3-iG 2,3 kb größer als pSNAP-ephrin-A5-iG, aber auf Grund der *supercoiled* Struktur der Plasmide, spielt dies eine untergeordnete Rolle. Gegen eine mögliche Bildung ungünstiger Sekundärstrukturen, die wiederum eine Translation verhindern könnten, spricht die erfolgreiche Expression in Hühnerfibroblasten und HeLa-Zellen. Der wohl wichtigste Punkt ist daher vermutlich der korrekte Transport und die Translationsregulation der mRNA über regulierende 3' und 5' UTRs, aber auch der korrekte Transport des translatierten Proteins innerhalb des Neurons. Diese Regulationsmechanismen sind für ein großes Transmembranprotein innerhalb eines Neurons kompliziert und unterscheiden sich von nicht-neuronalen Zellen. Hier ist vermutlich auch die Stellschraube für zukünftige Optimierungsmöglichkeiten. Weiterführende Experimente zur Optimierung der Methode sollten sich daher damit beschäftigen, die Expression von genetischen Konstrukten in den Axonen durch Einbringen regulatorischer Sequenzen zu verbessern.

### 4.3 Expression von SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 und Untersuchung der Dynamik an der Zelloberfläche

#### 4.3.1. SNAP-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 lassen sich funktionell in verschiedenen Zelltypen exprimiert

In dieser Arbeit wurden neue Fusionsproteine generiert, die es erlauben, die Dynamik der Rezeptortyrosinkinase EphA3 und ihres Liganden ephrin-A5 zu untersuchen. Hierzu wurde die Sequenz einer modifizierten O-6-AGT, des sogenannten SNAP-Tag (Keppler et al., 2004; Gautier et al., 2008), mit der Sequenz des jeweiligen Proteins kombiniert und in einem eukaryotischen Expressionsvektor kloniert. Es konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 sowohl in humanen Cervixkarzinomzellen der HeLa-Linie, als auch in primären Hühnerfibroblasten exprimiert werden können. Dabei war die Lokalisation vergleichbar mit der Lokalisation der bereits auf Funktionalität getesteten Konstrukte FLAG-EphA3 und GPI-GFP (Carvalho et al., 2006). Carvalho und Mitarbeiter zeigten unter anderem, dass EphA3 und das GPI-verankerte ephrin-A5 in der gleichen Membrandomäne kolokalisiert sind. Die Ergebnisse der Kolokalisationsexperimente in den HeLa-Zellen, sowie die Ähnlichkeit der Lokalisationen von SNAP-ephrin-A5 und SNAP-EphA3 in den primären Hühnerfibroblasten stehen damit in Einklang. Eine detaillierte Diskussion der Lokalisation ist in den folgenden Abschnitten zu finden. Im Falle des SNAP-ephrin-A5 konnte eine mögliche Abspaltung des SNAP-ephrin-A5 mit der Phosphatidylinositol-spezifischen PI-PLC gezeigt werden. Dies deutet auf eine korrekte Prozessierung und Verankerung des SNAP-ephrin-A5 in der Membran der transfizierten Zelle über einen GPI-Anker hin. Die unabhängige Reproduktion des PI-PLC-Versuches erwies sich jedoch als schwierig. Die Reaktivität der PI-PLC variiert erfahrungsgemäß stark je nach Hersteller und Charge. Der positive Versuch wird aber als ein weiteres Indiz für die korrekte Expression des SNAP-ephrin-A5 gewertet. Auch die Kolokalisation der Antikörperfärbungen gegen FLAG-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 im Kontaktbereich der Zellmembran von kokultivierten HeLa Zellen, die entweder FLAG-EphA3 oder SNAP-ephrin-A5 exprimieren, sind ein Hinweis auf die Funktionalität der Konstrukte. Sie scheinen korrekt in der Membran eingebaut zu werden und ihren Interaktionspartner *in trans* zu binden. Die Fähigkeit den extrazellulären Interaktionspartner zu binden wird auch durch Versuche mit Affinitätssonden belegt. Das Signal der Affinitätssonde für die Ligandenbindedomäne des Zielproteins kolokalisiert mit der BG-Färbung dessen SNAP-Tags. Dies gilt sowohl für SNAP-EphA als auch SNAP-ephrin-A5 und ist ein Beleg für die Funktionalität beider Fusionsproteine. Bevor ich im übernächsten Abschnitt auf die Besonderheiten und Unterschiede der SNAP-Färbungen eingehe, befasst sich der nächste Abschnitt mit einem weiteren interessanten Beleg für die Funktionalität des SNAP-EphA3: der Aggregation von EphA3 nach ephrin-A5-Fc-Stimulation.

### 4.3.2 Ephrin-A5 bindet an SNAP-EphA3 und verstärkt Clusterbildung und Endozytose

Eine Besonderheit der Eph-Signaltransduktion ist, dass es zu Bildung von Clustern in der Zellmembran kommt. Kleinere Cluster bilden sich auch ohne Stimulation in der Zellmembran (Wimmer-Kleikamp et al., 2004) und werden bei Interaktion mit ephrin größer. Das Signal ändert Quantität und Qualität, je nach Größe und Zusammensetzung der Cluster (Stein et al., 1998; Janes et al., 2012; Nikolov et al., 2013). Die Eph-ephrin-Komplexe werden anschließend endozytiert (Pitulescu und Adams, 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich durch Behandlung SNAP-EphA3 exprimierender Hühnerfibroblasten mit löslichem ephrin-A5-Fc, Aggregate nahe der Zelloberfläche bilden. Ihre Größe von ungefähr 100 nm bis zu 200 nm liegt in der Größenordnung von EphA-Clustern in der Zellmembran von 50 bis 200 nm (Seiradake et al., 2013), als auch früher Endosomen, die eine Größe von 50 nm bis zu 1 µm erreichen (Ganley et al., 2004). Strukturen unter 90 nm konnten mit der verwendeten SIM nicht aufgelöst werden. Die eindeutige Differenzierung von Clustern und frühen Endosomen ist daher an Hand ihrer Größe nicht möglich. Daher sind die Lage der Aggregate innerhalb der Zelle und ihre Dynamik entscheidende Kriterien zur Interpretation der vorliegenden Daten. Die Anzahl und Größe der Aggregate ändert sich im Laufe der ephrin-A5-Behandlung. Nach 5 min ist eine Akkumulation von kolokalisiertem SNAP-EphA3 und fluoreszent markiertem ephrin-A5-Fc zu sehen, nach 10 min werden diese Aggregate größer und sind am äußersten Zellrand aber auch im zentralen Bereich zu finden. Nach 15 min befinden sich die Aggregate eher im Zentrum der Zelle. Dies ist konsistent mit dem beschriebenen Prozess von Clusterbildung und anschließender Endozytose, wie er für ephrin-A5-Fc in EphA3 exprimierenden Zellen bereits beschrieben wurde (Wimmer-Kleikamp et al., 2004). Durch die Verwendung des SNAP-EphA3 und der BG-Färbung, kann jedoch die Dynamik der Komplexe nicht nur an Hand des exogenen ephrin-A5 beobachtet werden, sondern auch das beteiligte SNAP-EphA3 direkt erfasst werden. In einer aktuellen Studie zum Clustern von EphA2 und EphA4 (Seiradake et al., 2013) wurden unter anderem ähnliche Versuche durchgeführt wie in der vorliegenden Arbeit mit SNAP-EphA3. Hierbei zeigte sich eine im zeitlichen Ablauf vergleichbare Dynamik von Fluorophor-gekoppeltem EphA2 und EphA4 in COS7-Zellen nach Stimulation mit ephrin-A5-Fc. Die Akkumulation des SNAP-EphA3 in der Peripherie ähnelt den beobachteten Clustern im Falle des EphA2, die Clusterbildung scheint aber etwas schwächer ausgeprägt zu sein. Die größeren, eher zentral lokalisierten Aggregate ähneln wiederum stark der beschriebenen endosomalen Aggregatbildung des EphA4. Es scheint im Falle des SNAP-EphA3 demnach ein gekoppelter Mechanismus aus initialem Clustern der Rezeptoren und anschließender Endozytose vorzuliegen. Interessanter Weise wurde das unterschiedliche Cluster- und Endozytose-Verhalten der Rezeptoren EphA2 und EphA4 auf ein Glycin im HI-Loop der extrazellulären Domäne zurückgeführt (Seiradake et al., 2013). Dieses Glycin ist im Falle aller Vertreter der EphA-Rezeptoren im Menschen, mit Ausnahme des EphA4, konserviert.

Das in dieser Arbeit verwendete EphA3 des Huhns enthält statt des erwähnten Glycins ein Lysin im HI-Loop. Inwiefern dies für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, bleibt aber offen. Neben den bereits diskutierten Effekten, konnte auch eine Reaktion der Zellen auf ephrin-A5-Fc beobachtet werden. Bei EphA4 Überexpression verringerte sich die Zellfläche um 20 %, bei EphA2-Überexpression um gerade 10 % (Seiradake et al., 2013). In beiden Fällen war der maximale Effekt nach 10 min erreicht. Vergleicht man dies mit den Ergebnissen zu SNAP-EphA3 (Reduktion der Zellfläche um bis zu 40 %), liegt die Stärke des Effekts sogar über der des EphA4, was vermutlich an der Verwendung verschiedener Expressionsvektoren und Zelltypen liegt. Zusammengefasst zeigen die Versuche die Funktionalität des SNAP-EphA3 und die Eignung des Konstrukts für weitere Untersuchungen der EphA3-Dynamik mit hochauflösender Mikroskopie.

### 4.3.3 Eph/ephrin-Dynamik in HeLa-Zellen und Fibroblasten

Neben der Bestätigung der korrekten Lokalisierung und Funktionalität der SNAP-Konstrukte lieferten die Experimente auch einen Einblick in die Eph/ephrin-Dynamik. Um dies zu verdeutlichen wurden die Ergebnisse der SNAP-Färbungen interpretiert und in Tabelle 4 zusammengefasst. Betrachtet man zunächst die nicht-neuronalen Zellen, wird deutlich, dass je nach Behandlung, die BG-Färbung unterschiedliche Regionen unterschiedlich stark färbt. Neben einer Oberflächenfärbung sind auch stets intrazelluläre Aggregate zu erkennen. Ausgehend von der Tatsache, dass das BG-Fluorophor nicht zellpermeabel ist (Keppler et al., 2004), was auch mehrfach in dieser Arbeit bestätigt wurde, stellt sich vor allem die Frage, wie die intrazelluläre Färbung mit BG-Fluorophor sowie die größeren Aggregate zu interpretieren sind. Es ist bekannt, dass sowohl Eph als auch ephrin endozytiert werden (siehe 1.2.6). Auf Grund ihrer Größe und Lage kommen für Aggregate in der Zellperipherie sowohl Cluster in der Zellmembran als auch frühe Endosomen in Frage. Die eher zentral lokalisierten Akkumulationen von BG-gefärbtem Protein mit einer Größe über 1  $\mu\text{m}$  sind vermutlich spät-endosomale Strukturen, wie perinukleäre und späten Endosomen, könnten aber auch Lysosomen sein. Außerdem wurde eine partielle Kolo-kalisation mit dem Golgi-Marker GM130 beobachtet. Somit sind die SNAP-Fusionsproteine in der äußeren Zellmembran, also der Zelloberfläche und in Zellkompartimenten zu finden, die an Proteinsynthese, -recycling und Abbau beteiligt sind. Betrachtet man die SNAP-Färbungen genauer, fällt zunächst auf, dass SNAP-ephrin-A5 in den verschiedenen Experimenten zwar ähnlich lokalisiert ist, aber je nach Zelltyp und Umgebung auch in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu finden ist. Ohne exogene Stimulation ist die BG-Färbung in primären Hühnerfibroblasten vor allem an der Zelloberfläche und früh-endosomalen Strukturen zu finden, während die BP-Färbung vor allem im intrazellulären Membransystem zu finden ist. Es besteht

eine relativ deutliche Trennung zwischen einer intrazellulären Fraktion und einer kleineren Fraktion von SNAP-ephrin-A5, die an der Oberfläche lokalisiert ist. Ein kleiner Teil der beiden Subpopulationen kolokalisiert in vermutlich früh-endosomalen Strukturen, was auf Proteinrecycling während der einstündigen Färbeprozedur hindeutet. BG-gefärbtes, ephrin-A5 wird ohne exogene Stimulation endozytiert und vermutlich auch recycelt, wohingegen BP-gefärbtes, intrazelluläres SNAP-ephrin-A5 nicht an die Oberfläche transportiert wird. Dies ist die Ausgangssituation eines unstimulierten Fibroblasten. Interessanterweise unterscheidet sich diese jedoch von der unstimulierten HeLa-Zelle. Hier sind auch größere intrazelluläre Strukturen in der Nähe des Kerns zu erkennen, in denen eine starke Kolokalisation der BG- und BP-Färbungen zu finden sind. Die stärkere Kolokalisation deutet auf eine höhere Dynamik des SNAP-ephrin-A5 innerhalb des Zeitraums der Färbeprozedur hin. Neben grundsätzlichen Unterschieden im Stoffwechsel der beiden Zelltypen ist hierfür vermutlich die endogene Expression von EphA2 und ephrin-A1 in HeLa-Zellen (Alford et al., 2010) verantwortlich. Die permanent andauernde Interaktion der endogen und ektopisch exprimierten Eph/ephrin Komponenten zwischen den benachbarten Zellen, führt zur Signaltransduktion und damit zu einer verstärkten Endozytose der Eph/ephrin Komplexe. Um dennoch ephrin-A5 an der Oberfläche zur Verfügung zu haben, wird vermutlich auch das Proteinrecycling verstärkt. Somit wird die gesamte Proteindynamik erhöht. Die BG und BP gefärbten intrazellulären Regionen sind hier wohl Schnittstellen zwischen Proteinrecycling und Proteinsynthese und nehmen vielleicht die Rolle einer Art dynamischer Proteinreserve ein. Tatsächlich konnte bei Stimulation der HeLa-Zellen mit einer hohen exogenen EphA3-Fc-Konzentration für 20 min eine veränderte Lokalisation beobachtet werden. Die großen intrazellulär lokalisierten BG-gefärbten Aggregate in der Nähe des Kerns nehmen ab und kleinere Aggregate, die mit dem exogenen EphA3-Fc kolokalisiert sind nehmen zu. Dies könnte auf die Aktivierung des, in einem intrazellulären Reservoir gelagerten, SNAP-ephrin-A5 hinweisen. Dieses Reservoir könnte Recycling-Endosomen wie Rab11-positive Endosomen, aber auch Teile des Golgis umfassen.

Tabelle 4: Vergleich und Interpretation der Lokalisation der verschiedenen SNAP-Färbungen

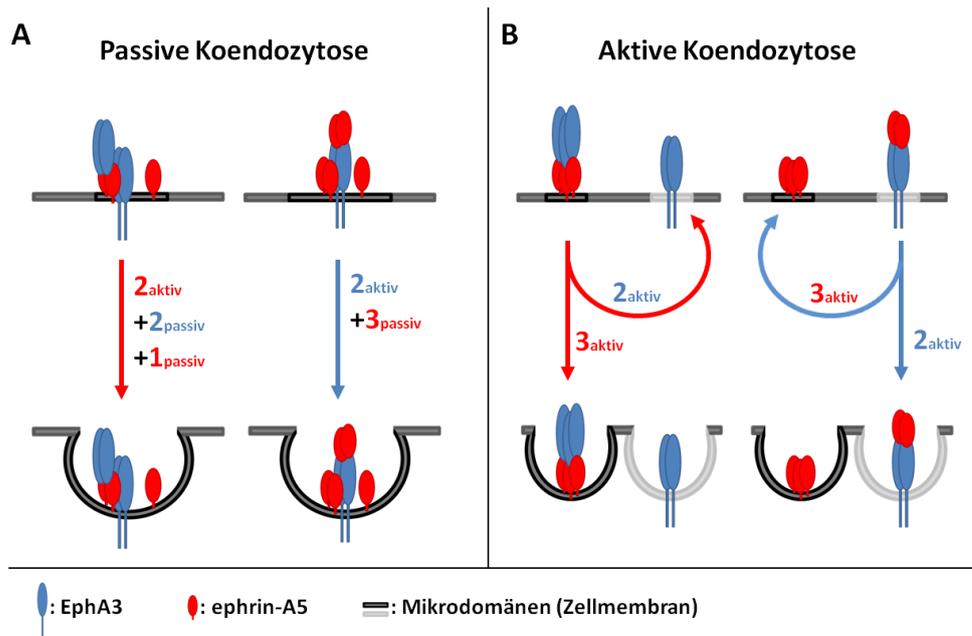
Zelltyp	Substrat	Behandlung	Konstrukt	BG-Färbung	BP-Färbung	Kolokalisation	Bemerkung
HeLa	PLL	-	SNAP-ephrin-A5	Zelloberfläche, Golgi, endosomal	Golgi, endosomal	BG und BP partiell kolokalisiert, endosomal	seriell: 30 min BG, 30 min BP-Färbung
PCF	PLL/FN	-	SNAP-ephrin-A5	Zelloberfläche, endosomal	ER, Golgi, perinuklear	BG und BP partiell schwach kolokalisiert, endosomal	seriell: 30 min BG, 30 min BP-Färbung
HeLa	PLL	20 min EphA3-Fc, gelöst im Medium	SNAP-ephrin-A5	Zelloberfläche, endosomal	k.A.	SNAP-ephrin-A5 und EphA3-Fc stark kolokalisiert	seriell, 30 min BG, 20 min EphA3-Fc
PCF	PLL/FN	-	SNAP-EphA3	Zelloberfläche, Golgi, endosomal	ER, Golgi, perinuklear	BG und BP partiell schwach kolokalisiert, endosomal	seriell: 30 min BG, 30 min BP-Färbung
PCF	PLL/FN	5 bis 15 min ephrin-A5-Fc, gelöst im Medium	SNAP-EphA3	Zelloberfläche, endosomal, Verstärktes Clustern und Endozytose	k.A.	SNAP-EphA3 und ephrin-A5-Fc, stark	seriell: 30 min BG, 5 bis 15 min ephrin-A5
RGFC	Laminin/Fc	48 h Fc, substratgebunden homogen	SNAP-ephrin-A5	Oberfläche, endosomal	k.A.	k.A.	35 min BG
RGFC	Laminin/EphA3	48 h EphA3-Fc, substratgebunden, Streifenassay	SNAP-ephrin-A5	Oberfläche, endosomal, stark in der C-Zone	k.A.	k.A.	35 min BG
RGFC	Laminin/EphA3	48 h EphA3-Fc, substratgebunden, homogen	SNAP-ephrin-A5	endosomal, stark reduziert	k.A.	k.A.	35 min BG
RGFC	Laminin/ephrin-A5	48 h ephrin-A5-Fc, substratgebunden, homogen	SNAP-ephrin-A5	endosomal, stark reduziert	k.A.	k.A.	35 min BG

k.A. keine Angaben, in diesen Fällen wurde keine zusätzliche BP-Färbung durchgeführt.

#### 4.3.4 Eph/ephrin-Dynamik im Wachstumskegel retinaler Ganglienzellen

SNAP-ephrin-A5 wird in den retinalen Ganglienzellen ausreichend exprimiert und kann auch im Wachstumskegel detektiert werden. Eine Antikörperfärbung gegen den SNAP-Tag des ephrin-A5 zeigte, dass das Protein in der C-Zone des Wachstumskegels stärker vertreten ist als in der P-Zone. Die Kombination aus BG-Färbung und Immunhistochemie zeigte zusätzlich eine relativ gleichmäßige Verteilung an der Oberfläche und Aggregate, die an Hand ihrer Größe sowohl Cluster in der Membran als auch endosomal sein können. Die Akkumulation in der C-Zone ist bei der BG-Färbung im nicht exogen stimulierten Wachstumskegel nicht zu sehen. Zusammengenommen ähneln diese Färbungen des Kompartiments Wachstumskegel, denen einer SNAP-ephrin-A5 exprimierenden Zelle in kleinerem Maßstab. Es scheint ein intrazelluläres Reservoir an ephrin-A5 im zentralen Bereich und eine aktive, dynamische Oberflächenfraktion zu geben. Interessanter Weise akkumuliert das BG-gefärbte SNAP-ephrin-A5 bei Kontakt mit EphA3 im Streifenassay in der C-Zone. Das forward signaling führt demnach dazu, dass sich die Dynamik des SNAP-ephrin-A5 erhöht. Innerhalb der 35 minütigen Färbung wird viel SNAP-ephrin-A5 von der Oberfläche in das Reservoir überführt, demnach ist die Aufenthaltszeit an der Zelloberfläche kürzer. Dies deutet auf eine verstärkte Endozytose aber auch auf erhöhtes Proteinrecycling hin. Neusynthese und anterograde Transport des ephrin-A5 sind in dieser Zeitspanne unwahrscheinlich. Lange kontinuierliche Stimulation mit homogenem substratgebundenem exogenem EphA3 führt zu einer Reduktion des BG-gefärbten SNAP-ephrin-A5. Während der 35 minütigen Färbeprozedur ist also fast kein SNAP-ephrin-A5 an der Oberfläche gefärbt worden. Demnach ist die Endozytose und das Proteinrecycling durch die andauernde Anwesenheit des EphA3 fast zum Erliegen gekommen. Dies bedeutet eine Desensitivierung in Abhängigkeit des Signals und kann daher als molekulare Grundlage von Adaptation betrachtet werden. Die wirklich überraschende Beobachtung war jedoch, dass dies auch auf homogenem ephrin-A5-Substrat zu beobachten war. Die Oberflächenpopulation des SNAP-ephrin-A5 wurde auf ephrin-A5-Substrat in gleichem Maße reduziert, wie auf EphA3. Dies bedeutet eine Desensitivierung des Wachstumskegels gegenüber EphA in Abhängigkeit von EphA und ephrin-A. Interessanterweise war diese Art der koregulativen Adaptation exakt der Mechanismus, der in einem Computermodell ein scheinbares Paradoxon auflöste. Das Modell nimmt das Verhältnis des *forward* und *reverse signalings* als Grundlage für die Berechnung der korrekten topographischen Position virtueller Wachstumskegel in simulierten Gegengradienten (Gebhardt et al., 2012). Topographische Projektion steht zunächst im Widerspruch zu beobachteten Adaptationsphänomenen in *in vitro* Experimenten. In sogenannten „Gap-Assays“ wurde gezeigt, dass Wachstumskegel, die auf ephrin-A-haltigen Substraten auswachsen gegenüber ephrin-A desensitivieren (Fritz 2012). Hierzu wurden Proteinsubstrate produziert, die aus zwei homogenen Feldern von ephrin-Protein bestanden, die durch eine Lücke mit Laminin

unterbrochen wurden. Axone, die auf dem ersten ephrin-Feld auswachsen, reagieren nach Überqueren einer schmalen Lücke nicht auf das zweite ephrin-Feld, wohingegen naive Axone am Rand eines ephrin-Feldes eine deutliche Stoppreaktion zeigen. Vergrößert man allerdings die Lücke auf über 200  $\mu\text{m}$  reagieren auch die auf ephrin-A ausgewachsenen Axone wieder und bilden eine Stoppfront. Sie konnten resensitivieren. Dieser Wechsel aus Desensitivierung und Resensitivierung ist ein klarer Fall von Adaptation. In weiteren ähnlichen Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass das gleiche Adaptationsphänomen auch auf Lückensubstraten mit EphA3 der Fall ist (Fiederling, unpubliziert). Es kann also sowohl das *forward* als auch das *reverse signaling* adaptieren. Dies wirft eine sehr grundlegende Frage auf: Wie soll positionelle Information aus den Gradienten ausgelesen werden können, wenn sich die Konzentration der Sensoren anpasst? Eine Lösungsmöglichkeit innerhalb des Modells war es, EphA und ephrin-A unter Erhalt der bestehenden Stöchiometrie zu adaptieren und somit trotz Adaptation, nicht die Balance der Signale aufzuheben (Gebhardt, Fiederling, Weth, unpubliziert). Was sich zunächst wie ein mathematischer Trick anhört, um die Adaptation im Modell zu integrieren, funktioniert im Modell tatsächlich und konnte auch durch weitere Lückenassays bestätigt werden. Wachsen Axone auf ephrin-A5 aus, adaptieren sie ebenfalls gegenüber EphA3 und umgekehrt. Für diese Koadaptation scheint nun mit Hilfe der hier präsentierten Ergebnisse ein möglicher Mechanismus gefunden worden zu sein. Zumindest im Falle des ephrin-A5 passt sich dessen Oberflächenkonzentration sowohl an exogenes EphA3 als auch an ephrin-A5 an. Eine solche Koregulation ist über mehrere Wege denkbar. Dabei sind im Falle des ephrin-A verschiedene Ansätze denkbar. Diese aktive Adaptation könnte durch Regulation unterschiedlicher Endozytose-Vorgänge geschehen, aber auch durch enzymatische Entfernung des ephrin-A aus der Membran. Letzteres könnte durch die Metalloprotease ADAM10 geschehen, die dazu fähig ist, ephrin-A *in cis* zu schneiden und damit aus der Membran zu entfernen und sowohl mit ephrin-A, als auch mit EphA kolokalisiert sein kann (Hattori et al., 2000; Janes et al., 2005). Das Problem hierbei ist allerdings, dass ADAM10 spezifisch für Eph-gebundenes ephrin ist. Dieser Mechanismus ist daher besonders auf ephrin-Substrat schwer vorstellbar. Demnach ist Endozytose, die auch die hier gezeigten Daten als Regulationsmechanismus nahe legen, wahrscheinlicher. Es sind zwei grundsätzlich verschiedene Varianten der koregulierten stöchiometrischen Endozytose denkbar. Erstens ist es möglich, dass durch die Aktivierung einer der Detektoren in *trans* Endozytose induziert wird und der kolokalisierte andere Detektor passiv koendozytiert wird. Zweitens, dass durch die Aktivierung eines Detektors die Reduktion beider Detektoren aktiv gesteuert wird. Das Modell der passiven Endozytose (Abbildung 4.1 A) wäre ein einfaches und elegantes Szenario. Ohne weiteren Aufwand würde so Rezeptor und Ligand unter Einhaltung der bestehenden Stöchiometrie reguliert. Koexprimierte Eph und ephrin Moleküle werden in naher Lokalisation gehalten - wodurch falls verfügbar - pro endozytiertem Eph auch ephrin endozytiert wird und das in dem lokal vorherrschenden Verhältnis.

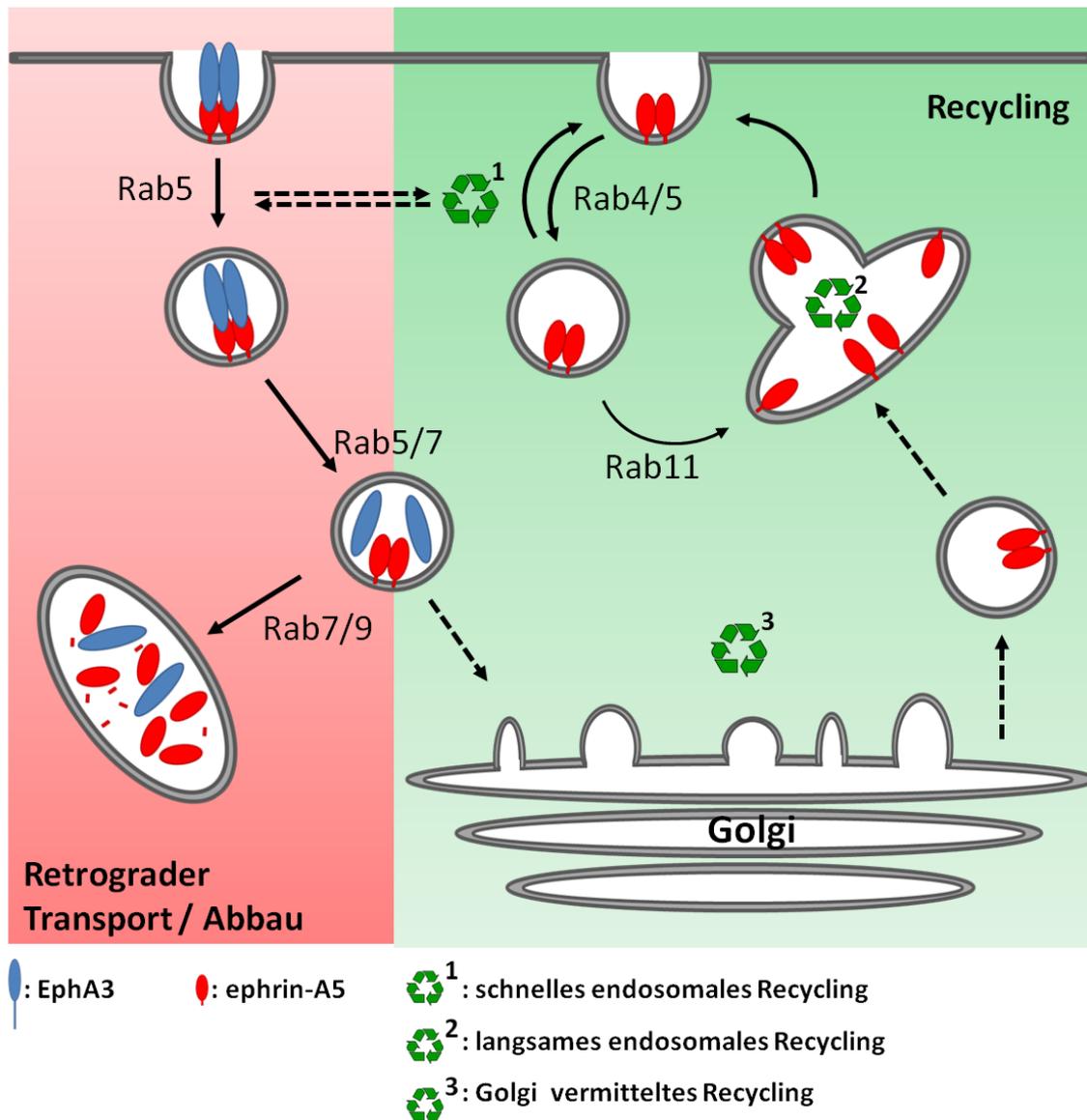


**Abbildung 4.1: Koadaptation unter Erhalt der Stöchiometrie.** Um Adaptation und balancierte Signaltransduktion im retinotektalen System zu vereinbaren, darf eine Koadaptation von Eph und ephrin die bestehende Stöchiometrie von EphA und ephrin-A in der Zellmembran nicht zerstören. Es sind zwei grundsätzlich verschiedene Szenarien dargestellt. **A:** Koexprimiertes EphA3 und ephrin-A5 befinden sich kolokalisiert in der gleichen Mikrodomäne. Die Aktivierung mit exogenem Eph (links) induziert die Endozytose der kompletten Mikrodomäne. Durch die Kolokalisation wird außer den am *reverse signaling* beteiligten ephrin-A5 Molekülen passiv die Anzahl von unbeteiligten Molekülen (ephrin-A5 und EphA3) koendozytiert, die der vorherrschenden Stöchiometrie in der Membran entspricht. Dies geschieht auch bei *trans*-Aktivierung von EphA3 mit exogenem ephrin während des *forward signaling* (rechts). Dieses Szenario setzt eine stöchiometrisch korrekte Kolokalisation voraus. **B:** Koexprimiertes EphA3 und ephrin-A5 befindet sich in verschiedenen Mikrodomänen. Aktivierung von ephrin-A5 in *trans* induziert die Endozytose der am *reverse signaling* beteiligten ephrin-A5-Moleküle. Es muss aktiv die Endozytose von der stöchiometrisch korrekten Anzahl von EphA3 Molekülen erfolgen (links). Im Falle des *forward signaling* wird das aktivierte EphA3 endozytiert. Es muss nun die stöchiometrisch korrekte Molekülmenge von ephrin-A5 aktiv endozytiert werden (rechts). Die aktive Endozytose erfordert also sowohl den Crosstalk zweier verschiedener Endozytose-Mechanismen, als auch die aktive Erfassung und Weitergabe der Stöchiometrie der beteiligten Moleküle.

Diese einfache Kopplung der beiden Sensoren und der Sensitivität des *reverse* und *forward signaling* könnte ein Mechanismus zur Balancierung des Eph/ephrin-Signalings sein, der bisher noch nicht berücksichtigt wurde. Dies setzt jedoch eine Kolokalisation des Interaktionspaares in dem molekularen Verhältnis voraus, die dem Verhältnis der Gesamtexpression entspricht. Eventuell kann diese stöchiometrische Kolokalisation durch die verschiedenen *cis*-Interaktionen von Eph und ephrin gewährleistet werden. Die Funktion und Relevanz dieser *cis*-Interaktionen und sogar der Kolokalisation ist nach wie vor nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert (siehe 1.2.4). Sind EphA und ephrin-A also nicht kolokalisiert ist eine aktive Regulation wahrscheinlicher. Durch intrazelluläres Signaling wird die stöchiometrisch korrekte Anzahl der Moleküle von der Zellmembran entfernt. Dies könnte über einen unbekanntem Adaptationsregulator geschehen oder auch über eine Inhibition des Proteinrecyclings. Eventuell

sind auch passive und aktive Mechanismen kombiniert. Bei hohem Expressionsniveau wird zunächst koendozytotisch die Gesamtsensitivität reduziert und anschließend über aktive Endozytose die stöchiometrische Feineinstellung übernommen (Abbildung 4.1 B). Dies würde im Einklang mit der Hypothese stehen, dass die Kolokalisation von EphA und ephrin-A konzentrationsabhängig ist (Dudanova und Klein, 2011; Kao und Kania, 2011; Dudanova et al., 2012).

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Frage nach der Regulation der Balancierung zwischen dem Recycling im Detektionsmodus und der Adaptation. Denkbar wäre eine intrazelluläre Sortierung der endozytotischen Vesikel (Abbildung 4.2). In diesem Szenario besteht eine hohe Dynamik von Eph und ephrin auch in Abwesenheit einer exogenen Stimulation. Die Experimente in Zellkultur (Ergebnisteil 3.3) und nicht gezeigte Zeitreihen-Aufnahmen von SNAP-ephrin-A5 beziehungsweise SNAP-EphA3 exprimierenden Fibroblasten und HeLa-Zellen scheinen dies zu bestätigen. Vesikel, die nur ungebundenen Detektor enthalten, werden zurück an die Oberfläche transportiert und wieder in der Zellmembran eingebunden (Abbildung 4.2 rechts). Hierfür wäre die Beteiligung des schnellen Rab4/Rab5-Recyclingweges denkbar. Ein klares Indiz hierfür ist die Kolokalisation von SNAP-ephrin-A5 und Rab4 (Abbildung 3.21). Das bereits erwähnte hypothetische Reservoir in der C-Zone des Wachstumskegels, beziehungsweise im perinukleären Bereich der nicht-neuronalen Zellen, könnte durch einen Recyclingweg über Teile des Golgi-Apparats und Rab11-positive Recycling-Endosomen verwirklicht werden. Interessanter Weise sind sowohl Rab11-Endosomen, als auch Teile des Golgi-Apparats im axonalen Wachstumskegeln zu finden (Estrada-Bernal et al., 2012; Jung et al., 2012). Vesikel, die durch Signal-vermittelte Endozytose entstanden sind, können jedoch nicht direkt recycelt werden (Abbildung 4.2 links). Die Vesikel werden azidifiziert und anschließend degradiert. Dies würde die Balance der Signaltransduktion jedoch nachhaltig stören. Degradation und erneuter Transport vom Soma ins Axon sind zwar möglich und könnten durch schnellen axonalen Transport innerhalb einer Stunde geschehen, können auf Grund experimenteller Daten aber wahrscheinlich ausgeschlossen werden. In Versuchen mit Wachstumskegeln, die vom Soma getrennt wurden, konnte die Unabhängigkeit des Wachstumskegels bei der axonalen Lenkung gezeigt werden (Harris et al., 1987). Auch konnte gezeigt werden, dass Proteinsynthese für die Adaptation nicht nötig ist (Fritz, 2012). Neusynthese und anterograder Transport dienen daher vermutlich nur der Auffrischung des Reservoirs im Wachstumskegel. Eine Alternative zur Neusynthese könnte ein weiterer Recyclingweg sein. Die Rezeptoren werden mit ihrem gebundenen Liganden endozytiert und zunächst durch Azidifizierung des Endosoms von ihrem Liganden befreit. Danach erfolgt eine Fusion mit der Membran des Golgi und Aufbereitung des Proteins. Nun könnte es dem Rab11-positiven Recycling-Endosom zugeführt und die Proteine zum passenden Zeitpunkt und am richtigen Ort wieder in die Zellmembran eingebaut werden.



**Abbildung 4.2: Hypothetische Regulation der EphA/ephrin-A-Signaltransduktion durch Endozytose, Recycling und Degradation.** Signalisierende ephrin-A5-Moleküle werden endozytiert und in Rab5-positiven Vesikeln endozytiert. Es folgt die Reifung durch Beteiligung von Rab7 und Azidifizierung des Endosoms. Der Wechsel von Rab5 zu Rab9 führt zum retrograden Transport und Degradation der endozytierten Proteine durch Fusion mit Lysosomen (links, rot). Nicht aktiviertes ephrin-A5 wird über schnelles Rab4/5-vermitteltes Recycling zurück an die Plasmamembran befördert oder langsamer über ein Rab11-positives Endosom recycelt (rechts, grün). Um ein von Neusynthese unabhängiges Szenario zu erhalten, wie es im EphA/ephrin-A System vorliegt, muss es Schnittstellen geben, die an der Signaltransduktion beteiligte Moleküle vor der Degradation bewahren (gestrichelte Pfeile). Eine Möglichkeit wäre, dass signalisierende Rezeptoren das Recycling inhibieren und so den Einbau neuer Rezeptoren in die Membran verhindern. Dies würde eine Degradation der verfügbaren Proteine verzögern. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Endosomen soweit azidifizieren, bis der Ligand gelöst wird und einen Recyclingweg über den Golgi-Apparat einschlagen, bevor sie selbst abgebaut werden. Nach der Aufbereitung im Golgi werden sie entweder direkt zur Membran transportiert (hier nicht dargestellt) oder über Rab11-positive Recycling-Endosomen dem langsamen Recycling-Weg zugeführt. So würde ein dynamisches Reservoir an ephrin-A5 realisiert, über den sich Signaltransduktion, Desensitivierung und Resensitivierung regulieren lassen und dies ohne die Neusynthese von den beteiligten Rezeptoren. Dieser Mechanismus ist hier am Beispiel des *reverse signaling* verdeutlicht (auf die Darstellung von Korezeptoren wurde verzichtet) ist aber auch für das *forward signaling* denkbar.

Tatsächlich gibt es Fälle in denen Proteine zunächst vom Golgi in Rab11 positive Recycling-Endosomen transportiert werden und erst danach in die Zellmembran eingebaut werden (Lock und Stow, 2005; Taguchi, 2013; Welz et al., 2014). Des Weiteren wurde kürzlich ein Tiam1-abhängiger Mechanismus für EphA2 vorgeschlagen, bei dem endozytiertes aktiviertes EphA2 unter Beteiligung von Rab11-positiven Endosomen recycelt wird (Boissier et al., 2013). Als Regulationssystem für die Sortierung der Vesikel bietet sich die Vielzahl an Rab-Proteinen an. Zahlreiche Rab-Proteine sind an der Sortierung von Endosomen, der Regulation von Proteinrecycling und Proteindegradation beteiligt. Wie schon erwähnt sind Rab4 und Rab5 gute Kandidaten für das Recycling nicht Liganden-gebundener Rezeptoren, da ihre Beteiligung am schnellen Recycling im retinalen Wachstumskegel kürzlich gezeigt wurde (Falk et al., 2014). Für die vorgeschlagene Azidifizierung der signalisierenden Endosomen kommen Rab5 und Rab7 in Frage. Deren Beteiligung an der Sortierung der ephrin-A Korezeptoren TrkB und p75-NTR wurde bereits gezeigt (Deinhardt et al., 2006). Wie der Übergang in den Golgi und schließlich ins Recycling-Endosom erfolgen könnte ist jedoch unklar.

---

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Explantatkultur retinaler Ganglienzellen ist ein wichtiges Modellsystem zur Erforschung axonaler Lenkung im Allgemeinen und insbesondere der Ausbildung der retinotektalen Projektion unter Beteiligung des EphA/ephrin-A-Systems. Ziel dieser Arbeit war es, die Dynamik von EphA3 und ephrin-A5 durch die Herstellung von rekombinanten Sensoren und deren Expression in retinalen Ganglienzellen des Huhns fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. In Versuchen mit einer etablierten Methode der *ex ovo* Elektroporation im Rahmen einer Kooperation, konnten die Par-Komplex-Komponenten Par6 und PKC $\zeta$  erfolgreich koexprimiert werden und Hinweise auf deren NG2-abhängige Kolokalisation gefunden werden. Vor allem zeigten diese Versuche aber, dass es für geplanten quantitative Studien im Eph/ephrin-System notwendig war, die etablierte Methode zu optimieren. In der Tat konnte ich die Methode der *ex ovo* Elektroporation durch eine mechanische und enzymatische Vorbehandlung der explantierten Retina und anschließende Elektroporation deutlich verbessern und so die Anzahl transfizierter Axone in der Explantatkultur verdoppeln. Auch die Herstellung der Fusionsproteine war erfolgreich. Sowohl SNAP-ephrin-A5 als auch SNAP-EphA3 werden funktionell in Zellkulturzellen exprimiert. Die Expression von SNAP-ephrin-A5 in retinalen Wachstumskegeln, lieferte den überraschenden Befund, dass die ephrin-A5 Konzentration an der Oberfläche der Wachstumskegel sowohl vom kontinuierlichen EphA/ephrin-A *forward* als auch *reverse signaling* negativ reguliert wird. Die EphA3- und ephrin-A5-vermittelte Reduktion von ephrin-A5 steht in Einklang mit anderen Experimenten, die eine Koadaptation von EphA und ephrin-A nahelegen. Ich konnte hier erstmals auf molekularbiologischer Ebene Hinweise auf dieses Phänomen liefern. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten auf einen durch Endozytose und Proteinrecycling regulierten Adaptationsmechanismus im retinalen Wachstumskegel hin. Zukünftige Experimente sollten sich vor allem damit beschäftigen, welche Endozytosewege daran beteiligt sind. Ein erster Schritt hierzu wären weitere immunhistochemische Kolokalisationsstudien von Proteinen der EphA/ephrin-A Familien und der endozytotischen Sortiermaschinerie, insbesondere der Rab-Familie. So könnten insbesondere Kolokalisation von ephrin-A5 mit Rab4, Rab5 und Rab11 weitere Indizien für die, in dieser Arbeit vorgeschlagene, Beteiligung verschiedener Recyclingwege liefern. Im nächsten Schritt könnte der Einfluss deren Überexpression auf die Adaptation untersucht werden. Des Weiteren sollten die gleichen Experimente mit SNAP-EphA3 durchgeführt werden. Dafür muss zunächst dessen axonale Expression verbessert werden. Ein Weg wäre verschiedene Sequenzen der 3'-UTR des EphA3 einzufügen, um so möglicherweise die korrekte Lokalisation zu gewährleisten. Zusammen könnten diese Experimente den neuartigen Mechanismus der Koadaptation im EphA/ephrin-A-System weiter aufklären.



## 6. Literatur

- Adler, R. and Belecky-Adams, T. L. (2002) 'The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup', *Development* 129(13): 3161-71.
- Alford, S., Watson-Hurthig, A., Scott, N., Carette, A., Lorimer, H., Bazowski, J. and Howard, P. L. (2010) 'Soluble ephrin a1 is necessary for the growth of HeLa and SK-BR3 cells', *Cancer Cell Int* 10: 41.
- Andermatt, I., Wilson, N. and Stoeckli, E. T. (2014) 'In ovo electroporation of miRNA-based-plasmids to investigate gene function in the developing neural tube', *Methods Mol Biol* 1101: 353-68.
- Antov, Y., Barbul, A., Mantsur, H. and Korenstein, R. (2005) 'Electroendocytosis: exposure of cells to pulsed low electric fields enhances adsorption and uptake of macromolecules', *Biophys J* 88(3): 2206-23.
- Arimura, N. and Kaibuchi, K. (2007) 'Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms', *Nat Rev Neurosci* 8(3): 194-205.
- Autenrieth, Tatjana (2012) Zellpolarisierung und Haptotaxis auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten *Zoologie*, vol. Doktorarbeit. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie.
- Boissier, P., Chen, J. and Huynh-Do, U. (2013) 'EphA2 signaling following endocytosis: role of Tiam1', *Traffic* 14(12): 1255-71.
- Bonanomi, D., Chivatakarn, O., Bai, G., Abdesselem, H., Lettieri, K., Marquardt, T., Pierchala, B. A. and Pfaff, S. L. (2012) 'Ret is a multifunctional coreceptor that integrates diffusible- and contact-axon guidance signals', *Cell* 148(3): 568-82.
- Bourikas, D. and Stoeckli, E. T. (2003) 'New tools for gene manipulation in chicken embryos', *Oligonucleotides* 13(5): 411-9.
- Bradke, F., Fawcett, J. W. and Spira, M. E. (2012) 'Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration', *Nat Rev Neurosci* 13(3): 183-93.
- Brown, A., Yates, P. A., Burrola, P., Ortuño, D., Vaidya, A., Jessell, T. M., Pfaff, S. L., O'Leary, D. D. and 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(1): 77-88.
- Butt, A. M., Kiff, J., Hubbard, P. and Berry, M. (2002) 'Synantocytes: new functions for novel NG2 expressing glia', *J Neurocytol* 31(6-7): 551-65.
- Butt, A. M., Pugh, M., Hubbard, P. and James, G. (2004) 'Functions of optic nerve glia: axoglial signalling in physiology and pathology', *Eye (Lond)* 18(11): 1110-21.
- Carvalho, R. F., Beutler, M., Marler, K. J., Knoll, B., Becker-Barroso, E., Heintzmann, R., Ng, T. and Drescher, U. (2006) 'Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5', *Nat Neurosci* 9(3): 322-30.

- Chen, S., Chen, J., Shi, H., Wei, M., Castaneda-Castellanos, D. R., Bultje, R. S., Pei, X., Kriegstein, A. R., Zhang, M. and Shi, S. H. (2013) 'Regulation of microtubule stability and organization by mammalian Par3 in specifying neuronal polarity', *Dev Cell* 24(1): 26-40.
- Clandinin, T. R. and Feldheim, D. A. (2009) 'Making a visual map: mechanisms and molecules', *Curr Opin Neurobiol* 19(2): 174-80.
- Coulthard, M. G., Morgan, M., Woodruff, T. M., Arumugam, T. V., Taylor, S. M., Carpenter, T. C., Lackmann, M. and Boyd, A. W. (2012) 'Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation', *Am J Pathol* 181(5): 1493-503.
- Cowan, C. W., Shao, Y. R., Sahin, M., Shamah, S. M., Lin, M. Z., Greer, P. L., Gao, S., Griffith, E. C., Brugge, J. S. and Greenberg, M. E. (2005) 'Vav family GEFs link activated Ephs to endocytosis and axon guidance', *Neuron* 46(2): 205-17.
- Davis, S., Gale, N. W., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M. and Yancopoulos, G. D. (1994) 'Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity', *Science* 266(5186): 816-9.
- De Vry, J., Martinez-Martinez, P., Losen, M., Temel, Y., Steckler, T., Steinbusch, H. W., De Baets, M. H. and Prickaerts, J. (2010) 'In vivo electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery', *Prog Neurobiol* 92(3): 227-44.
- Deinhardt, K., Salinas, S., Verastegui, C., Watson, R., Worth, D., Hanrahan, S., Bucci, C. and Schiavo, G. (2006) 'Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway', *Neuron* 52(2): 293-305.
- Deininger, K., Eder, M., Kramer, E. R., Zieglgänsberger, W., Dodt, H. U., Dornmair, K., Colicelli, J. and Klein, R. (2008) 'The Rab5 guanylate exchange factor Rin1 regulates endocytosis of the EphA4 receptor in mature excitatory neurons', *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(34): 12539-44.
- Doh, S. T., Hao, H., Loh, S. C., Patel, T., Tawil, H. Y., Chen, D. K., Pashkova, A., Shen, A., Wang, H. and Cai, L. (2010) 'Analysis of retinal cell development in chick embryo by immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques', *BMC Dev Biol* 10: 8.
- Dou, C. L. and Levine, J. M. (1994) 'Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan', *J Neurosci* 14(12): 7616-28.
- Douglas, K. L. (2008) 'Toward development of artificial viruses for gene therapy: a comparative evaluation of viral and non-viral transfection', *Biotechnol Prog* 24(4): 871-83.
- Dudanova, I., Gatto, G. and Klein, R. (2010) 'GDNF acts as a chemoattractant to support ephrinA-induced repulsion of limb motor axons', *Curr Biol* 20(23): 2150-6.
- Dudanova, I., Kao, T. J., Herrmann, J. E., Zheng, B., Kania, A. and Klein, R. (2012) 'Genetic evidence for a contribution of EphA:ephrinA reverse signaling to motor axon guidance', *J Neurosci* 32(15): 5209-15.
- Dudanova, I. and Klein, R. (2011) 'The axon's balancing act: cis- and trans-interactions between Ephs and ephrins', *Neuron* 71(1): 1-3.
- Dutta, D., Chakraborty, S., Bandyopadhyay, C., Valiya Veetil, M., Ansari, M. A., Singh, V. V. and Chandran, B. (2013) 'EphrinA2 regulates clathrin mediated KSHV endocytosis in fibroblast

- cells by coordinating integrin-associated signaling and c-Cbl directed polyubiquitination', *PLoS Pathog* 9(7): e1003510.
- Egea, J. and Klein, R. (2007) 'Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance', *Trends Cell Biol* 17(5): 230-8.
- Escoffre, J. M., Portet, T., Wasungu, L., Teissie, J., Dean, D. and Rols, M. P. (2009) 'What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues', *Mol Biotechnol* 41(3): 286-95.
- Esteve, P., Trousse, F., Rodríguez, J. and Bovolenta, P. (2003) 'SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism', *J Cell Sci* 116(Pt 12): 2471-81.
- Estrada-Bernal, A., Sanford, S. D., Sosa, L. J., Simon, G. C., Hansen, K. C. and Pfenninger, K. H. (2012) 'Functional complexity of the axonal growth cone: a proteomic analysis', *PLoS One* 7(2): e31858.
- Falk, J., Konopacki, F. A., Zivraj, K. H. and Holt, C. E. (2014) 'Rab5 and Rab4 regulate axon elongation in the *Xenopus* visual system', *J Neurosci* 34(2): 373-91.
- Feldheim, D. A., Kim, Y. I., Bergemann, A. D., Frisén, J., Barbacid, M. and Flanagan, J. G. (2000) 'Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping', *Neuron* 25(3): 563-74.
- Feldheim, D. A. and O'Leary, D. D. (2010) 'Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition', *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(11): a001768.
- Fitzgerald, M., Buckley, A., Lukehurst, S. S., Dunlop, S. A., Beazley, L. D. and Rodger, J. (2008) 'Neurite responses to ephrin-A5 modulated by BDNF: evidence for TrkB-EphA interactions', *Biochem Biophys Res Commun* 374(4): 625-30.
- Fritz, Martin (2012) Mechanismen der Adaptation retinaler Wachstumskegel an das axonale Lenkungssignal Ephrin-A5 *Zoologie*, vol. Doktorarbeit. Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie.
- Ganley, I. G., Carroll, K., Bittova, L. and Pfeffer, S. (2004) 'Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability', *Mol Biol Cell* 15(12): 5420-30.
- Gautier, A., Juillerat, A., Heinis, C., Corrêa, I. R., Kindermann, M., Beaufils, F. and Johnsson, K. (2008) 'An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells', *Chem Biol* 15(2): 128-36.
- Gebhardt, C., Bastmeyer, M. and Weth, F. (2012) 'Balancing of ephrin/Eph forward and reverse signaling as the driving force of adaptive topographic mapping', *Development* 139(2): 335-45.
- Gosse, N. J., Nevin, L. M. and Baier, H. (2008) 'Retinotopic order in the absence of axon competition', *Nature* 452(7189): 892-5.
- Haest, C. W., Kamp, D. and Deuticke, B. (1997) 'Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells', *Biochim Biophys Acta* 1325(1): 17-33.

- Hahn, A. S., Kaufmann, J. K., Wies, E., Naschberger, E., Panteleev-Ivlev, J., Schmidt, K., Holzer, A., Schmidt, M., Chen, J., Konig, S. et al. (2012) 'The ephrin receptor tyrosine kinase A2 is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus', *Nat Med* 18(6): 961-6.
- HAMBURGER, V. and HAMILTON, H. L. (1951) 'A series of normal stages in the development of the chick embryo', *J Morphol* 88(1): 49-92.
- Han, J. Y. (2009) 'Germ cells and transgenesis in chickens', *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32(2): 61-80.
- Harris, W. A., Holt, C. E. and 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 fibres in vivo', *Development* 101(1): 123-33.
- Hattori, M., Osterfield, M. and Flanagan, J. G. (2000) 'Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent', *Science* 289(5483): 1360-5.
- Himanen, J. P. (2012) 'Ectodomain structures of Eph receptors', *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 35-42.
- Himanen, J. P., Yermekbayeva, L., Janes, P. W., Walker, J. R., Xu, K., Atapattu, L., Rajashankar, K. R., Mensinga, A., Lackmann, M., Nikolov, D. B. et al. (2010) 'Architecture of Eph receptor clusters', *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(24): 10860-5.
- Homma, T., Shimizu, M. and Kuroda, R. (2011) 'The polarity protein Par6 is coupled to the microtubule network during molluscan early embryogenesis', *Biochem Biophys Res Commun* 404(1): 173-8.
- Hornberger, M. R., Dütting, D., Ciossek, T., Yamada, T., Handwerker, C., Lang, S., Weth, F., Huf, J., Wessel, R., Logan, C. et al. (1999) 'Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons', *Neuron* 22(4): 731-42.
- Hughes, S. H. (2004) 'The RCAS vector system', *Folia Biol (Praha)* 50(3-4): 107-19.
- Hughes, S. and Kosik, E. (1984) 'Mutagenesis of the region between env and src of the SR-A strain of Rous sarcoma virus for the purpose of constructing helper-independent vectors', *Virology* 136(1): 89-99.
- Islam, M. M., Doh, S. T. and Cai, L. (2012) 'In ovo electroporation in embryonic chick retina', *J Vis Exp*(60).
- Janes, P. W., Nievergall, E. and Lackmann, M. (2012) 'Concepts and consequences of Eph receptor clustering', *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 43-50.
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J. P., Lackmann, M. and Nikolov, D. B. (2005) 'Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans', *Cell* 123(2): 291-304.
- Jones, L. L., Yamaguchi, Y., Stallcup, W. B. and Tuszynski, M. H. (2002) 'NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors', *J Neurosci* 22(7): 2792-803.
- Jung, H., Yoon, B. C. and Holt, C. E. (2012) 'Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair', *Nat Rev Neurosci* 13(5): 308-24.

- Kao, T. J. and Kania, A. (2011) 'Ephrin-mediated cis-attenuation of Eph receptor signaling is essential for spinal motor axon guidance', *Neuron* 71(1): 76-91.
- Kao, T. J., Law, C. and Kania, A. (2012) 'Eph and ephrin signaling: lessons learned from spinal motor neurons', *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 83-91.
- Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H. and Johnsson, K. (2004) 'Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(27): 9955-9.
- Klein, R. and Kania, A. (2014) 'Ephrin signalling in the developing nervous system', *Curr Opin Neurobiol* 27C: 16-24.
- Kolpak, A. L., Jiang, J., Guo, D., Standley, C., Bellve, K., Fogarty, K. and Bao, Z. Z. (2009) 'Negative guidance factor-induced macropinocytosis in the growth cone plays a critical role in repulsive axon turning', *J Neurosci* 29(34): 10488-98.
- Kusumanto, Y. H., Mulder, N. H., Dam, W. A., Losen, M., Losen, M. H., De Baets, M. H., Meijer, C. and Hospers, G. A. (2007) 'Improvement of in vivo transfer of plasmid DNA in muscle: comparison of electroporation versus ultrasound', *Drug Deliv* 14(5): 273-7.
- Kwon, M. S., Koo, B. C., Roh, J. Y., Kim, M., Kim, J. H. and Kim, T. (2011) 'Production of transgenic chickens expressing a tetracycline-inducible GFP gene', *Biochem Biophys Res Commun* 410(4): 890-4.
- Lee, S. I., Zhang, W., Ravi, M., Weschenfelder, M., Bastmeyer, M. and Levine, J. M. (2013) 'Atypical protein kinase C and Par3 are required for proteoglycan-induced axon growth inhibition', *J Neurosci* 33(6): 2541-54.
- Levine, J. M. and Nishiyama, A. (1996) 'The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: a multifunctional proteoglycan associated with immature cells', *Perspect Dev Neurobiol* 3(4): 245-59.
- Lim, Y. S., McLaughlin, T., Sung, T. C., Santiago, A., Lee, K. F. and O'Leary, D. D. (2008) 'p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping', *Neuron* 59(5): 746-58.
- Lock, J. G. and Stow, J. L. (2005) 'Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin', *Mol Biol Cell* 16(4): 1744-55.
- Makkerh, J. P., Ceni, C., Auld, D. S., Vaillancourt, F., Dorval, G. and Barker, P. A. (2005) 'p75 neurotrophin receptor reduces ligand-induced Trk receptor ubiquitination and delays Trk receptor internalization and degradation', *EMBO Rep* 6(10): 936-41.
- Marler, K. J., Becker-Barroso, E., Martínez, A., Llovera, M., Wentzel, C., Poopalasundaram, S., Hindges, R., Soriano, E., Comella, J. and Drescher, U. (2008) 'A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis', *J Neurosci* 28(48): 12700-12.
- Marler, K. J., Poopalasundaram, S., Broom, E. R., Wentzel, C. and Drescher, U. (2010) 'Pro-neurotrophins secreted from retinal ganglion cell axons are necessary for ephrinA-p75NTR-mediated axon guidance', *Neural Dev* 5: 30.
- Marquardt, T., Shirasaki, R., Ghosh, S., Andrews, S. E., Carter, N., Hunter, T. and Pfaff, S. L. (2005) 'Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains', *Cell* 121(1): 127-39.

- Marston, D. J., Dickinson, S. and Nobes, C. D. (2003) 'Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion', *Nat Cell Biol* 5(10): 879-88.
- Miao, H. and Wang, B. (2012) 'EphA receptor signaling--complexity and emerging themes', *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 16-25.
- Ming, G. L., Wong, S. T., Henley, J., Yuan, X. B., Song, H. J., Spitzer, N. C. and Poo, M. M. (2002) 'Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones', *Nature* 417(6887): 411-8.
- Murai, K. K. and Pasquale, E. B. (2005) 'New exchanges in eph-dependent growth cone dynamics', *Neuron* 46(2): 161-3.
- Muramatsu, T., Mizutani, Y., Ohmori, Y. and Okumura, J. (1997) 'Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo', *Biochem Biophys Res Commun* 230(2): 376-80.
- Nikolov, D. B., Xu, K. and Himanen, J. P. (2013) 'Eph/ephrin recognition and the role of Eph/ephrin clusters in signaling initiation', *Biochim Biophys Acta* 1834(10): 2160-5.
- Nishiyama, A., Dahlin, K. J., Prince, J. T., Johnstone, S. R. and Stallcup, W. B. (1991) 'The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan', *J Cell Biol* 114(2): 359-71.
- Palamidessi, A., Frittoli, E., Garré, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G. and Di Fiore, P. P. (2008) 'Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration', *Cell* 134(1): 135-47.
- Pekarik, V., Bourikas, D., Miglino, N., Joset, P., Preiswerk, S. and Stoeckli, E. T. (2003) 'Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation', *Nat Biotechnol* 21(1): 93-6.
- Piper, M., Salih, S., Weinl, C., Holt, C. E. and Harris, W. A. (2005) 'Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation', *Nat Neurosci* 8(2): 179-86.
- Pitulescu, M. E. and Adams, R. H. (2010) 'Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis', *Genes Dev* 24(22): 2480-92.
- Poopalasundaram, S., Marler, K. J. and Drescher, U. (2011) 'EphrinA6 on chick retinal axons is a key component for p75(NTR)-dependent axon repulsion and TrkB-dependent axon branching', *Mol Cell Neurosci* 47(2): 131-6.
- Reber, M., Burrola, P. and Lemke, G. (2004) 'A relative signalling model for the formation of a topographic neural map', *Nature* 431(7010): 847-53.
- Roche, F. K., Marsick, B. M. and Letourneau, P. C. (2009) 'Protein synthesis in distal axons is not required for growth cone responses to guidance cues', *J Neurosci* 29(3): 638-52.
- Rols, M. P., Femenia, P. and Teissie, J. (1995) 'Long-lived macropinocytosis takes place in electropermeabilized mammalian cells', *Biochem Biophys Res Commun* 208(1): 26-35.
- Sahin, Mustafa, Greer, Paul L., Lin, Michael Z., Poucher, Heather, Eberhart, Johann, Schmidt, Susanne, Wright, Tracy M., Shamah, Steven M., O'Connell, Sinead, Cowan, Christopher W. et al. (2005) 'Eph-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Ephexin1 Modulates Growth Cone Collapse', *Neuron* 46(2): 191-204.

- Sakuta, H., Suzuki, R., Takahashi, H., Kato, A., Shintani, T., Iemura Si, Yamamoto, T. S., Ueno, N. and Noda, M. (2001) 'Ventroptin: a BMP-4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina', *Science* 293(5527): 111-5.
- Sambrook, Joseph and Russell, David (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandvig, A., Berry, M., Barrett, L. B., Butt, A. and Logan, A. (2004) 'Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration', *Glia* 46(3): 225-51.
- Schulte, D., Furukawa, T., Peters, M. A., Kozak, C. A. and Cepko, C. L. (1999) 'Misexpression of the Emx-related homeobox genes cVax and mVax2 ventralizes the retina and perturbs the retinotectal map', *Neuron* 24(3): 541-53.
- Scicolone, G., Ortalli, A. L. and Carri, N. G. (2009) 'Key roles of Ephs and ephrins in retinotectal topographic map formation', *Brain Res Bull* 79(5): 227-47.
- Seiradake, E., Schaupp, A., del Toro Ruiz, D., Kaufmann, R., Mitakidis, N., Harlos, K., Aricescu, A. R., Klein, R. and Jones, E. Y. (2013) 'Structurally encoded intraclass differences in EphA clusters drive distinct cell responses', *Nat Struct Mol Biol* 20(8): 958-64.
- Sen, J., Harpavat, S., Peters, M. A. and Cepko, C. L. (2005) 'Retinoic acid regulates the expression of dorsoventral topographic guidance molecules in the chick retina', *Development* 132(23): 5147-59.
- Shamah, S. M., Lin, M. Z., Goldberg, J. L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R. L., Corfas, G., Debant, A. et al. (2001) 'EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin', *Cell* 105(2): 233-44.
- Sharma, S. C. (1972) 'Reformation of retinotectal projections after various tectal ablations in adult goldfish', *Exp Neurol* 34(1): 171-82.
- Shintani, T., Ihara, M., Sakuta, H., Takahashi, H., Watakabe, I. and Noda, M. (2006) 'Eph receptors are negatively controlled by protein tyrosine phosphatase receptor type O', *Nat Neurosci* 9(6): 761-9.
- Shintani, T., Ihara, M., Tani, S., Sakuraba, J., Sakuta, H. and Noda, M. (2009) 'APC2 plays an essential role in axonal projections through the regulation of microtubule stability', *J Neurosci* 29(37): 11628-40.
- Smith, F. M., Vearing, C., Lackmann, M., Treutlein, H., Himanen, J., Chen, K., Saul, A., Nikolov, D. and Boyd, A. W. (2004) 'Dissecting the EphA3/Ephrin-A5 interactions using a novel functional mutagenesis screen', *J Biol Chem* 279(10): 9522-31.
- Stein, E., Lane, A. A., Cerretti, D. P., Schoecklmann, H. O., Schroff, A. D., Van Etten, R. L. and Daniel, T. O. (1998) 'Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses', *Genes Dev* 12(5): 667-78.
- Stern, C. D. (2004) 'The chick embryo--past, present and future as a model system in developmental biology', *Mech Dev* 121(9): 1011-3.
- Stern, C. D. (2005) 'The chick; a great model system becomes even greater', *Dev Cell* 8(1): 9-17.

Suetterlin, P., Marler, K. M. and Drescher, U. (2012) 'Axonal ephrinA/EphA interactions, and the emergence of order in topographic projections', *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 1-6.

Suzuki, A. and Ohno, S. (2006) 'The PAR-aPKC system: lessons in polarity', *J Cell Sci* 119(Pt 6): 979-87.

Taguchi, T. (2013) 'Emerging roles of recycling endosomes', *J Biochem* 153(6): 505-10.

Tan, A. M., Colletti, M., Rorai, A. T., Skene, J. H. and Levine, J. M. (2006) 'Antibodies against the NG2 proteoglycan promote the regeneration of sensory axons within the dorsal columns of the spinal cord', *J Neurosci* 26(18): 4729-39.

Tanaka, M., Ohashi, R., Nakamura, R., Shinmura, K., Kamo, T., Sakai, R. and Sugimura, H. (2004) 'Tiam1 mediates neurite outgrowth induced by ephrin-B1 and EphA2', *EMBO J* 23(5): 1075-88.

Teissie, J. (2014) 'Electropermeabilization of the cell membrane', *Methods Mol Biol* 1121: 25-46.

Tolias, K. F., Bikoff, J. B., Kane, C. G., Tolias, C. S., Hu, L. and Greenberg, M. E. (2007) 'The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development', *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(17): 7265-70.

Torres, R., Firestein, B. L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E. N., Haganir, R. L., Brecht, D. S., Gale, N. W. and Yancopoulos, G. D. (1998) 'PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands', *Neuron* 21(6): 1453-63.

Triplett, J. W. (2014) 'Molecular guidance of retinotopic map development in the midbrain', *Curr Opin Neurobiol* 24(1): 7-12.

Triplett, J. W. and Feldheim, D. A. (2012) 'Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps', *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 7-15.

Ughrin, Y. M., Chen, Z. J. and Levine, J. M. (2003) 'Multiple regions of the NG2 proteoglycan inhibit neurite growth and induce growth cone collapse', *J Neurosci* 23(1): 175-86.

Vergara, M. N. and Canto-Soler, M. V. (2012) 'Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development', *Neural Dev* 7: 22.

Vielmetter, J., Stolze, B., Bonhoeffer, F. and Stuermer, C. A. (1990) 'In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells', *Exp Brain Res* 81(2): 283-7.

Vihanto, M. M., Vindis, C., Djonov, V., Cerretti, D. P. and Huynh-Do, U. (2006) 'Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase', *J Cell Sci* 119(Pt 11): 2299-309.

Wadhams, G. H. and Armitage, J. P. (2004) 'Making sense of it all: bacterial chemotaxis', *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(12): 1024-37.

Walter, J., Kern-Veits, B., Huf, J., Stolze, B. and Bonhoeffer, F. (1987) 'Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro', *Development* 101(4): 685-96.

Weaver, J. C. (1995) 'Electroporation theory. Concepts and mechanisms', *Methods Mol Biol* 55: 3-28.

- Welz, T., Wellbourne-Wood, J. and Kerkhoff, E. (2014) 'Orchestration of cell surface proteins by Rab11', *Trends Cell Biol.*
- Weschenfelder, M., Weth, F., Knoll, B. and Bastmeyer, M. (2013) 'The stripe assay: studying growth preference and axon guidance on binary choice substrates in vitro', *Methods Mol Biol* 1018: 229-46.
- Wimmer-Kleikamp, S. H., Janes, P. W., Squire, A., Bastiaens, P. I. and Lackmann, M. (2004) 'Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact', *J Cell Biol* 164(5): 661-6.
- Woo, S., Rowan, D. J. and Gomez, T. M. (2009) 'Retinotopic mapping requires focal adhesion kinase-mediated regulation of growth cone adhesion', *J Neurosci* 29(44): 13981-91.
- Yates, P. A., Holub, A. D., McLaughlin, T., Sejnowski, T. J. and O'Leary, D. D. (2004) 'Computational modeling of retinotopic map development to define contributions of EphA-ephrinA gradients, axon-axon interactions, and patterned activity', *J Neurobiol* 59(1): 95-113.
- Yin, Y., Yamashita, Y., Noda, H., Okafuji, T., Go, M. J. and Tanaka, H. (2004) 'EphA receptor tyrosine kinases interact with co-expressed ephrin-A ligands in cis', *Neurosci Res* 48(3): 285-96.
- Yoo, S., Kim, Y., Noh, H., Lee, H., Park, E. and Park, S. (2011) 'Endocytosis of EphA receptors is essential for the proper development of the retinocollicular topographic map', *Embo j* 30(8): 1593-607.
- Yoo, S., Shin, J. and Park, S. (2010) 'EphA8-ephrinA5 signaling and clathrin-mediated endocytosis is regulated by Tiam-1, a Rac-specific guanine nucleotide exchange factor', *Mol Cells* 29(6): 603-9.
- Yoon, M. (1971) 'Reorganization of retinotectal projection following surgical operations on the optic tectum in goldfish', *Exp Neurol* 33(2): 395-411.
- Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M. and Noda, M. (2003) 'Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization', *Eur J Neurosci* 17(11): 2329-43.
- Zheng, J., Shen, W. H., Lu, T. J., Zhou, Y., Chen, Q., Wang, Z., Xiang, T., Zhu, Y. C., Zhang, C., Duan, S. et al. (2008) 'Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth', *J Biol Chem* 283(19): 13280-8.
- Zhuang, G., Hunter, S., Hwang, Y. and Chen, J. (2007) 'Regulation of EphA2 receptor endocytosis by SHIP2 lipid phosphatase via phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Rac1 activation', *J Biol Chem* 282(4): 2683-94.
- Zimmer, M., Palmer, A., Köhler, J. and Klein, R. (2003) 'EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion', *Nat Cell Biol* 5(10): 869-78.