

**Strategien zur *in vitro* Rekonstitution topographischer axonaler
Lenkung retinaler Axone und zur bildgebenden Darstellung
ihrer molekularen Mechanismen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Sebastiana Angela Ruisi

1. Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
 2. Referentin: Prof. Dr. Sylvia Erhardt
- Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2025

Selbstständigkeitserklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Mai 2019 bis April 2024 am Zoologischen Institut in der Abteilung für Zell- und Neurobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe. Die Satzung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Diese Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere außerdem, dass die beigelegte elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen Version der Arbeit übereinstimmt.

Datum, Ort

Unterschrift

Zusammenfassung

Die Aufklärung der Mechanismen neuronaler Verdrahtung während der Embryonalentwicklung gehört zu den zentralen Fragestellungen der Neurobiologie. Eines der wichtigsten Modelle der Entwicklung neuronaler Verschaltung sind topographische, also nachbarschaftstreue Projektionen. Die retinotektale Projektion retinaler Ganglienzellen (RGC) der Netzhaut (Retina) auf die optischen Zentren im Mittelhirn (*Colliculi Superiores* bzw. optisches Tektum) ist hierbei eines der am besten untersuchten Systeme. Vermittelt wird die retinotektale Projektion entlang der rostrocaudalen Achse nach bisherigem Wissensstand durch symmetrische, gegenläufige, repulsive Gradienten von EphA-Rezeptortyrosinkinasen und ephrin-A-Liganden entlang der respektiven Achsen von Retina und Tektum. Trotz jahrzehntelanger Untersuchungen sind die genauen Mechanismen der axonalen Lenkung jedoch weiterhin unvollständig verstanden. Wir vermuten, dass diese Gegengradienten ein Lenkungspotential an die Wachstumskegel vermitteln und das Zielgebiet im optischen Tektum durch die Wahrnehmung eines individuellen Potentialminimums erreicht wird.

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Werkzeuge für die Rekonstitution und Untersuchung einer topographisch kontinuierlichen Projektion auf Gegengradienten-Substraten *in vitro* zu entwickeln. Durch eine Senkung des pH-Wertes konnte die starke Bindungsaffinität zwischen EphA3-hFc und ephrin-A2-mFc signifikant und reversibel herabgesetzt werden. Dies ermöglichte die erfolgreiche zweifache Funktionalisierung einer epoxysilanisierten Glas-Oberfläche durch *micro contact printing* von EphA3-hFc und Überschichtung mit ephrin-A2-mFc aus saurer Lösung ohne die gegenseitige Bindung und Inaktivierung der Lenkungsmoleküle. Hierbei stellte sich jedoch schon in Einzel- als auch alternierenden Doppelstreifen-Assays heraus, dass EphA3-hFc auf den für die geplanten Gradientenassays nötigen epoxysilanisierten oder zusätzlich mit Poly-L-Lysin und einem chemischen *Crosslinker* beschichteten Oberflächen nur sehr schwach gradiertes, aber nie topographisch differentielles *reverse signaling* auslöst. Ephrin-A2-mFc dagegen vermittelt selbst nach einer Rückführung in einen neutralen pH-Wert auf beiden Oberflächen sowohl ein gradiertes als auch topographisch differentielles *forward signaling* an retinale Axone, welches zudem eine teilweise bifunktionelle Rolle (Attraktion bei kleinen Konzentrationen) von ephrin-A2-mFc andeutet. Dies legt nahe, dass die erwartete Rolle des EphA3-Gradienten in derzeitigen *in vitro* Assays nicht adäquat abgebildet werden kann und dass das zugrunde liegende Modell der retinotektalen Projektion eventuell zu vereinfachte Annahmen über die Mechanismen der retinotektalen Projektion macht und weiterer Feinjustierung bedarf.

Des Weiteren konnte die Co-Expression von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in transfizierten RGC etabliert werden. Diese selbstmarkierenden Fusionsproteine erlauben, eventuell in Kombination mit Expansionsmikroskopie, die Visualisierung und Untersuchung der subzellulären Lokalisation und Dynamiken beider Lenkungsmoleküle in Wachstumskegeln während der axonalen Lenkung. Damit können die komplexen subzellulären Dynamiken während der topographischen Lenkung untersucht und weitere Erkenntnisse über die Mechanismen der retinotektalen Projektion erlangt werden.

Inhalt

Zusammenfassung	7
1 Einleitung	1
1.1. Die retinotektale Projektion	1
1.2. Ausbildung einer topographischen Karte	2
1.3. Axon-Target und Axon-Axon Interaktionen	4
1.4. Eph/ephrin Signaltransduktion	5
1.5. Modellierung der topographischen Projektion im retinotektaen System	7
1.6. Fluoreszente Visualisierung der axonalen Lenkungsmaschinerie.....	10
1.7. Limitierungen von <i>in vitro</i> Entscheidungsassays	11
1.8. Zielsetzung	13
2 Material.....	14
2.1. Organismen	14
2.2. Proteine und Enzyme.....	14
2.3. Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe & Nukleotide	15
2.4. Medien, Puffer und Lösungen	16
2.5. Andere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
2.6. Geräte und Software	20
2.7. Plasmide	21
3 Methoden	22
3.1. Molekularbiologische Methoden und Klonierung	22
3.2. Zellkultur und Lipofektion von NIH 3T3 Zellen	23
3.3. Präparation, Explantatkultur und Elektroporation der embryonalen Hühnerretina.....	24
3.4. Messung der Bindungskinetik mit Biolayer-Interferometrie (BLI)	25
3.5. Oberflächenaktivierung und -beschichtung	27
3.6. Streifenassays	28
3.6.1. EphA3-Fc Streifenassays via <i>micro contact printing</i>	28
3.6.2. ephrin-A2-mFc Streifenassays durch Adsorption aus Lösung	29
3.6.3. Doppelstreifen-Assays.....	30
3.6.4. Mikroskopische Aufnahmen und Auswertung der Streifenassays	30
3.7. Zelfärbung, Zellfixierung und Immunhistochemie	31
3.7.1. HaloTag- und SNAP-Tag Färbungen.....	31
3.7.2. Fixierung & Immunhistochemie.....	32

3.8. <i>Expansion Microscopy (ExM)</i>	33
4 Ergebnisse	35
4.1. Methoden zur Rekonstitution von EphA3-/ephrin-A2-mFc Gegengradienten <i>in vitro</i> ..	35
4.1.1. Reversible Reduktion der Rezeptor-Liganden-Affinität in pH4	35
4.1.2. Dreiecksförmige Strukturen als Modell für <i>in vitro</i> Gegengradienten.....	38
4.2. Einfluss des Phosphat-Citrat Puffers (pH4) auf axonales Wachstum in Gegengradienten-Assays.....	43
4.2.1. Wiederherstellung des axonalen Wachstums nach Überschichtung mit saurer Lösung in Streifen-Assays.....	45
4.3. Lenkungseigenschaften von ephrin-A2-Fc und EphA3-Fc auf Epoxysilan.....	46
4.3.1. Repulsion durch ephrin-A2-Fc nach adsorptiver Immobilisierung in PBS bzw. pH4 auf epoxysilanisiertem Glas.....	46
4.3.2. EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas.....	50
4.3.3. Repulsion durch EphA3-Fc nach Immobilisierung auf epoxysilanisiertem Glas ..	51
4.4. Hitze-Inaktivierung zeigt eine Restaktivität von EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas	54
4.5. Lenkungseigenschaften von ephrin-A2-mFc und EphA3-Fc auf Epoxysilan mit Poly-L- Lysin (PLL) und Disuccinimidylcarbonat (DSC)	55
4.5.1. EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC-Linker.....	55
4.5.2. Repulsion durch EphA3-Fc nach Immobilisierung auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC	58
4.5.3. Repulsion durch ephrin-A2-mFc nach Immobilisierung in pH4 auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC	60
4.6. Expression von HaloTag-EphA3 und SNAP-Tag ephrin-A5 <i>in vitro</i>	63
4.6.1. Reduktion der Expressionsstärke von pCIG2 HaloTag-EphA3.....	64
4.6.2. Expression des attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 in NIH 3T3 Zellen	64
4.6.3. Expression des attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 in RGC.....	65
4.6.4. Co-Expression von SNAP-ephrin-A5 und <i>atten.</i> HaloTag-EphA3 <i>in vitro</i>	67
4.7. Expansion retinaler Wachstumskegel mit <i>Expansion Microscopy</i>	69
5 Diskussion	72
5.1. Die Bindungsaffinität zwischen EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc lässt sich reversibel reduzieren.....	72
5.2. Verhalten retinaler Axone in Dreiecksgradienten	73
5.3. Wiederherstellung von inhibiertem Axonwachstum auf ephrin-A2-mFc nach pH4	77
5.4. Einzel- und Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas	79

5.4.1. Ephrin-A2-mFc löst nach Rückführung aus saurer Lösung gradiertes und differentielles <i>forward signaling</i> aus.....	79
5.4.2. EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas zeigen keine axonale Lenkung.....	80
5.4.3. EphA3-Fc löst auf epoxysilanisiertem Glas kein <i>reverse signaling</i> aus.....	82
5.5. Einzel- und Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit Poly-L-Lysin und DSC-Linker	85
5.5.1. In Doppelstreifen-Assays wirkt EphA3-Fc auf PLL / DSC überaktiv auf retinale Axone.....	85
5.5.2. EphA3-Fc löst leicht gradiertes aber kein topographisch differentielles <i>reverse signaling</i> aus	86
5.5.3. ephrin-A2-mFc vermittelt topographisch differenzielle und gradierte Lenkung	87
5.6. Die Bedeutung der <i>in vitro</i> Ergebnisse für das Modell der retinotektalen Projektion ...	90
5.7. Expression von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 zur Visualisierung ihrer Dynamik während der axonalen Lenkung	95
5.7.1. Transfizierte RGCs benötigen angepasste Kulturbedingungen <i>in vitro</i>	96
5.7.2. Visulisierung von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 durch fluoreszente Liganden	98
5.7.3. HaloTag-EphA3 und SNAP-Tag ephrin-A5 lassen sich in RGCs co-exprimieren.	99
5.7.4. Die Untersuchung der axonalen Lenkungsmaschinerie benötigt spezielle Methoden	100
6 Ausblick	102
7 Anhang	103
8 Verzeichnisse.....	104
8.1. Abkürzungsverzeichnis	104
8.2. Abbildungsverzeichnis.....	105
8.3. Literaturverzeichnis.....	107
Publikationsliste	117
Danksagung.....	118

1 Einleitung

Das zentrale Nervensystem zeichnet sich insbesondere durch seine hochkomplexe Verdrahtung aus, welche die immense Vielzahl an Neuronen miteinander verknüpft und es so zu seiner komplexen Funktion befähigt. Um solch anspruchsvolle Architekturen zu konstruieren, bedarf es während der Embryonalentwicklung raffinierter Mechanismen, die Neurone bzw. ganze neuronale Areale zielsicher und geordnet miteinander verknüpfen. Ein fundamentaler Typ solcher geordneten Verknüpfungen sind topographische Projektionen die, anders als „typographische“ Verknüpfungen z.B. im olfaktorischen System, nicht bestimmte Typen von Neuronen miteinander verbinden, sondern die Nachbarschaftsbeziehungen zwischen Neuronen und ihren axonalen Zielen aufrechterhalten. Diese findet man beispielsweise im auditorischen und somatosensorischen System, sind jedoch für die retinotektale/retinocolliculäre Projektion des visuellen Systems am besten untersucht (Feldheim & O'Leary, 2010; Lemke & Reber, 2005; Weth et al., 2014).

1.1. Die retinotektale Projektion

Während der retinocolliculären bzw. retinotektalen Projektion verknüpfen sich Axone retinaler Ganglienzellen (retinal ganglion cells, RGCs) aus der Retina mit höheren optischen Hirnarealen. In Säugetieren erfolgt die Projektion primär in den seitlichen Kniehöcker des Thalamus und von dort in den primären visuellen Kortex, kollateral aber auch in die *colliculi superiores*, die oberen Hügel der Vierhügelplatte, und von dort wiederum über den Thalamus in höhere visuelle kortikale Areale. Homolog dazu ist in Vertebraten wie Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln das optische Tektum (*tectum opticum*). Insbesondere eignen sich Hühnerembryonen, aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit und Größe sowohl der Augen als auch des optischen Tektums, als hervorragende Modellorganismen für die Erforschung der retinotektalen Projektion des visuellen Systems während der Embryonalentwicklung (Thanos & Mey, 2001; Vergara & Canto-Soler, 2012).

Die retinotektale Projektion zeichnet sich vor allen Dingen durch ihren nachbarschaftstreuen, also topographischen, Charakter aus. Dabei projizieren Axone der RGCs der temporo-nasalen Achse der Retina auf die anterior-posteriore Achse des optischen Tektums und behalten bei der Ausbildung ihrer Terminationszonen ihre ursprünglichen Nachbarschaftsbeziehungen bei. Analog dazu erfolgt die Ausbildung einer entsprechenden zweiten Achse des Sehfeldes durch die Projektion der RGCs der dorso-ventralen Achse der Retina auf die latero-mediale Achse des Tektums. Die dabei zielgerichtete Projektion eines Axons an sein Zielgebiet wird von dem Wachstumskegel vermittelt, einer motilen und hochdynamischen Struktur an der Spitze des Axons, welche biochemische Lenkungssignale der Umgebung wahrnimmt und ausliest (Mortimer et al., 2008; Mueller, 1999). Auf solche Lenkungssignale reagiert der Wachstumskegel mit rapiden Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts seiner Lamelli- und

Filopodien, welche sich in einer Richtungsänderung zum Lenkungssignal hin (attraktiv) oder vom Lenkungssignal weg (repulsiv) äußern und auf diese Weise das Axon an seine jeweilige Terminationszone führen (Gomez & Letourneau, 2014; Nichol et al., 2016; Vitriol & Zheng, 2012).

Obwohl sich die Prinzipien der Verdrahtung gleichen, gibt es zwischen den Modellorganismen der retinotektaLEN Projektion durchaus Unterschiede bei der Ausbildung der Terminationszonen. Während Axone von Fischen und Amphibien direkt an ihre Terminationszonen im Tektum projizieren (Holt & Harris, 1983) und in Hühnerembryonen nur leicht darüber hinausschießen (Nakamura & O'Leary, 1989; Yates et al., 2001), projizieren Axone in Säugern bis an das caudale Ende des *superior colliculus*. Sie bilden an ihren individuellen Terminationszonen entlang des Axons interstitielle Verzweigungen aus und ziehen das überschließende Axon anschließend bis dorthin wieder zurück. Welche Mechanismen der Ausbildung von Terminationszonen tatsächlich zugrunde liegen, ist noch nicht zur Gänze erforscht. Was eine solche Terminationszone auszeichnet und wie Wachstumskegel diese vermutlich erkennen, wird in den folgenden Abschnitten detaillierter erläutert.

1.2. Ausbildung einer topographischen Karte

Wie eine topographische, also nachbarschaftstreue, Verdrahtung der Retina in das optische Tektum entsteht, ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung. Den Grundstein für die Erforschung eines möglichen Mechanismus legte Roger Sperry mit der auf seine grundlegenden Experimente gestützten Hypothese der Chemoaffinität (Sperry, 1963). In dieser postulierte er eine gradierte Verteilung von chemischen Markern auf dem optischen Tektum, welche von den projizierenden Wachstumskegeln in Abhängigkeit ihrer Affinität für diese Marker, genutzt werden um an ihr Zielgebiet zu lenken. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurde von diversen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen die Existenz solcher in Lenkungsmoleküle bestätigt und deren Identität aufgeklärt. So ist bekannt, dass entlang der anterior-posterior Achse des optischen Tektums ein abfallender Gradient von EphA-Rezeptoren (Connor et al., 1998) und ein dazu gegenläufig ansteigender Gradient von ephrin-A-Liganden (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995) existiert (Abbildung 1). Analog dazu gibt es auf der Retina einen von nasal nach temporal abfallenden Gradienten von ephrin-A (Hornberger et al., 1999; Menzel et al., 2001) und einen dazu gegenläufig ansteigenden Gradienten von EphA (Cheng et al., 1995; Connor et al., 1998).

Jede RGC in der Retina und jede Zelle im optischen Tektum exprimiert damit ein topographisch individuelles Verhältnis von EphA und ephrin-A, das zur Zielfindung verwendet wird. Dies wiederum bedeutet, dass retinale Wachstumskegel demnach die gleichen Proteine während der axonalen Zielfindung als Antenne nutzen, welche das eigentliche Lenkungssignal im Tektum darstellen. Dies erscheint dem Leser zunächst kontraintuitiv, erschließt sich

jedoch durch die Fähigkeit des EphA/ephrin-A Systems zum bidirektionalen *signaling* im Wachstumskegel. Dies bedeutet, dass sowohl EphA als auch ephrin-A gleichermaßen sowohl als Rezeptor als auch Ligand fungieren können (Kullander & Klein, 2002). Während die Bindung von ephrin-A als Ligand durch EphA-Rezeptoren zu einem *forward signaling* in der EphA exprimierenden Zelle führt (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995), löst die Bindung von EphA als Ligand durch ephrin-A ein *reverse signaling* in der ephrin-A exprimierenden Zelle aus (Davy et al., 1999). Beide Signalwege induzieren repulsive Effekte in einem Wachstumskegel, welche für eine gerichtete Zielfindung genutzt werden (siehe auch Abschnitt 1.4. Eph/ephrin Signaltransduktion).

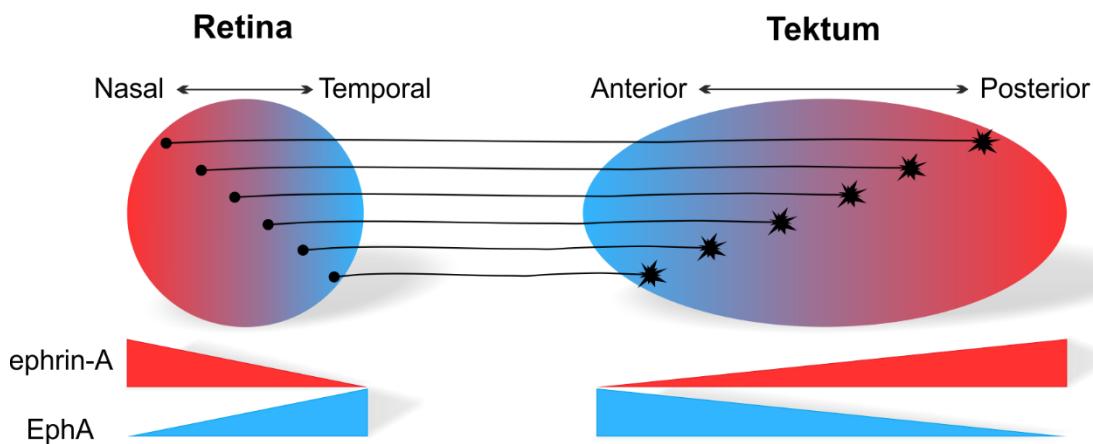


Abbildung 1: Die retinotektale Projektion vermittelt durch EphA und ephrin-A

Ein gegenläufiger Gradient von repulsivem ephrin-A (rot) und EphA (blau) entlang der temporo-nasalen Achse der Retina bestimmt die molekulare Identität retinaler Ganglienzellen (RGCs). Axone der RGCs projizieren entsprechend ihrer Herkunft entlang der anterior-posterioren Achse des optischen Tektums. Modifiziert nach (Gebhardt, 2009).

In Hühnerembryonen erreichen projizierende Axone das optische Tektum zunächst an seiner anterior-ventralen Seite und wachsen an der dorsalen Oberfläche in Richtung posteriores Ende bis an jene Position im Tektum, welche der individuellen Expression von EphA und ephrin-A aus dem Gradienten der Retina entspricht (Abbildung 1). Es wird angenommen, dass sich an diesen Positionen der Einfluss des *forward* und *reverse signaling* durch EphA und ephrin-A auf den Wachstumskegeln ausgleicht und diese Balance der Signaltransduktion die Terminationszone im Tektum bestimmt (Gebhardt et al., 2012). Haben Wachstumskegel ihre Terminationszone entlang der anterior-posterioren Achse erreicht, innervieren sie tiefere Schichten des Tektums und bilden hier terminale Verzweigungen aus (Mey & Thanos, 2000).

Im Gegensatz zur Entstehung der temporo-nasal/anterior-posterioren Achse, die über das bidirektionale EphA/ephrin-A System vermittelt wird, ist über die Mechanismen der Ausbildung einer dorso-ventralen/medio-lateralen Achse noch wenig bekannt. Es wird allerdings vermutet, dass diese weitestgehend unabhängig vom EphA/ephrin-A System entsteht (Hindges et al., 2002; Mann et al., 2002).

1.3. Axon-Target und Axon-Axon Interaktionen

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, lesen retinale Wachstumskegel während ihrer Projektion Lenkungssignale des optischen Tektums aus und orientieren sich auf diese Weise entlang dessen Achsen. *In vitro* lassen sich die topographischen Entscheidungen retinaler Axone mit Entscheidungs-Assays untersuchen. In sogenannten Streifenassays aus alternierenden Streifen tektaler Membran-Homogenate, entscheiden sich Axone der temporalen Retina repulsiv gegen Streifen aus posterioren Membranen und wachsen dadurch bevorzugt auf anterioren Membrane, während Axone der nasalen Population keine Präferenz zeigen (Baier & Bonhoeffer, 1992; von Boxberg et al., 1993; Walter et al., 1987). Das Zielgebiet (Target) selbst trägt demzufolge also wie von Sperry vorhergesagt eine topographische Information. Dass die EphA/ephrin-A Gegengradienten im Tektum allein ausreichen, um eine topographische Lenkung zu vermitteln, zeigt ein Experiment in welchem einzelne RGCs in sogenannten *Lakritz* Zebrafisch-Mutanten transplantiert wurden, welche selbst keinerlei RGC besitzen (Gosse et al., 2008). In diesen Experimenten projizierten die vereinzelten RGC an ihre topographisch korrekte Stelle und zeigen damit, dass eine alleinige Axon-Target Interaktion ausreicht, um eine topographische Karte ausbilden zu können.

Das Auslesen des EphA/ephrin-A Gegengradienten auf dem Tektum mag die zielgerichtete Projektion und robuste Ausbildung einer retinotektaalen Karte erklären, steht jedoch auch im Widerspruch zu überraschenden Erkenntnissen über die Plastizität einer solchen Karte. So bildet sich beispielsweise nach der Entfernung der anterioren oder posterioren Hälfte des Tektums nicht etwa eine halbe, sondern eine topographisch korrekte, aber komprimierte Karte aus. Selbst Axone, deren Zielgebiet entfernt wurde, erreichten weiterhin ihr topographisch korrektes Ziel, relativ zur Größe des verbleibenden Tektums (Sharma, 1972; Yoon, 1971). Dies deutet darauf hin, dass während der Axonlenkung keine ausschließliche Axon-Target Wechselwirkung stattfindet, sondern eine zusätzliche Komponente an der Ausbildung einer topographischen Karte beteiligt sein muss. Eine entscheidende Evidenz hierfür ergab der genetische knock-in von EphA3 Teilpopulationen von RGCs in Mäusen (Brown et al., 2000). Die Überexpression von EphA3 in zufällig verteilten retinalen Ganglienzellen der Maus, führte durch die erhöhte Expression des Rezeptors und einem dadurch resultierend erhöhte *forward signaling* wie erwartet dazu, dass sich die entsprechenden Axone weiter anterior im *superiore colliculus* der Maus einfanden. Insgesamt jedoch bildeten sich zwei topographische Karten aus: eine Karte der EphA3 knock-in Axone im anterioren Tektum und eine zweite topographische Karte der Wildtyp-Axone, welche durch die knock-in Axone weiter ins posteriore Tektum verdrängt wurden. Wir nehmen an, dass die Wildtyp-Axone durch das überexprimierte EphA3 der transfizierten Axone ein ebenso erhöhtes *reverse signaling* erfuhren und sich dadurch verdrängen ließen. Es schien neben einer reinen Axon-Target

Interaktion demnach auch eine Axon-Axon Interaktion zu existieren, welche die Wirkung der Axon-Tektum Interaktion nicht nur beeinflusst, sondern diese sogar überschreiben kann.

Es ergeben sich mit der Axon-Target und der Axon-Axon Interaktion zwei autonome Mechanismen, die bei der Ausbildung einer topographischen Karte während der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen. Neben der Interaktion von EphA und ephrin-A eines Wachstumskegels mit seinem Target oder benachbarten Axonen in *trans*, gibt es zudem noch die Möglichkeit, dass Rezeptoren und Liganden des gleichen Wachstumskegels während einer *cis* Interaktion miteinander in Kontakt treten (Carvalho et al., 2006; Hornberger et al., 1999; Kao & Kania, 2011). Unter Berücksichtigung dieser möglichen Interaktionen, die sowohl in *forward* als auch *reverse* Richtung stattfinden können, ergeben sich damit sechs mögliche Wege der Signaltransduktion innerhalb eines retinalen Wachstumskegels: Axon-Target (*forward* und *reverse*), Axon-Axon *trans* (*forward* und *reverse*) sowie Axon-Axon *cis* (*forward* und *reverse*). Eine Übersicht über diese Interaktionen gibt Weth et al. (2014).

1.4. Eph/ephrin Signaltransduktion

Eph-Rezeptortyrosinkinasen (RTK) stellen die größte Subfamilie der Rezeptortyrosinkinasen dar und lassen sich in die Klassen EphA- (EphA1-EphA8 und EphA10) und EphB (EphB1-EphB4 und EphB6) unterteilen (Pasquale, 2004). Innerhalb ihrer Klassen binden EphA- und EphB-Rezeptoren promiskuitiv ihre ephrin-A- (ephrin-A1-ephrin-A5) bzw. ephrin-B-Liganden (ephrin-B1-ephrin-B3). Ausnahmen bilden hier EphA4, welches ebenso B-ephrine binden kann (Gale et al., 1996; Pasquale, 2004), sowie ephrin-A5 welches ebenso EphB2 bindet (Himanen et al., 2004). Eine Übersicht über die vielfältige Promiskuität von Eph-Rezeptoren und ephrin-Liganden wurde von Noberini, Rubio de la Torre, et al. (2012) erarbeitet.

Eph-Rezeptoren sind Transmembranproteine, deren extrazelluläre Domäne aus einer Ligandenbindedomäne (LBD), einer Cystein-reichen Domäne (CRD) sowie zwei Fibronektin-III-Domänen (FN-III) besteht. Die intrazelluläre Domäne besteht aus einer Juxtamembran-Region (JMR), einer Tyrosin-Kinasedomäne, einem *sterile-a-motif* (SAM) sowie einem *PDZ binding motif* (PBM). Im Wesentlichen besitzen EphA- und EphB-Rezeptoren die gleiche Struktur, werden jedoch aufgrund ihrer jeweiligen Bindungsaffinität zu ephrin-A und ephrin-B unterschieden. Es wird angenommen, dass Eph-Rezeptoren in kleinen Clustern in der Membran vorliegen, während sich ephrin-As in cholesterinreichen Mikrodomänen der Zellmembran, sogenannten *lipid rafts*, befinden und so räumlich segregiert sind. Durch die Bindung eines ephrin-Liganden an einen Eph-Rezeptor kommt es zu einer Autophosphorylierung der Juxtamembran-Region, was zu einer Dimerisierung der Rezeptoren sowie Transphosphorylierung der intrazellulären Domänen führt. Auf diese Weise aktiviert Eph-Rezeptoren durch Interaktion der Ligandenbindedomäne mit weiteren Dimeren Eph/ephrin-Heterotetramere aus. Diese Tetramere rekrutieren über weitere Interaktionen der LBD-FN-III oder LBD-CRD-Regionen auch ungebundene Eph-Rezeptoren, wodurch größere

Oligomer-Cluster ausgebildet werden (Himanen et al., 2010; Wimmer-Kleikamp et al., 2004). Ausgehend von solchen Clustern, kommt es durch gegenseitige Phosphorylierung der intrazellulären Domänen, zu einer *forward* Signaltransduktion in der Zelle. Die Größe der Cluster ist variabel, wobei es Evidenz für eine Korrelation von Cluster-Größe und der Stärke des *forward signalings* gibt (Nikolov et al., 2013). Die Konsequenz eines Eph/ephrin *forward signalings* ist die lokale Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts, vermittelt durch Rho-GTPasen (Hall, 2012), welche zu einer repulsiven Richtungsänderung des Wachstumskegels weg von der Signalquelle oder gar zu einem vollständigen Kollaps des Wachstumskegels und Retraktion des Axons führt. Zudem beschrieb Shi et al. kürzlich eine bimodale Funktion von EphA2-Clustern in Tumorzellen (Shi et al., 2023). In diesen fördern EphA2-Cluster in Abwesenheit von ephrin-A Liganden über einen nicht-kanonischen Signalweg onkogene Eigenschaften der Tumorzellen. Durch die Bindung von ephrin-A wird die laterale Kondensation größerer EphA2-Cluster induziert und dadurch der kanonische Signalweg aktiviert, welcher das onkogene Potential der Zelle inhibiert und würde so für eine potentielle Bifunktionalität sprechen.

Wie im Abschnitt 1.2. erwähnt, zeichnet sich die Eph/Ephrin Signaltransduktion insbesondere durch ihre Fähigkeit des bidirektionalen *signalings* aus. Dies bedeutet, dass es neben dem *forward signaling* nach Bindung eines ephrin-Liganden durch den Eph-Rezeptor, ebenso ein *reverse signaling* nach Bindung eines Eph-Rezeptors durch den ephrin-Liganden gibt (Kania & Klein, 2016; Kullander & Klein, 2002). Das GPI-verankerte ephrin-A befindet sich in *lipid rafts* auf der Zellmembran (Averaimo et al., 2016; Davy et al., 1999; Marquardt et al., 2005) und damit räumlich getrennt von Eph-Rezeptoren. Aufgrund seiner fehlenden intrazellulären Domäne ist ephrin-A auf die Beteiligung von Co-Rezeptoren angewiesen um eine intrazelluläre Signalkaskade anzustoßen. Die Mechanismen des repulsiven ephrin-A/EphA *reverse signalings* sind bisher noch nicht vollständig entschlüsselt, jedoch weisen Studien auf die Beteiligung der Scr-Kinasefamilie sowie der Co-Rezeptoren TrkB (Marler et al., 2008) und p75NTR (Lim et al., 2008) unter der Beteiligung von Neurotrophinen wie BDNF und proBDNF hin (Lisabeth et al., 2013; Marler et al., 2010).

Alle Wechselwirkungen, ausgehend von *forward* und *reverse* Axon-Target-, sowie Axon-Axon Interaktionen in *trans* und *cis*, werden im Wachstumskegel integriert und geben diesem somit eine Positions- und Richtungsinformation vor. Erstaunlich bleibt dabei, wie ein ausschließlich auf repulsiven Signalen beruhendes Lenkungssystem eine axonale Lenkung und Ausbildung einer topographischen Karte ermöglicht.

1.5. Modellierung der topographischen Projektion im retinotektaLEN System

Angesichts der mehrdeutigen Ergebnisse zahlreicher *in vivo* und *in vitro* Experimente, werden seit den frühen 1970er Jahren sowohl theoretische als auch computergestützte Modelle entwickelt, welche die Ausbildung einer topographischen Karte erklären sollen. Viele dieser Modelle konnten die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse jedoch nur begrenzt nachbilden (für eine detaillierte Übersicht der Modelle siehe Goodhill (2007)). Ein Modell, welches fundamentale Erkenntnisse für die heute bestehenden Annahmen liefert und hier angesprochen werden sollte, stammt von Alfred Gierer (1981). Sein Modell basiert auf der Annahme, dass retinale Wachstumskegel während der retinotektaLEN Projektion nicht etwa zufällig ihre Terminationszonen auf dem optischen Tektum (Target) suchen, sondern vielmehr gerichtet entlang eines Potentialgradienten wandern. Ein solches Potential stellt eine lenkende Kraft dar, wobei ein Wachstumskegel dann zum Stehen kommt, wenn ein Potentialminimum erreicht ist. Für die Entstehung eines Potentialminimums könnten tektale Gradienten zwei Modi besitzen: entweder wirkt ein Gradient bifunktional, besitzt als also beispielsweise attraktive Lenkungseigenschaften, die ab dem am Zielort herrschenden Schwellenwert in repulsive Eigenschaften umschlagen oder aber es existieren zwei monofunktionale, z.B. zwei entgegengesetzt repulsive Gradienten. In beiden Fällen würde ein Wachstumskegel seine Terminationszone an jener Stelle im Tektum erreichen, an der er sein individuelles Potentialminimum erfährt.

Gierer's Modell der Potentialminimierung hat maßgeblich zu einem Verständnis der retinotektaLEN Modellierung beigetragen, basierte jedoch noch ausschließlich auf Axon-Target Interaktionen. Ergebnisse wie aus experimentelle Eingriffen wie Streifenassays oder der Projektion vereinzelter RGC, welche die Axon-Target Interaktion betrachteten, wurden so zwar nachvollziehbar, konnten jedoch wiederum die Ergebnisse der Kompressions- oder EphA3 knock-in Experimente nicht erklären. Dies sprach erneut dafür, dass Axon-Axon Interaktionen eine autonome Funktion für die Ausbildung der topographischen Karte haben mussten. Paul Yates berücksichtigte in seinem Modell neben den erwähnten *forward* und *reverse* Axon-Target Interaktion ebenfalls die *forward* und *reverse* Axon-Axon Interaktionen (Yates et al., 2004). Sein Modell geht davon aus, dass ins Tektum einwachsende Primäraxone während ihrer Projektion interstitielle Verzweigungen (*interstitial branches*) ausbilden, wobei sich die Wahrscheinlichkeit für deren Entstehen und Aufrechterhaltung mit Annähern des individuellen Potentialminimums entlang des tektalen Gradienten erhöht. Zu einem späteren Zeitpunkt einwachsende Axone nehmen dadurch nicht ausschließlich Lenkungssignale des Targets, sondern in erhöhtem Maße auch Signale der *interstitial branches* von bereits eingewachsenen Axonen wahr. Der tektale Gradient wird demnach durch *interstitial branches* zusätzlich verschärft und mit zeitlichem Verlauf durch Axon-Axon Wechselwirkungen dominiert. Obwohl

dieses Modell weite Teile experimenteller Evidenzen erklären kann, benötigt es für die Erklärung der erstaunlichen Plastizität einer topographischen Karte einen weiteren aktivitätsabhängigen Mechanismus, nach dem Hebb'schen Prinzip von *Fire together, wire together*. Die Ausbildung einer korrekten topographischen Karte ist jedoch unabhängig von gemeinsamen spontanen Aktivitäten (Benjumeda et al., 2013) eine Erkenntnis, welche das Modell von Yates in dieser Hinsicht limitiert.

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein computerbasiertes Modell entwickelt, welches die notwendige Plastizität einer topographischen Karte unabhängig der Hebb'schen Aktivität ermöglicht. Dieses Modell berücksichtigt sowohl die *forward* und *reverse* Axon-Target als auch die *forward* und *reverse* Axon-Axon Interaktionen in *trans* und *cis* und integriert damit erstmals alle sechs Dimensionen der Eph/ephrin Signaltransduktion (Gebhardt et al., 2012; Gebhardt, 2009). Basierend auf der Idee von Gierer, geht unser Modell ebenfalls von einem Mechanismus der Potentialminimierung aus. Durch die Integrierung aller sechs Wege der Signaltransduktion im Wachstumskegel unterscheidet dieser nicht ob Signale vom Target oder einem benachbarten Axon ausgehen, sondern summiert unabhängig ihres Ursprungs alle *forward* (Rezeptor:Ligand) und alle *reverse* (Ligand:Rezeptor) Signale auf. Das Verhältnis von *forward* zu *reverse signaling* wird als Lenkungspotential G von einem Wachstumskegel wahrgenommen (Gebhardt et al., 2012). Das Modell basiert auf der Annahme, dass ein Wachstumskegel während seiner Projektion an jeder Stelle im zweidimensionalem Raum des Targets ein individuelles Lenkungspotential $G_{x,y}$ in Abhängigkeit seiner eigenen molekularen Identität in der Retina erfährt. Bei jedem Schritt innerhalb des x,y-Raums im Target wird die Veränderung des Lenkungspotentials $G_{x,y}$ neu bewertet und mit erhöhter Wahrscheinlichkeit ein Schritt in Richtung des niedrigeren Potentials gemacht.

Mathematisch ausgedrückt entspricht das Lenkungspotential $G_{x,y}$ dem Absolutbetrag des Logarithmus des Quotienten aus der Summe des gesamten *reverse signalings* (Ligand:Rezeptor) und der Summe des gesamten *forward signalings* (Rezeptor:Ligand). Die sechs Wege der Signaltransduktion werden gleichermaßen einbezogen und gewichtet (Abbildung 2) *Cis*-Interaktionen haben allerdings auf das Lenkungspotential keinen rechnerischen Einfluss, da diese im Wachstumskegel stets ein gleichermaßen starkes *forward* wie *reverse signaling* auslösen und sich gegenseitig aufheben. Sie haben eine Rolle bei der Adaptation (s.u.). Axon-Axon *trans* Wechselwirkungen dagegen, gewinnen während der Ausbildung der topographischen Karte, aufgrund der steigenden Anzahl einwachsender Axone ins Tektum, immer größeren Einfluss in dieser Gleichung. Nähert sich ein Wachstumskegel entlang der x,y-Achse dem Verhältnis von Eph/ephrin, welches seiner retinalen Herkunft entspricht, nähert sich ebenso das Lenkungspotential der Null an. Das Potential wird demnach sukzessive minimiert und ein Minimum ist an jener Stelle erreicht, an der sich das Verhältnis von Eph/ephrin im Target, dem Verhältnis von Eph/ephrin auf dem Axon angleichen und somit

keine Imbalance des *signalings* mehr im Wachstumskegel herrscht. Der Wachstumskegel hat hier seine individuelle Terminationszone erreicht.

$$G_{x,y} = \left| \ln \frac{\sum \text{rev} [\text{Axon:Target} + \text{trans Axon:Axon} + \text{cis Axon:Axon}]}{\sum \text{fwd} [\text{Axon:Target} + \text{trans Axon:Axon} + \text{cis Axon:Axon}]} \right|_{x,y}$$

Abbildung 2: Darstellung des mathematischen Modells der retinotektaen Projektion nach Gebhardt et al.
Das Lenkungspotential ($G_{x,y}$) eines Wachstumskegels basiert auf dem logarithmischen Quotienten der summierten reverse (rev) Signale und summierten forward (fwd) Signale. Dabei werden Axon:Target sowie Axon:Axon Interaktionen in trans und cis gleichermaßen einbezogen. Die trans Axon:Axon Interaktionen gewinnen mit fortschreitender Projektion aufgrund der steigenden Anzahl an Interaktionspartnern an Bedeutung. Modifiziert nach Gebhardt et al. (2012)

Dieses Modell ist das erste seiner Art, welches nicht nur die Ausbildung einer topographischen Karte während der retinotektaen Projektion, sondern die meisten *in vivo* und *in vitro* Experimente in diesem Zusammenhang robust simulieren kann (Gebhardt et al., 2012; Weth et al., 2014). Gebhardt konnte in seiner Arbeit die Validität dieses Modells zusätzlich unterstützen, indem er *in silico* noch ungetestete Szenarien simulieren ließ, welche er anschließend *in vitro* bestätigen konnte: so simulierte er das axonale Lenkungsverhalten temporaler und nasaler retinaler Ganglienzellen auf einem Entscheidungs-Assay aus alternierenden Streifen von EphA-Rezeptor und ephrin-A Liganden (sog. Doppelstreifen-Assay) *in silico*. Das mathematische Modell prognostizierte hierbei eine Repulsion temporaler Axone durch ephrin-A und ein bevorzugtes Wachstum auf EphA, während nasale Axone EphA-Streifen vermieden und bevorzugt auf ephrin-A-Streifen auswuchsen. Angesichts der repulsiven Lenkungseigenschaften beider Proteine erscheint dieses Verhalten zunächst überraschend, lässt sich jedoch im Hinblick auf die molekulare Identität nasaler und temporaler Axone leicht nachvollziehen (Abbildung 1): nasale Axone exprimieren vermehrt ephrin-A und erfahren dadurch ein erhöhtes *reverse signaling* durch EphA, während temporale Axone durch die vermehrte Expression von EphA ein erhöhtes *forward signaling* durch ephrin-A erfahren. Angesichts dieser Optionen, prognostizierte das Modell eine differentielle Repulsion beider retinalen Populationen, welche gemäß ihres molekularen Ursprungs topographisch korrekt, wenn auch nur binär ist. Diese *in silico* Prognose konnte Gebhardt anschließend *in vitro* mit Explantaten der temporalen und nasalen Retina in Doppelstreifen-Assays aus EphA3- und ephrin-A2-mFc Fusionsproteinen bestätigen (Gebhardt et al., 2012; Gebhardt, 2009). Damit wurde erstmals binär topographisch korrektes Verhalten retinaler Wachstumskegel in einem Assay aus isolierten Lenkungsmolekülen gezeigt. Dies unterstützte damit das aufgestellte Modell von Gebhardt & Weth, welches von einer Balance aus *forward* und *reverse signaling* als Schlüsselement für die Ausbildung einer topographischen Karte ausgeht.

Es stellte sich im Folgenden heraus, dass die Wachstumskegel an das Lenkungssignal adaptieren können (Rosentreter et al., 1998). Dieser Mechanismus scheint im Widerspruch zu

der Ausbildung einer topographischen Karte zu stehen, die auf einem festen quantitativen Verhältnis von *forward* und *reverse signaling* beruht. Fiederling konnte jedoch zeigen, dass Wachstumskegel selbst bei Kontakt mit nur einem der beiden Lenkungsmoleküle ihre ephrin-A Sensoren stets gleichzeitig mit ihren EphA-Sensoren adaptieren (Fiederling, 2016). Diese sogenannte Co-Adaptation gewährleistet, dass das Verhältnis von *forward* und *reverse signaling* unter Adaptation erhalten wird. Ein Paradoxon, welches sich hinsichtlich des beschriebenen Modells ergibt, besteht darin, dass das Modell bei Adaptation erhöhtes *cis signaling* in einem Wachstumskegel vorhersagt, bei Zugabe von exogenem ephrin-A5-Fc oder EphA3-Fc zu einer retinalen Explantatkultur, endogenes ephrin-A5 aber an der Oberfläche des Wachstumskegels stark reduziert wird (Weschenfelder, 2014). Es gibt Hinweise darauf, dass die beobachtete Reduzierung der Lenkungssensoren auf der Oberfläche während der Adaptation, auf einer Internalisierung der Sensoren in frühe Endosome (Weschenfelder, 2014) und auf Clathrin-vermittelter Endozytose beruht (Fiederling, 2016). Wir gehen davon aus, dass die Internalisierung von EphA und ephrin-A in signalisierende Endosomen während der Co-Adaptation, den vom Modell geforderten Anstieg des *cis signalings* und die gleichzeitige Reduktion der Oberflächenpopulationen vereinbart. Diese starke Hypothese bedarf der experimentellen Überprüfung durch Verfolgung der detaillierten Dynamik der Sensoren während der Adaptation. Strategien hierfür bereitzustellen ist eines der Ziele dieser Arbeit. Fiederling konnte in Simulationen mit dem Modell mit Adaptation zeigen, dass der Mechanismus der Co-Adaptation essentiell für Axone und deren initiales Übertreten der hohen EphA-Konzentration am anterioren Tektum für Axone ist (Fiederling et al., 2017).

1.6. Fluoreszente Visualisierung der axonalen Lenkungsmaschinerie

Die Untersuchung der hochkomplexen Lenkungsmaschinerie basierte bisher vor allem auf Ergebnissen aus fluoreszenten Antikörperfärbungen. Um die subzellulären Lokalisationen der Lenkungsmoleküle sowie ihrer hohen Dynamiken während der (Co-)Adaptation von Wachstumskegeln in nicht-fixierten Zellen zu beobachten, bietet sich die Fusion betreffender Proteine mit selbst-markierenden Tags, wie z.B. SNAP- oder Halo-Tags an.

SNAP-Tags sind 19.4kDa große, modifizierte O-6-Alkylguanin DNA Alkyltransferasen die in der Lage sind unter Abspaltung eines Guanins oder Pyrimidins, fluoreszent markierte Benzylguanin- oder Benzylchloropyrimidin-Liganden kovalent zu binden. Diese Bindung ist nicht toxisch und ermöglicht es, den SNAP-Tag und damit das gekoppelte rekombinante Fusionsprotein während einer Lebenszelloberfläche fluoreszent zu markieren (Gautier et al., 2008; Keppler et al., 2004). Ein wesentlicher Vorteil des SNAP-Tags ist die differentielle Zellpermeabilität seiner fluoreszenten Liganden. So sind beispielsweise Benzylchloropyrimidin-Liganden zellpermeabel, während Benzylguanin-Liganden nichtzellpermeabel sind. Dadurch lassen sich extra- und intrazelluläre Subpopulationen von

Proteinen *in vitro* durch eine Kombination verschiedener Ligandeneigenschaften und Fluorophore unterscheiden.

Auf einem sehr ähnlichen Prinzip basiert der sogenannte HaloTag (Promega, USA). Dieses 33kDa große Enzym ist eine modifizierte bakterielle Hydrolase (Halogenalkan-Dehalogenase), die ihren fluoreszenten Liganden über seinen Chloralkan-Linker irreversibel binden kann. Dadurch werden der Halo-Tag sowie das gekoppelte Fusionsprotein fluoreszent markiert (Benink & Urh, 2015). Wie beim SNAP-Tag stehen sowohl zellpermeable, als auch nicht-zellpermeable Liganden mit verschiedenen Fluorophoren zur Verfügung, die eine gezielte Detektion und Unterscheidung sowohl von extrazellulären als auch intrazellulären Subpopulationen der markierten Fusionsproteine ermöglichen.

Die molekularbiologische Rekombination der Lenkungsmoleküle EphA3 und ephrin-A5 mit jeweils einem der beiden Tag-Systeme sowie einer geschickten Auswahl an zellpermeablen und nicht-zellpermeablen Liganden mit unterschiedlichen Fluorophoren, stellt damit ein hilfreiches Werkzeug dar um die die Lenkungs- und Adaptationsmechanismen in Wachstumskegeln während der axonalen Navigation an ihr Zielgebiet *in vitro* zu beobachten und so beispielsweise die oben genannte Hypothese über den Mechanismus der Adaptation zu überprüfen.

1.7. Limitierungen von *in vitro* Entscheidungsassays

Es ist selbsterklärend, dass Streifenassays nicht die topographisch kontinuierliche Projektion retinaler Axone in das optische Tektum *in vivo* abbilden, sondern sich auf eine binär topographische Lenkungsentscheidung zwischen zwei Lenkungsmolekülen beschränken. Um eine kontinuierlich topographisch richtige Verteilung retinaler Axone in einem *in vitro* Assay zu beobachten, bedarf es Gradientenassays.

Solche Assays wurden erstmals aus Membransuspensionen des posterioren optischen Tektums des Hühnerembryos erstellt (Baier & Bonhoeffer, 1992). Entlang dieser nicht-linearen Gradienten stoppten temporale und nasale Axone ihre Projektion in Abhängigkeit der Steigung des jeweiligen Gradienten, wobei temporale gemäß ihrer molekularen Identität früher stehen blieben als nasale Axone. Rosentreter gelang es schließlich mit linearen Gradienten aus posterioren Membranen des optischen Tektums kontrollierte Versuchsbedingungen zu schaffen und axonales Entscheidungsverhalten in solchen Gradienten-Assays näher zu untersuchen (Rosentreter et al., 1998). Hierbei stellte sich allerdings heraus, dass Axone nicht in Abhängigkeit der Steigung des Gradienten, sondern der lokalen Konzentration des Gradienten stoppen und dass dieser Stopppunkt auch abhängig ist von einer vorherigen Adaptation der Axone an ein Konzentrations-„Podest“ posteriorer Membranen. Je höher ein solches Podest und damit die Adaptation retinaler Axone war, desto weiter konnten sie in den Gradienten hineinwachsen. In einem aufgedruckten Gradienten-Assay mit breiter werdenden, parallel angeordneten Linien aus isoliertem ephrin-

A5-Fc konnte v. Philipsborn beobachten, dass die Stopreaktion temporaler Axone nicht abhängig von der lokalen, sondern der relativen, also der bis dahin wahrgenommenen Proteinmenge ist (von Philipsborn et al., 2006). All diese Gradienten-Assays lieferten zwar wertvolle Erkenntnisse über das axonale Lenkungsverhalten innerhalb solcher Gradienten, schienen jedoch widersprüchliche Ergebnisse zu liefern. Zudem betrachteten alle bisherigen Gradienten-Assays lediglich einen Gradienten (in Form ausschließlich posteriorer Membranen des Tektums, welche vermehrt ephrin-As enthalten, oder isoliertes ephrin-A5-Fc), sowie spezifische Stopreaktionen temporaler Axone, während nasale Axone nicht reagierten.

Laut unseres Modells, in welchem EphA-Rezeptoren gradiert verteilt sind und ephrin-A-Liganden einen entsprechend gegenläufigen Gradienten bilden, bedarf es jedoch Substraten mit beiden Gegengradienten um kontinuierlich topographisch korrektes Verhalten der Axone *in vitro* zu rekonstituieren.

Bei der Rekonstitution eines solchen kontinuierlichen Gegengradienten *in vitro*, stößt man allerdings auf unterschiedliche Herausforderungen: Als *in vitro* Entscheidungsassays haben sich Streifenassays bisher als bewährte Methode etabliert (Baier & Bonhoeffer, 1992; Knoll et al., 2007; Vielmetter et al., 1990; Weschenfelder et al., 2013). Streifenassays basieren auf der Immobilisierung von isolierten Proteinen mithilfe von Silikon-Matrizen mit parallel angeordneten Mikrokanälen definierter Breite (siehe auch Abschnitt 3.6.). Für die Rekonstitution eines EphA/ephrin-A Gegengradienten *in vitro* ist es allerdings unerlässlich beide Lenkungsmoleküle in unmittelbarer physischer Nähe auf einer Oberfläche aufzubringen, damit diese simultan von einem Wachstumskegel wahrgenommen werden können. Dieser Umstand wird jedoch erheblich durch die hohe Bindungsaffinität beider Lenkungsmoleküle zueinander erschwert. Binden beide Proteine aneinander, maskieren sie sich und stehen somit nicht mehr als effektives Lenkungssignal für Wachstumskegel zur Verfügung (Noberini, Lamberto, et al., 2012). Die zweifache Strukturierung einer Oberfläche ist somit nicht ohne weiteres möglich und verlangt nach einer differenzierteren Herangehensweise, die hier entwickelt werden sollte.

Die zweite und keineswegs triviale Herausforderung für die Rekonstitution eines *in vitro* EphA/ephrin-A Gegengradienten besteht in der Immobilisierung funktionaler Lenkungsmoleküle an einer Oberfläche. Dabei ist eine gerichtete Immobilisierung ohne Denaturierung an einer Oberfläche nötig, um die biologische Aktivität der Proteine zu erhalten. Die Bindung von Proteinen an eine Oberfläche geht dabei jedoch sehr oft mit einer spontanen Konformationsänderungen einher, welche im hohen Maße von der Ladung des individuellen Proteins, vielfältigen thermodynamischen Einflüssen sowie der Ladung der Oberfläche abhängt und aus diesem Grund kaum zu kontrollieren ist (Latour, 2020). Eine mögliche Stellschraube für eine möglichst kontrollierte und gerichtete Bindung von Proteinen stellt

hierbei die chemische Aktivierung von Oberflächen durch Beschichtung mit Polymeren oder Silanisierung dar.

1.8. Zielsetzung

In dieser Arbeit möchte ich Methoden erarbeiten, um die topographische axonale Lenkung in einem *in vitro* Assay aus zwei gegenläufigen Gradienten aus EphA-Rezeptor und ephrin-A Ligand zu etablieren und somit nicht -wie in bisherigen Streifen-Assays- ausschließlich topographisch binär korrektes, sondern topographisch kontinuierlich korrektes Lenkungsverhalten *in vitro* zu rekonstituieren. Erkenntnisse, die aus einem solchen Gegengradienten-Assay gewonnen werden, können maßgeblich zur Validierung unserer Hypothese und des Modells der retinotektalen Projektion beitragen. Eine zentrale Herausforderung, die es für die Etablierung eines Gegengradienten-Assay zu überwinden gilt, ist die Strukturierung einer Oberfläche mit EphA und ephrin-A in unmittelbarer physischer Nähe zueinander. Hierbei würde die hohe Bindungsaffinität von Rezeptor und Ligand zu einer Bindung und damit gegenseitiger Maskierung führen. Wachstumskegel retinaler Axone könnten die Proteine somit nicht mehr als Lenkungsmolekül wahrnehmen. Ein Ansatz diesen Umstand möglicherweise zu umgehen, findet sich in der Literatur über die Auftrennung von Rezeptor-Liganden Komplexen in einem sauren pH-Milieu (Boissier et al., 2013). Durch die Oberflächenstrukturierung mit EphA bzw. ephrin-A in angesäuerter Lösung könnte die Bindung und Maskierung der Proteine verhindert und ein Gegengradienten-Substrat aus beiden Lenkungsmolekülen hergestellt werden. Um die subzellulären Dynamiken während der axonalen Lenkung in einem Wachstumskegel detaillierter zu untersuchen, möchte ich in dieser Arbeit außerdem Werkzeuge für die bildgebende Darstellung der molekularen Mechanismen in lebenden RGCs weiterentwickeln. Eines der spannendsten Phänomene während der axonalen Lenkung ist die Adaptation von Wachstumskegeln an ein Lenkungsmolekül, sowie die gleichzeitige Co-Adaptation an das zweite respektive Lenkungsmolekül (Fiederling et al., 2017). Während unser Modell dabei eine Erhöhung des *cis signaling* prognostiziert, gibt es experimentelle Evidenz für eine Reduktion der Sensoren auf der Oberfläche der Wachstumskegel, was einer Erhöhung des *cis signaling* zu widersprechen scheint. Da sich hierbei jedoch ebenso eine Co-Lokalisation mit Endosomen zeigt, gehen wir davon aus, dass internalisierte Rezeptor-Liganden Komplexe in sogenannten *signaling endosomes* für ein erhöhtes *cis signaling* sorgen könnten. Diese Möglichkeit könnte die Widersprüche auflösen. Durch den Einsatz hochauflösender Mikroskopie und raffinierten Methoden wie der *Expansion Microscopy* (ExM) sollen zukünftig die zugrunde liegenden Mechanismen der axonalen Adaptation, sowie der Co-Adaptation untersucht werden. Mithilfe von SNAP-Tag ephrin-A5 und der in dieser Arbeit weiter etablierten HaloTag-EphA3 Transfektion lebender RGCs können die Dynamiken kleinerer Vesikel wie Rab4/5 Endosomen untersucht und damit präzisere Einblicke in die Mechanismen während der retinotektalen Projektion ermöglicht werden.

2 Material

2.1. Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Hühnerembryonen (*Gallus gallus domesticus*) stammen aus befruchteten Eiern der Geflügelzucht Hockenberger (Eppingen, Deutschland) und wurden bis zur Bebrütung bis zu 10 Tage bei 17°C gelagert. Die Bebrütung bis Embryonaltag E6-E7 (Hamburger & Hamilton Stadium 29-30) erfolgte in einem vollautomatischen Brutautomat bei 37°C und ca. 60% Luftfeuchtigkeit.

2.2. Proteine und Enzyme

Alle Proteine und (Restriktions-) Enzyme wurden in den jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffern gelöst und gemäß den Herstellerangaben eingesetzt.

Name	Konzentration der Stammlösung	Bezugsquelle
Accutase	400- 600 U/ml	Sigma Aldrich, #A6964
Blpl	10 U/µl	New England Biolabs, #R0585S
Bovine Serum Albumin (BSA)	Pulver	Sigma Aldrich, #A3059
EphA3-Fc chimera, human Humanes Fc-Fragment	100 µg/ml	R&D Systems, #640-A3
Ephrin-A2-Fc chimera, murin Humanes Fc-Fragment	250 µg/ml	R&D Systems, #603-A2
Ephrin-A2-Fc chimera, murin Maus Fc-Fragment (mFc)	250 µg/ml	R&D Systems, #8415-A2-200
Ephrin-A2-Fc, murin, biotinyliert Humanes Fc-Fragment	100 µg/ml	R&D Systems, #BT603
Fc-Fragment, Humanes IgG	3.9 mg/ml	Merck, #401104
Fibronektin, human plasma	2 mg/ml	Sigma Aldrich, #2006-1MG
Laminin (Laminin-111), murin	1 mg/ml	Cultrex, #3401-010-02

Merosin (Laminin-211), human	250 µg/ml	Millipore, #CC085
Poly-L-Lysin (PLL)	4 mg/ml	Sigma Aldrich, #P1399-25MG
Proteinase K	300 U/ml	Roche, #03115879001
Pvul	10 U/ml	New England Biolabs, #R3150S
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	10 U/ml	New England Biolabs, #M0371S
Spel	10 U/ml	Thermo Fisher, #ER1251
T4-DNA-Ligase	5 U/µl	Thermo Fisher Scientific, #EL0014

2.3. Antikörper, Fluoreszenzfarbstoffe & Nukleotide

Name	Verdünnung	Bezugsquelle
DAPI (1mg/ml)	1:1000	Carl Roth, #6335.1
DNA-Leitermix		peqgold, VWR, #252040
Donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor 647	äquimolar	Invitrogen, #A31571
Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 568	1:200	Invitrogen, #A10042
Goat anti-human IgG Alexa Fluor 546	1:400	Thermo Fisher Scientific, #A-21089
Goat anti-mouse IgG Cy3	1:400	Dianova, #111-165-166
Goat anti-rabbit Cy3	1:400	Dianova, 111-165-144
Halo-Ligand Janelia Fluor 549	50-500 nM	Labor Dr. Luke Lavis, Janelia Research Campus

Phalloidin Alexa Fluor 488	1:50	Thermo Fisher Scientific, #A12379
Rabbit anti- EphA3	1:200	Santa Cruz Biology, #SC-920
Rabbit anti-Laminin	1:100	Sigma-Aldrich, #L9393
Rotisafe Gel-Stain	5% in Agarose	Roth GmbH, #3865.1
SNAP-Ligand Janelia Fluor 646	200 nM	Labor Dr. Luke Lavis, Janelia Research Campus

2.4. Medien, Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien von der Firma Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen und in vollentsalztem und autoklaviertem Wasser gelöst.

Name	Zusammensetzung/Bezugsquelle	Konzentration
BLitz Kinetik Puffer	PBS	1x
	Bovine Serum Albumin	0.1%
	Tween20	0.02%
	Natriumazid	0.05%
Agarose NEEO Ultra-Qualität		1% in TAE
Citronensäure-Phosphatpuffer	Citronensäure-Monohydrat	0.1 M
	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0.2 M
	(Einstellen auf pH4 nach McIlvaine (1921))	
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	DMEM, PAN Tech, # P04-03593X20	1x
	Fetal Calf Serum (FCS), GE Healthcare Life Sciences, #11571831	10% (v/v)

F12-Medium	F12 Nährstofflösung, Sigma Aldrich, #N6760	1x
	Fetal Bovine Serum (FBS), Merck, #S0615	10% (v/v)
	Chicken Serum (CS), Thermo Fisher Scientific, #16110	2% (v/v)
	NaHCO ₃	1.176 g/l
	L-Glutamin, gibco, #11539876	146 mg/l
	Penicillin/Streptomycin	10 U/ml
F12-MZ-Medium	F12-Medium	1x
	Methylcellulose	0.4 % (v/v)
F12-MZ-Medium „Plus“	F12-MZ-Medium	1x
	B27 Supplement, gibco, #17504-044	2%
	Forskolin, Sigma Aldrich, #F6886	5 µM
	L-Glutamin, gibco, #11539876	1 mM
Fixierlösung	Saccharose	113 g/l
	Paraformaldehyd	4 % (w/v)
	Glutaraldehyd	0.1 % (w/v)
	in PBS, pH 7.4	
Hank's balanced salt solution (HBSS)	NaCl	8 g/l
	KCl	0.4 g/l
	Na ₂ HPO ₄	60 mg/l
	Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	60 mg/l
	NaHCO ₃	0.35 g/l
	Glukose	1 g/l
	HEPES	4.8 g/l
	Phenolrot	10 mg/l
	in PSB, pH 7.4	
LB-Medium	Trypton/Pepton aus Casein	10 g/l
	Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/ml
	Ampicillin	100 µg/ml
	oder Kanamycin	50 µg/ml

Mowiol	Mowiol 4-88, Merck, #475904	16.67 % (w/v)
	Glycerol	33.33 % (v/v)
	Thimerosal	0.1 % (v/v)
	n-Propylgallat	Spatelspitze
	in PBS, pH 8.5	
Natriumacetat Puffer (NaAc)	Natriumacetat	12.83 g/l
	Essigsäure	15% (v/v)
	(Einstellen auf pH4 mit Essigsäure)	
Phosphate Buffered Saline (PBS)	NaCl	8 g/l
	KCl	0.2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	1.15 g/l
	KH ₂ PO ₄	0.2 g/l
	pH 7.4	
SOC-Medium	Trypton	20 g/l
	Yeast Extract	5 g/ml
	NaCl	0.5 g/l
	250 mM KCl Lösung	1% (v/v)
1x TAE	Tris	400 mM
	Essigsäure	200 mM
	EDTA	10 mM
Triton-X100	Sigma, #T8787	
Trypsin/EDTA	gibco, #15400-054	0.5% Trypsin
		10x EDTA
Verdau-Puffer für Expansionsmikroskopie	EDTA	1 mM
	Guanidin HCl	0.8 mM
	Tris	50 mM
	Triton X-100	0.8 mM

2.5. Andere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardchemikalien von der Firma Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen

Name	Hersteller	Details
Aceton		pur
Acrylamid	Bio-Rad, #161-0140	40% Stocklösung
AcX (6-((Acryloyl)amin)hexansäure)	Invitrogen, #A20770	10mg/ml in DMSO
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, #A3678	
Bis-Acrylamid	Bio-Rad, #161-0140	2% Stocklösung
Dip and Read Biosensors	ForteBio, USA, #18-5019	Streptavidin
Deckgläser (D263M Glas)	VWR	rund, Ø 18mm
Dimethylformamid (DMF), trocken	Sigma-Aldrich, #22.705-6	pur
N,N'-Disuccinimidylcarbonat	Sigma-Aldrich, #225827	pur
EDTA		pur
Epoxy silan ((3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane)	Sigma Aldrich, #440167	pur
Guanidin Hydrochlorid		
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, #28704	
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, #28104	

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, #27115	
Lipofectamin2000	Thermo Fisher Scientific, #11668027	
Natriumacrylat	Sigma-Aldrich, #408220	
OptiMEM	gibco, #31985062	
Polydimethylsiloxan (PDMS) Sylgard 184	DowCorning	9:1 Härter
Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck, #110732	
Toluol		pur
Whatman Filtermembran	GE HealthCare, #7153-104	Porengröße 0.45 µm
ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	Zymo Research, #D4304	

2.6. Geräte und Software

Name	Hersteller
Amersham Imager	GE Healthcare
Brutgerät (Compact S84)	Grumbach
BLItz System BLItz Pro Software	Satorius
CUY21 SC Square Wave Electroporator	NepaGene
CUY700P20 Plattenelektroden	NepaGene

E. coli Pulser Fuse Typ I	Bio-Rad
Fiji (Fiji is just ImageJ)	Wayne Rasband, https://fiji.sc/#download
Fiji Plugin JACoP	https://imagej.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html
Vacutherm, Vakuumofen	Hereaus
McIlvain Tissue Chopper	Mickle Laboratory Engineering
Origin19b	OriginLab Corporation
Zeiss Axioimager Z1 mit Apotome-Modus	Carl Zeiss
ZenLite 2	Carl Zeiss

2.7. Plasmide

Das Plasmid **pSNAP-ephrin-A5** stammt aus der Dissertation von Markus Weschenfelder (2014) und enthält ein Ampicillin-Resistenz Gen.

Das Plasmid **pCIG2 HaloTag-EphA3** wurde in vorangegangen Masterarbeiten konstruiert (Kornstädt, 2017; Ruisi, 2019) und enthält ebenso ein Ampicillin-Resistenz Gen.

Das Plasmid **pMK-RQ** wurde mit der gewünschten Sequenz (siehe Abschnitt 3.1.) unter der Construct ID: 19ACV5ZP von GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher, Waltham, USA) synthetisiert und enthält ein Kanamycin-Resistenz Gen.

3 Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden und Klonierung

Die in dieser Arbeit von mir angewandten molekularbiologischen Methoden wurden standardmäßig nach GreenSambrook (2012) durchgeführt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit jeweils geeigneten Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland). Zur Analyse und Auswertung wurde ein NanoDrop-Spektralphotometer (VWR, Radnor, PA, USA), Agarose-Gelelektrophorese (5-6V/cm), ein Gel-Imager (Amersham Imager 600, GE Health Care, Chicago, IL, USA) verwendet. Von allen Ligationsprodukten wurden Glycerindauerkulturen entsprechender Klone angelegt.

Herstellung des abgeschwächten CMV-Enhancers

Die DNA-Sequenz des CMV-Enhancers des pCIG2 HaloTag-EphA3 (Kornstädt, 2017) wurde von mir *in silico* so modifiziert, dass sie dem in Vullhorst et al. (2017) beschriebenen CMV-Enhancers mit abgeschwächter Expressionsstärke entsprach und eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle des *unique cutters SpeI* enthielt (Abbildung 3). Zusätzlich dazu fügte ich die bereits im pCIG2 vorhandene Sequenz des β -Aktin Promoters sowie die Basensequenz bis zu der Restriktionsschnittstelle des *unique cutters BplI* ein. Diese Sequenz wurde von *GeneArt Gene Synthesis* (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) synthetisiert und in einen pMK-RQ-Vektor mit Kanamycin-Resistenz eingebracht. Dieser Vektor wurde in elektrokompetente E. Coli XL-1 Blue (Agilent, Santa Clara, USA) transformiert (E. coli Pulser; Bio-Rad, Hercules, CA, USA; 2,5 kV für 5 ms), positive Klone über Kanamycin selektiert und in LB-Medium amplifiziertes Plasmid isoliert (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen).

Vorbereitung und Assemblierung des verkürzten CMV-Enhancer/Promoter und pCIG2 HaloTag-EphA3

Sowohl der pMK-RQ-Vektor mit modifizierter CMV-Enhancer Sequenz, als auch das pCIG2 HaloTag-EphA3 Plasmid wurden zunächst in einem 10-fachen Überverdau mit dem Restriktionsenzym *BplI* linearisiert und aufgereinigt. In einem zweiten Schritt wurde die nun linearisierte DNA mit dem Restriktionsenzym *SpeI* in einem einfachen Überverdau über Nacht bei 37°C geschnitten, um die jeweilige CMV- Sequenz von ihrem Backbone abzutrennen. Der Ansatz des pCIG2 HaloTag-EphA3 Plasmids wurde mit 1 Unit Shrimp Alkaline Phosphatase dephosphoryliert und beide Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechenden Banden (modifizierter CMV-Enhancer als Insert mit 886bp und pCIG2 HaloTag-EphA3 als Vektor mit 8952bp) wurden aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen).

Die Ligation beider Fragmente erfolgte in einem fünffachen Überschuss von Vektor (pCIG2 HaloTag-EphA3) zu Insert (verkürzter CMV-Enhancer) mit einer T4-DNA Ligase (NEB). Das

Ligationsprodukt wurde in elektrokompetente E. Coli XL-1 Blue eingebracht und Klone über eine Ampicillin-Resistenz selektiert. Positive Klone wurden über einen Restriktionsfingerprint mit *Pvu*I und *Bpl*I identifiziert und die korrekte Ligation der Fragmente durch Sequenzierung (LGC genomics GmbH, Berlin) bestätigt.

Das Plasmid pCIG2 HaloTag-EphA3 mit verkürztem CMV-Enhancer/Promoter wird in dieser Arbeit als *attenuated* (deutsch: abgeschwächt/gedämpft) pCIG2 HaloTag-EphA3 bezeichnet.

Spel

5' **GACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCCGCGTT**
ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC GACCCCCGCCATTGACGTCA
 ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA
 TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTG
 ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCC
 TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG**TCGAGGTGAGCCCCACGTTCT**
GCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTGTATTATTATTATTAAATTATT
TTGTGCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGCGGGCG
GGCGAGGGGCGGGCGGGCGAGGCGGGAGAGGTGCGCGCCAGCCAATCAGAGCGCGC
GCTCCGAAAGTTCCCTTTATGGCGAGGCAGGCGGGCGGCGGGCCCTATAAAAGCGAAGCG
CGCGGGGGCGGGAGTCGCTGCCTGCCTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCCTCGC
GCCGCCCGCCCCGGCTTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCC
CTTCTCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTCTTTCTGTGGCTGCG
TGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTG
CGTGCCTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCCTGGCCCGCTGCCCGGGCGCTGTGA
GCGCTGCGGGCGCGGGCGGGCTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCAGGGGAGCGCGGC
CGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGCTGCGAGGGGAAACAAAGGCTGCGTGC
TGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGCGCGGGCTGTAACCCCCCCC
TGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCA** 3'**

Bpl

Abbildung 3: Strategie für die Verkürzung des CMV-Enhancer/Promoter nach Vullhorst (2017)

Die grün markierte Region zeigt den verbleibenden Sequenzbereich einschließlich der rot markierten Spel Schnittstelle. Die grau hinterlegte Sequenz wurde entfernt, während die gelb hinterlegte Sequenz den chicken β -Actin Promotor andeutet (Vergleich auch Abbildung 17). Die rot markierte *Bpl*I Schnittstelle bleibt ebenso erhalten.

3.2. Zellkultur und Lipofektion von NIH 3T3 Zellen

Um die Expression des im vorangegangenen Abschnitt klonierten *attenuated* HaloTag-EphA3 Plasmids zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA transient in NIH 3T3 Zellen eingebracht. Diese aus embryonalen Mausfibroblasten stammende, immortalisierte Zelllinie wurde unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit in DMEM mit 10% FCS kultiviert und dreimal wöchentlich passagiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 80% konfluent.

Lipofektion

Die Lipofektion ist eine Transfektionsmethode, die auf der Komplexbildung von RNA oder DNA mit kationischen Lipiden beruht. Diese Lipidkomplexe fusionieren mit der Zellmembran und transportieren auf diese Weise ihren Inhalt in das Zytosol der Zelle. Während der nächsten Zellteilung gelangt die Plasmid-DNA in den Zellkern und kann nun von der Zelle transkribiert werden.

Die Lipofektion der in 6-Well-Platten kultivierten NIH 3T3 Zellen erfolgte mit Lipofectamin2000 nach Herstellerangaben. Hierfür wurde pro Well 250µl OptiMEM mit 2.5µg des Plasmids und 250µl OptiMEM mit 5µl Lipofektamin2000 für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Plasmid-DNA in Lipidkomplexe zu verpacken, wurden die beiden Ansätze vorsichtig miteinander vermischt und weitere 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Transfektion wurde das Lipidgemisch in das Zellmedium gegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Zellmedium ausgetauscht und die Zellen einen weiteren Tag kultiviert. Am dritten Tag *in vitro* wurden die Zellen für die weitere Verwendung trypsinisiert und ca. 80.000- 100.000 Zellen auf Fibronectin beschichteten Deckgläsern in frischem DMEM mit 10% FCS für zwei Stunden inkubiert. Sobald die transfizierten Zellen adhärent waren, wurden sie für weitere Experimente verwendet.

3.3. Präparation, Explantatkultur und Elektroporation der embryonalen Hühnerretina

Präparation und Explantatkultur

Die Präparation der embryonalen Hühnerretina erfolgte nach Walter (1987). Dafür wurde der Hühnerembryo am Embryonaltag 6.5- 7 (Stadium 29-30 nach HamburgerHamilton (1992)) aus dem Ei entnommen und sofort dekapitiert. Der Kopf des Embryos wurde in eiskaltes HBSS überführt und ein Auge mithilfe von Dumont No.5 Pinzetten entnommen. Das Auge wurde in frisches, eiskaltes HBSS überführt und von Bindegewebe, Sklera und der Pigmentschicht befreit und Linse sowie Glaskörper entfernt. Die nun frei vorliegende Retina wurde, mit der retinalen Ganglienzellschicht nach oben, auf ein Stück Nitrocellulose-Membran flach ausgelegt und vorsichtig mit einer Laborpumpe mit Fritte angesaugt. Die so befestigte Retina wurde anschließend orthogonal zu ihrer naso-temporalen Achse mit einem Tissue Chopper in 300µm breite Streifen gehackt. Für die anschließende Kultivierung wurden nasale bzw. temporale Explantatstreifen entnommen, mit der retinalen Ganglienzellschicht nach unten auf ein entsprechendes Substrat aufgelegt und mit Metallklötzchen beschwert. In Streifen-Assays wurden die Explantat-Streifen orthogonal zum Proteinstreifen-Muster gelegt (siehe Abschnitt 3.6.).

Die beschwerten Explantatstreifen wurden sofort mit 37°C warmen F12-MZ Medium überschichtet und routinemäßig bei 37°C und 4% CO₂ im Brutschrank für 24-48 Stunden inkubiert.

Ex ovo Elektroporation

Um Plasmid-DNA in retinale Ganglienzellen (RGC) einzubringen, wurde eine *ex ovo* Elektroporation der Hühnerretina, wie in der Arbeit von Weschenfelder (2014) beschrieben, durchgeführt. Hierfür wurde die Retina wie beschrieben herauspräpariert und nach dem Hacken in 300µm breite Explantat-Streifen in eine flache Petrischale gelegt, leicht trocken

gesaugt und für fünf Minuten mit kalter Accutase überschichtet. Dies daut die Basallamina leicht an und erhöht dadurch die Zugänglichkeit des Gewebes und der RGC während der Elektroporation für DNA. Der Verdau wurde durch Waschen mit kaltem HBSS abgestoppt. Die Retina wurde anschließend auf eine Positiv-Plattenelektrode (CUY27P20) gelegt, mit 75 μ l der zu transfizierenden DNA-Lösung überschichtet und eine Negativ-Plattenelektrode etwa 3-4mm darüber positioniert, bis sich die DNA-Lösung gerade schon zu einer Flüssigkeitssäule zwischen den Elektroden aufspannt.

Die Konzentrationen der verwendeten Plasmid-DNA wurden dabei wie folgt gewählt:

- Einzeltransfektion: 300ng/ μ l *attenuated pCIG2 HaloTag-EphA3* (in 1x PBS).
- Co-Transfektion: 300ng/ μ l *attenuated pCIG2 HaloTag-EphA3 und*
600ng/ μ l *pSNAP-ephrinA5 Plasmid* (gemeinsam in 1x PBS).

Es wurden fünf 50ms Pulse im Abstand von 950ms mit 18V Spannung appliziert (Square Pulser CUY21). Die elektroporierte Retina wurde sofort im Anschluss in kaltes HBSS überführt. Die durch die elektrischen Pulse entstandene Hitze lässt das retinale Gewebe weißlich eintrüben. Diese Trübung klingt nach wenigen Minuten in kaltem HBSS wieder ab. Nasale bzw. temporale Retinastreifen konnten nun entnommen und auf homogenen Laminin-/Merosin-Substraten (siehe Abschnitt 3.5.) aufgelegt und in F12-Medium kultiviert werden. Die Kultivierung elektroporierter Retinaexplantate erfolgte für 24 Stunden in F12-Medium und für weitere 24-48 Stunden in F12-MZ „Plus“-Medium bei 37°C und 4% CO₂ im Brutschrank.

3.4. Messung der Bindungskinetik mit Biolayer-Interferometrie (BLI)

Um die Bindungsaffinitäten bzw. Bindungskonstanten von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc in verschiedenen pH-Werten zu untersuchen, verwendete ich einen BLItz Biolayer Interferometer (ForteBio/Sartorius, Göttingen, Deutschland).

Dieses System basiert auf Lichtinterferenzveränderung, die durch Änderung der Schichtdicke des entstehenden Biolayers hervorgerufen wird, sobald zwei Proteine an einem Biosensor miteinander interagieren (Sultana & Lee, 2015). Biosensoren sind lichtdurchlässige und funktionalisierte Glasstäbchen an welche das gewünschte Protein (*Bait*) gekoppelt werden kann, indem man diese in eine Lösung mit dem *Bait* taucht. Das in dieser Arbeit verwendete biotinylierte ephrin-A2-Fc wurde an Streptavidin-beschichtete Biosensoren gekoppelt. Der während der Kopplung (*Loading, L*) des *Baits* entstehende Biolayer am Sensor, führt dabei zu einer Veränderung der Lichtinterferenz und dient nach Sättigung als Referenzwert der initialen Schichtdicke. Die Interaktion eines zweiten Bindungspartners (*Prey*) während des Assoziationsschritts (A) mit dem gekoppelten *Bait* führt, in Abhängigkeit der individuellen Bindekinetik beider Proteine, zu einer möglichen Änderung der initialen Schichtdicke am Biosensor. Die damit einhergehende Veränderung der Lichtinterferenz kann graphisch abgebildet und die Assoziationsrate von *Prey* und *Bait* ermittelt werden. In einem

anschließenden Dissoziationsschritt (D) wird der Biosensor in den Bindepuffer ohne *Prey* getaucht und dabei eine mögliche Reduktion der Biolayerdicke und damit die Dissoziationsrate des *Preys* vom *Bait* ermittelt. Aus der Assoziations- und Dissoziationsrate wird die Dissoziationskonstante (K_d) der Proteine zueinander errechnet.

Für die Messungen der Bindekinetik von ephrin-A2-Fc und EphA3-Fc in neutralem sowie saurem Puffer, verwendete ich Streptavidin-beschichtete Biosensoren an die 10 μ g/ml biotinyliertes ephrin-A2-Fc gekoppelt wurde (*Loading*, L). Nach einer Referenzmessung der initialen Schichtdicke von ephrin-A2-Fc (*Baseline*, BL), wurde die Assoziations- (A1) und Dissoziationsrate (D1) von 30 μ g/ml EphA3-Fc an das gekoppelte ephrin-A2 ermittelt. Für die Messung der Bindungskinetik nach Rückführung von ephrin-A2-Fc aus saurer zurück in neutrale Lösung, wurde zunächst eine erneute Referenzmessung durchgeführt, um mögliche Artefakte der Interferenzveränderung durch den Austausch des Puffers auszuschließen (*Baseline 2*, B2). Es folgte eine erneute Assoziation von 30 μ g/ml EphA3-Fc (A2) und ein abschließender Dissoziationsschritt (D2) in neutralem Puffer.

Alle Messungen wurden in BLItz *Kinetics Buffer* (pH7) durchgeführt. Messungen in saurer Lösung wurden in einem Natrium-Acetat Puffer (NaAc) mit pH4 durchgeführt.

Die Messparameter für die Messungen in pH7 (BLItz *Kinetics Buffer*) wurden wie folgt gewählt:

Messschritt	Dauer
1. <i>Loading</i> (L)	120 Sekunden
2. <i>Baseline</i> (BL)	30 Sekunden
3. Assoziation (A1)	120 Sekunden
4. Dissoziation (D1)	120 Sekunden

Die Messparameter für die Messung in pH4 (NaAc) waren:

Messschritt	Dauer
1. <i>Loading</i> (L)	120 Sekunden
2. <i>Baseline</i> in pH4 (BL)	30 Sekunden
3. Assoziation in pH4 (A1)	120 Sekunden
4. Dissoziation in pH4 (D1)	120 Sekunden
5. <i>Baseline</i> in pH7 (BL2)	30 Sekunden
6. Assoziation in pH7 (A2):	120 Sekunden
7. Dissoziation in pH7 (D2):	120 Sekunden

Die Berechnung der Dissoziationskonstanten (K_d) erfolgte über die Software des BLItz-Geräts auf Grundlage der jeweiligen Assoziations- bzw. Dissoziationsraten und einem lokalem *Fit* der Übergänge von Assoziations- und Dissoziationsschritt. Die Dissoziationskonstanten von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc in den jeweiligen Messungen bei pH7 bzw. pH4 wurden jeweils gemittelt und deren Standardabweichung bestimmt.

3.5. Oberflächenaktivierung und -beschichtung

Reinigung der Deckgläser

Runde Deckgläser wurden vor ihrer Verwendung für 15min in 50% Ethanol in einem Ultraschallbad gereinigt. Es folgte eine Inkubation über Nacht in 1:1 Ethanol und Aceton. Nach einem Waschschritt in 100% Ethanol wurden die Deckgläser drei Stunden bei 200°C gebacken.

Epoxydilanisierung

Gereinigte Deckgläser wurden für mindestens vier Stunden bei 90°C in einem Vakuumofen bei Unterdruck zur Ablösung von physisorbiertem Wasser getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Deckgläser sofort in einer Glasküvette in 150mM (3-Glycidyloxypropyl)-Trimethoxysilan in Toluol über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die epoxysilanisierten Deckgläser drei Mal mit Aceton gewaschen und unter einer Sicherheitswerkbank oder mit Stickstoff getrocknet. Die epoxysilanisierten Deckgläser wurden bis zu ihrer unmittelbaren Verwendung mit Trocknungsmittel in einem Exsikkator unter Luftausschluss gelagert.

Beschichtung mit PLL und DSC

Für die Beschichtung mit Poly-L-Lysin (PLL) wurde 60µl PLL (200µg/ml in PBS) zwischen zwei Deckgläser gegeben und für 30min in einer feuchten Kammer inkubiert. Die so beschichteten Deckgläser wurden in H₂O dest. gewaschen und unter der Sterilbank oder mit Stickstoff getrocknet. Anschließend wurde 30µl des Disuccinimidylcarbonat (DSC)-Linkers (5mM in trockenem DMF) zwischen die mit PLL-beschichteten Seiten der Deckgläser gegeben und diese eine Stunde unter einem Abzug inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser drei Mal in Aceton gewaschen, mit Stickstoff getrocknet und unmittelbar weiterverwendet.

Beschichtung mit ECM-Molekülen

Für die Kultivierung von NIH 3T3 Zellen auf homogenen Fibronectin-Substraten wurde 60µl Fibronektin (10µg/ml in PBS) zwischen zwei autoklavierte Deckgläser gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur unter einer Sterilbank inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS wurden diese in 12-Well-Plates in DMEM mit 10% FCS bis zur Verwendung am gleichen Tag bei 37°C gelagert.

Für die Kultivierung transfizierter Retina-Explantate wurde 60 μ l einer Lösung aus 10 μ g/ml Laminin und 8 μ g/ml Merosin in HBSS zwischen zwei vorbereitete Deckgläser gebracht und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschritt in HBSS und F12-Medium, wurden die homogenen Laminin/Merosin-Substrate in F12-Medium bis zur Verwendung am gleichen Tag bei 37°C äquilibriert.

3.6. Streifenassays

Für die Untersuchung der Lenkungseigenschaften von Proteinen *in vitro*, werden oftmals sogenannte Entscheidungsassays herangezogen. In solchen Assays werden neuronale bzw. retinale Axone mit potenziellen Lenkungsmolekülen konfrontiert und ihre jeweilige Reaktion auf diese untersucht. In meiner Arbeit wurden diese Lenkungsmoleküle in Form alternierender Streifen präsentiert und werden daher in weiterem Verlauf als Streifenassays bezeichnet (Weschenfelder et al., 2013).

Für die Herstellung von Streifenassays verwendete ich PDMS-Matrizen (Sylgard 184) mit 90 μ m Streifenbreite (nach Vielmetter et al. (1990), Eigenproduktion AG Bastmeyer, KIT).

Für die Herstellung von (Gegen-)Gradienten-Assays mit länglichen, dreiecksförmigen Strukturen, wurde zunächst ein Negativ mithilfe von *Direct Laser Writing* in Pentaerythritol triacrylat (PETA) gedruckt (*Nanoscribe Photonic Professional GT*, Kollaboration mit AG Prof. Dr. Martin Wegener). Das Design wurde so gewählt, dass auf einer Fläche von 7000 x 435 μ m längliche Dreiecke bzw. breiter werdende Streifen nebeneinander lagen. An seiner Spitze beträgt die Breite eines Dreiecks 2.2 μ m mit einem Abstand von 48.8 μ m zum nächsten Dreieck. An seiner breitesten Stelle am anderen Ende des Feldes beträgt die Breite eines Dreiecks 68 μ m mit einer Lücke von 3 μ m zum nächsten Dreieck. Der Master wurde in einer kleinen Petrischale mit PDMS (Mischverhältnis von 9:1 PDMS und Härter) überschichtet, mit Unterdruck entgast und für mindestens drei Stunden bei 65°C ausgehärtet. Der so entstandene PDSM-Block konnte anschließend gelöst und der Stempel auf die gewünschte Größe zugeschnitten werden.

3.6.1. EphA3-Fc Streifenassays via *micro contact printing*

Für den Proteinübertrag von EphA3-Fc (mit humanem Fc-Fragment Tag) auf eine Oberfläche, wurde dieses entsprechend in PBS verdünnt, auf die strukturierte Fläche der Silikonmatrize aufgetragen und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung abgesaugt, die Matrize mehrmals in H₂O dest. gewaschen und die strukturierte Fläche vorsichtig auf ein funktionalisiertes Deckglas aufgebracht. Der Proteinübertrag auf die Oberfläche erfolgte für 15min bei 37°C (*micro contact printing*). Die Proteinübertragung via *micro contact printing* wird im Verlauf dieser Arbeit vereinfacht als „stempeln“ bezeichnet. Um ein gleichmäßiges Muster zu erhalten, wurden die Flächen zwischen den gestempelten EphA3-Fc Streifen durch Überschichtung mit humanem Fc-Fragment in äquimolarer

Konzentration für eine Stunde bei 37°C aufgefüllt (*backfill*). Um die Gesamt molekülzahl in jedem Experiment konstant mit der Gesamt molekülzahl von 30 μ g/ml EphA3-Fc (85.4kDa) zu halten, wurde in Verdünnungsreihen (siehe Abschnitt 4.3.3. und 4.5.1.) in einem jeweils geeigneten Verhältnis humanes Fc-Fragment (25kDa) zu der verwendeten Konzentration beigemischt.

Für die *in vitro* Kultivierung retinaler Explantate auf dem Streifenassay wurde das Muster für eine Stunde bei 37°C mit Laminin (20 μ g/ml in HBSS) überschichtet und nach einem Waschschritt mit HBSS und F12-Medium, in letzterem bis zur Verwendung bei 37°C äquilibriert.

3.6.2. ephrin-A2-mFc Streifenassays durch Adsorption aus Lösung

Als Gegenpart zum gestempelten EphA3-Fc wurde ephrin-A2-mFc (mit Fc-Fragment Tag aus der Maus) aus der Lösung heraus auf das jeweilige Substrat adsorbiert. Hierfür wurde zunächst eine Silikonmatrize äquimolar zur später eingesetzten ephrin-A2-mFc Konzentration für eine Stunde bei 37°C mit Fc-Fragment beschichtet. Nach dem Spülen der Matrize in destilliertem Wasser, wurde das gebundene Fc-Fragment 15min bei 37°C über *micro contact printing* auf ein entsprechendes Deckglas aufgestempelt und die Matrize anschließend vorsichtig vom Deckglas entfernt. Parallel dazu wurde ephrin-A2-mFc in einem Verhältnis von 2:1 mit einem goat anti-mouse Alexa Fluor 647 Antikörper für 20min auf einem Heizblock mit 400rpm bei RT, entweder in PBS (pH7) oder in einem sauren Puffer (pH4), geclustert.

Das gestempelte Fc-Fragment Muster wurde mit dem geclusterten ephrin-A2-mFc überschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Wurde ephrin-A2-Fc in saurer Lösung aufgebracht, wurde das Muster anschließend mehrmals gründlich mit HBSS gewaschen. Das darin enthaltene Phenolrot diente hierbei als nützliche Kontrolle auf möglicherweise verbliebene saure Lösung. Auch hier wurde den Verdünnungsreihen von ephrin-A2-mFc (siehe Abschnitt 4.3.1. und 4.5.3.) humanes Fc-Fragment (25kDa) in einem geeigneten Verhältnis zu der jeweiligen Proteinkonzentration beigemischt, um die Gesamt molekülzahl der höchsten Konzentration von 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc (46kDa) in jedem Experiment konstant beizubehalten.

Für die *in vitro* Kultivierung retinaler Explantate auf einem ephrin-A2-mFc Muster, welches in Kontakt mit dem sauren NaAc-Puffer kam, wurde der Assay für mindestens zwei Stunden bei 37°C mit einer Mischung aus Laminin (10 μ g/ml in HBSS) und Merosin (8 μ g/ml in HBSS) überschichtet und nach einem Waschschritt mit HBSS und F12-Medium, in letzterem bei 37°C bis zur Verwendung äquilibriert.

3.6.3. Doppelstreifen-Assays

Für die Kombination beider Lenkungsproteine in einem sogenannten Doppelstreifen-Assay, wurde stets zuerst EphA3-Fc via *micro contact printing* auf ein entsprechend Oberfläche aufgestempelt (siehe Abschnitt 3.6.1.). Nach der Proteinübertragung wurde das Muster ohne weiteren Waschschritt für eine Stunde bei 37°C mit 16µg/ml geclustertem ephrin-A2-mFc in saurer Lösung (pH4) überschichtet (siehe Abschnitt 3.6.2.). Das gesamte Muster wurde anschließend durch gründliches Waschen mit HBSS in ein neutrales Milieu zurückgeführt. Für die *in vitro* Kultivierung von Retina-Explantaten war eine mindestens zweistündige Inkubation mit einer Mischung aus Laminin (10µg/ml in HBSS) und Merosin (8µg/ml in HBSS) bei 37°C nötig.

3.6.4. Mikroskopische Aufnahmen und Auswertung der Streifenassays

Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioimager Z1 (ZEISS, Oberkochen) mit CCD-Kamera aufgenommen. Für die Bildaufnahme und Bildbearbeitung wurde die *Zen Blue* Edition von Zeiss verwendet.

Entlang der gesamten dorso-ventralen Achse eines Explantatstreifens wurden mehrere Aufnahmen auswachsender Axone und der darunterliegenden Proteinstreifen aufgenommen. Für die Auswertung der Streifenassays verwendete ich das Plugin *JaCoP* (Just another colocalization plugin) der Bildverarbeitungssoftware *Fiji* (*Fiji is just ImageJ*). Dieses Plugin separiert die aufgenommenen Fluoreszenzkanäle und segmentiert diese anhand von Schwellenwerten ihrer Fluoreszenzintensität (*Threshold*). Mittels eines manuell gesetzten *Thresholds* überlagert das Plugin die segmentierten Proteinstreifen und Axone und analysiert den Anteil der Co-Lokalisation markierter Pixel der beiden Bilder in Form der Manders' Koeffizienten. Die Werte der Manders' Koeffizienten von Axonen auf den Proteinstreifen entlang eines Retina-Streifens wurden pro Retina-Explantat gemittelt und der Standardfehler bestimmt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt, wobei Werte mit $p \geq 0.05$ als nicht signifikant (n.s.) bewertet wurden.

Für die Analyse der Korrelation von eingesetzter Proteinkonzentration und repulsiver axonaler Entscheidung wurde eine Regressionsgerade über die prozentualen Anteile der Axone auf den jeweiligen Proteinstreifen gelegt und über eine Excel-Funktion deren Bestimmtheitsmaß r^2 bzw. der Korrelationskoeffizient r ermittelt. Zusammen mit der Anzahl einzelner Messpunkte (Anzahl ausgewerteter Retina-Explantate) konnte der p -Wert für die Korrelation der Ergebnisse berechnet werden, welcher die statistische Signifikanz der Korrelationskoeffizienten angibt.

3.7. Zellfärbung, Zellfixierung und Immunhistochemie

3.7.1. HaloTag- und SNAP-Tag Färbungen

Das exprimierte HaloTag-EphA3 Fusionsprotein wurde mit dem zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 (AG Dr. Luke Lavis, Janelia) markiert.

Das Fusionsprotein SNAP-ephrin-A5 wurde über den nicht-zellpermeablen SNAP-Liganden Janelia Fluor 646 markiert.

Lebendfärbung von NIH 3T3 Zellen und retinalen Wachstumskegeln

Für die Halo- und SNAP-Tag Färbungen von **NIH 3T3 Zellen** wurde das Zellmedium in den 12-Well-Platten bis auf einen Rest von 250µl abgenommen und der jeweilige Ligand in entsprechender Endkonzentration in 250µl 37°C warmem DMEM-Medium mit 10% FCS und zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 15-30min bei 37°C im Brutschrank.

Für die Lebendfärbung **retinaler Wachstumskegel** mit Halo- und SNAP-Liganden wurde das F12-MZ „Plus“ Medium vorsichtig durch warmes F12-Medium ausgetauscht und mit dem jeweiligen Liganden, in seiner entsprechenden Endkonzentration, in F12-Medium ersetzt. Auch hier wurden die Kulturen 15-30min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Intra- und extrazelluläres **HaloTag-EphA3** wurde durch den zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 in einer Endkonzentration von 50nM markiert. Nach der Inkubation wurde noch ungebundener zellpermeabler Ligand zwei Mal 15min mit frischem, 37°C warmen Zellmedium ausgewaschen. Aufgrund der erhöhten Sensibilität retinaler Wachstumskegel, erfolgte jeder Schritt auf einer 37°C warmen Heizplatte. Nach den Färbeschritten wurden retinale Explantat-Kulturen für weitere 30min in F12-Medium bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um eventuell kollabierten Wachstumskegel die Gelegenheit zur Regeneration zu geben (Regenerationsschritt).

Die Markierung von extrazellulärem **SNAP-ephrin-A5** in der Zellmembran, erfolgte durch den nicht-zellpermeablen SNAP-Liganden Janelia Fluor 646 in einer Endkonzentration von 200nM im Zellmedium. Nach der Inkubation wurde ungebundener Ligand durch einmaliges Waschen mit frischem Medium entfernt.

Im Anschluss an die Lebendfärbung wurden die Kulturen fixiert und in Mowiol eingebettet. Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop des Typs Axioimager Z1 (ZEISS, Oberkochen) mit CCD-Kamera aufgenommen. Für die Bildaufnahme und Bildbearbeitung wurde die *Zen Blue* Edition von Zeiss verwendet. Fluoreszentes Hintergrundsignal außerhalb der Fokusebene, wurde über den Apotome-Modus des Mikroskops eliminiert.

3.7.2. Fixierung & Immunhistochemie

Für die Fixierung wurden die **Zellkulturen** für 15min mit 37°C warmer Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal fünf Minuten mit 0.1% Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Um die hochdynamische Morphologie **retinaler Wachstumskegel** während der Fixierung zu erhalten, wurden Retina-Explantate für 15min auf einer 37°C warmen Heizplatte mit Fixierlösung und zusätzlich 0.1% Glutaraldehyd fixiert und anschließend permeabilisiert.

Glutaraldehyd führt durch die Induktion konjugierter Doppelbindungen zu einer Autofluoreszenz, welche in besonders feinen Strukturen zu einem schlechteren Signal-Hintergrund Verhältnis führt. Um diese Autofluoreszenz zu reduzieren, wurden transfizierte Explantatkulturen mit Natriumborhydrid (Carl Roth, #4051) behandelt. Hierfür wurde eine kleine Spatelspitze Natriumborhydrid in 5ml PBS gelöst, wobei die Bildung kleiner Bläschen zu beobachten ist. Die fixierten und permeabilisierten Präparate wurden zwei Mal fünf Minuten, mit jeweils frisch angesetzter Natriumborhydrid-Lösung, inkubiert und anschließend drei Mal fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Nach einer 20-minütigen Blockierung der fixierten Zellen bzw. Explantat-Kulturen mit 1% BSA in PBS, erfolgte die jeweilige immunhistochemische Färbung.

Fluoreszente Färbungen von Proteinen und Axonen in Streifenassays

Alle Färbeschritte wurden für eine Stunde in einer feuchten, abgedunkelten Kammer bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C durchgeführt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde jeweils drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Die Zwischenräume von Einzelstreifen-Assays wurden mit humanem Fc-Fragment aufgefüllt. Ebenso wurde für den Erhalt der Gesamt molekülzahl in den Konzentrationsverdünnungsreihen humanes Fc-Fragment zugemischt. Da das verwendete rekombinante **EphA3-Fc** an seinem C-Terminus ein humanes Fc-Fragment als Affinitäts-Tag enthält, war es in diesen Fällen nicht möglich einen anti-human IgG Antikörper zu verwenden. Stattdessen wurde die extrazelluläre Domäne des EphA3-Fc mit einem rabbit anti-EphA3 Primärantikörpers (1:200 in 1% BSA in PBS) markiert und anschließend mit einem goat anti-rabbit Cy3 gekoppelten Sekundärantikörper (1:400 1% BSA in PBS) gefärbt.

Das **ephrin-A2-mFc** in den Einzel- bzw. Doppelstreifenassays wurde stets in einem Verhältnis von 2:1 mit einem donkey anti-mouse Alexa Fluor 647 Antikörper geclustert (siehe Abschnitt 3.6.2) und somit bereits fluoreszent markiert. Das humane Fc-Fragment in den Zwischenstreifen von Einzelstreifen-Assays wurde mit goat anti-human IgG Alexa Fluor 546 (3µg/ml in 1% BSA in PBS) gefärbt. In **Doppelstreifen-Assays** mit ephrin-A2-mFc und EphA3-Fc wurde auf eine zusätzliche Detektion des humanen Fc-Fragments verzichtet.

Axone retinaler Ganglienzellen wurden mit einem Alexa Fluor 488-gekoppeltem Phalloidin (1:50 in 1% BSA in PBS) in einem gemeinsamen Färbeschritt mit den jeweiligen Sekundärantikörpern markiert.

Nach den Färbeschritten und letztmaligem Waschen in PBS wurde dieses abgesaugt und die Metallklötzchen vorsichtig von den Präparaten entfernt. Nach nochmaligem Spülen der Präparate mit H₂O dest. wurden diese in Mowiol eingebettet.

3.8. *Expansion Microscopy (ExM)*

Die Expansionsmikroskopie (*Expansion Microscopy*, ExM) ist eine Methode zur physischen Vergrößerung von Proben zur Verbesserung der Auflösung subzellulärer Strukturen ohne zusätzliche mikroskopische Anpassungen der Hardware (Chen et al., 2015; Wassie et al., 2019). Hierbei werden die gewünschten Strukturen in fixierten Präparaten mit geeigneten fluoreszenten Markern bzw. fluoreszent-gekoppelten Antikörpern markiert und diese chemisch funktionalisiert. Die funktionalisierten Gruppen binden an ein in das Präparat inkorporiertes Acrylamid-Gel mit zugefügtem Polyacrylat Superabsorber und koppeln somit die Fluorophore an das Polymer. Nachdem organische Bestandteile des Präparats durch einen proteolytischen Verdau entfernt wurden, wird durch Zugabe von Wasser das Polymer mit dem Superabsorber Wasser isotrop um ein Vielfaches vergrößert, wobei sich die Positionen der gekoppelten Fluorophore entsprechend verändert. Die Bestandteile der fluoreszent-markierten, zellulären Struktur wird somit physisch vergrößert und mikroskopisch besser auflösbar, wobei sich räumliche Anordnungen durch die isotrope Vergrößerung nicht verändern. Je nach gewünschtem Zellkompartiment bzw. zellulärer Struktur, gibt es heute eine große Bandbreite an verschiedenen und für die jeweils besonderen Anforderungen optimierten ExM-Protokollen. Das hier verwendete Protokoll wurde aus Zhang et al. (2020) und Asano et al. (2018) zusammengetragen.

Für die Expansion retinaler Wachstumskegel wurden Retina-Explantate wie in Abschnitt 3.3. aus Hühnerembryonen gewonnen, diese auf homogenen Laminin-Substraten kultiviert und anschließend wie in Abschnitt 3.7.2. fixiert, permeabilisiert und mit Natriumborhydrid behandelt (Carl Roth, #4051). Nach einem 15-minütigen Blockierungsschritt mit 1% BSA in PBS wurde das Aktin-Zytoskelett für eine Stunde mit Phalloidin Alexa Fluor 488 (1:50 in 1% BSA in PBS) in einer feuchten Kammer markiert. Da Phalloidin nicht für die ExM geeignet ist, erfolgte eine weitere Färbung mit einem rabbit anti-Alexa Fluor 488 Primärantikörper (1:200 in 1% BSA in PBS) und einem donkey anti-rabbit Alexa Fluor 568 Sekundärantikörper (1:200 in 1% BSA in PBS) für jeweils eine Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation über Nacht oder mindestens sechs Stunden mit AcX (0.1mg/ml Stocklösung in PBS), um Amine von Proteinen mit Acrylamidgruppen zu funktionalisieren. Nach nochmaligem Waschen wurde das Flüssigkeit vollständig abgesaugt, die Metallklötzchen entfernt und die Cellulosemembran mit einem Skalpell von den Axonen vorsichtig abgetrennt und ebenfalls

entfernt. Nun können mikroskopische „*Pre-Expansions*“ Fluoreszenzaufnahmen der nicht-expandierten zellulären Strukturen generiert werden. Insbesondere empfiehlt sich hier die Auswahl besonders markanter Strukturen, die nach der Expansion die Orientierung im Präparat erleichtern. Ein Objektträger wurde in Parafilm eingeschlagen und zwei Podeste aus Parafilm von etwa 3mm Höhe in einem Abstand von etwa 2cm darauf gelegt. Die folgenden Schritte erfolgten auf einer Metallplatte auf Eis: der kalten Polymerlösung (86mg/ml Natriumcrylat, 25mg/ml Acrylamid, 1.5mg/ml Bis-Acrylamid in 1x PBS) wurde jeweils 0,2% (w/w) kaltes Temed und APS zugefügt und gut vermischt. Damit beginnt die Polymerisation des Gels. Sofort im Anschluss wurden ca. 70µl der Polymer-Lösung zwischen die Podeste auf den Objektträger gegeben und das homogene Laminin-Substrat mit den Axonen nach unten auf den Flüssigkeitstropfen und die Podeste gelegt. Dabei ist sorgfältig auf die Vermeidung von Luftblasen zu achten. Nach einer Inkubation für eine Minute auf Eis, erfolgt die Polymerisation für zwei Stunden bei 37°C. Anschließend wird das auspolymerisierte Gel mit Hilfe eines Skalpells und einem feinen Pinsel von Deckglas und Objektträger entfernt, ggf. zugeschnitten und in die Verdaulösung (8U Proteinase K in Verdaupuffer) gelegt und über Nacht bei RT inkubiert. Die Verdaulösung wird mit einer Pipette entfernt und durch destilliertes Wasser ersetzt. Während der Expansion des Hydrogels wird das Wasser alle 15-30min mehrmals vollständig ausgetauscht, bis die Expansion vollständig abgeschlossen ist. Nach Entfernung des Wassers und ggf. erneuten Zuschneiden des Gels, wurden „*Post-Expansion*“ Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop LSM 800 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) generiert.

4 Ergebnisse

4.1. Methoden zur Rekonstitution von EphA3/ephrin-A2-mFc Gegengradienten *in vitro*

Unverzichtbar für die spätere Informationsverarbeitung im visuellen System ist die Ausbildung einer korrekten topographischen Karte im Rahmen der retinotektaalen Projektion während der Embryonalentwicklung. Obwohl die Beteiligung von EphA/ ephrin-A Gegengradienten an der Ausbildung der topographischen Karte allgemein akzeptiert ist, ist ihre genaue Rolle während der axonalen Lenkung noch nicht vollständig geklärt.

So basieren beispielsweise *in vitro* Experimente zur Lenkung von retinalen Axonen bisher meist auf binären Entscheidungsassays, in welchen sich Wachstumskegel entweder für oder gegen ein angebotenes Lenkungsmolekül entscheiden können. Diese binären Entscheidungen *in vitro* bilden allerdings die topographisch kontinuierliche Entscheidung retinaler Wachstumskegel *in vivo* nur unvollständig ab. Wir vertreten die Hypothese, dass ein retinaler Wachstumskegel sein Zielgebiet im optischen Tektum dann erreicht, wenn dort das Verhältnis von EphA und ephrin-A dem spezifischen Verhältnis von EphA und ephrin-A seines Ursprungsort in der Retina entspricht und sich somit *forward* und *reverse signaling* ausbalancieren.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurden in diesem Projekt Methoden evaluiert, um einen EphA/ ephrin-A Gegengradienten *in vitro* zu rekonstituieren und damit potentiell topographisch kontinuierliches Verhalten von Axonen retinaler Ganglienzellen *in vitro* zu untersuchen. Hierfür soll EphA3-Fc via *micro contact printing* auf eine Oberfläche strukturiert und die dabei entstehenden leeren Zwischenstreifen mit ephrin-A2-mFc durch Überschichtung des Musters aufgefüllt werden (*backfill*). Da sich beide Proteine aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität jedoch binden und sich auf diese Weise gegenseitig maskieren würden, wird im Folgenden die Strategie verfolgt diese Affinität der beide Proteine zueinander durch Senken des pH-Wertes herabzusetzen.

4.1.1. Reversible Reduktion der Rezeptor-Liganden-Affinität in pH4

Für die Messung der Bindungsaffinität zwischen ephrin-A2 und EphA3, wurde ein Biolayer Interferometer (BLItz, Sartorius) verwendet. Hierfür wurde 10 μ g/ml biotinyliertes ephrin-A2-Fc an einen Streptavidin-beschichteten Biosensor gekoppelt. Anschließend wurde die Assoziations- und Dissoziationsrate von 30 μ g/ml EphA3-Fc an das gekoppelte ephrin-A2-Fc gemessen, welche sich durch eine Schichtdickenänderung des Biolayers und damit eine Veränderung der Lichtinterferenz am Biosensor ergibt (siehe Abschnitt 3.4).

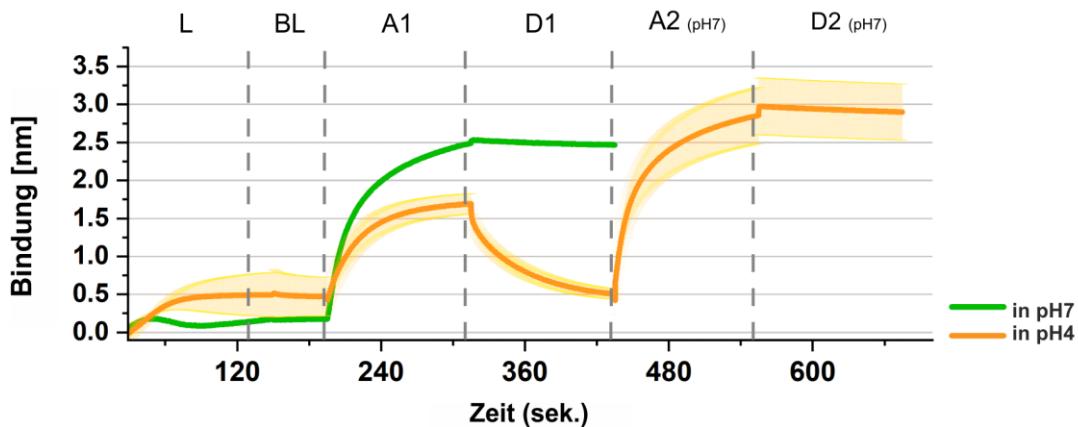
Als Positivkontrolle ist in Abbildung 4 A eine Bindungskurve der Bindung von 30 μ g/ml EphA3-Fc an 10 μ g/ml biotinyliertes ephrin-A2-Fc in pH-neutralem *Kinetics Buffer* (Sartorius)

aufgetragen (grüne Linie, pH7). Nach der initialen Bindung des biotinylierten ephrin-A2-Fc an den Biosensor in neutralem Puffer (Loading, L) sowie einem Zwischenschritt zur Kontrolle der Beladungsstabilität (Baseline, BL), erkennt man während des Assoziationsschritts (A1) eine deutlich ansteigende Kurve durch die Bindung von EphA3 an ephrin-A2 bei pH7 bis zu einem Wert von ca. 2.5nm. Der Kurvenverlauf verändert sich in einem anschließenden Dissoziationsschritt in neutralem Puffer ohne EphA3 kaum (D1). Dies lässt darauf schließen, dass sich EphA3-Fc kaum vom ephrin-A2 ablöst und diese Bindung stabil ist. In fünf durchgeführten Messreihen ergaben die ermittelten Assoziations- und Dissoziationsraten für die Positivkontrolle in pH7 eine Dissoziationskonstante von 8.93×10^{-10} M mit einer Standardabweichung von 7.35×10^{-10} M (Abbildung 4 B, grüner Balken). Damit ist die hohe Bindungsaffinität und Funktionalität des hier verwendeten EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc in *Kinetics Buffer* bei pH7 bestätigt und stimmt ebenso mit bisherigen Angaben überein (Noberini, Rubio de la Torre, et al., 2012).

In einem nächsten Experiment wurde die Bindungsaffinität von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc in saurem Natrium-Acetat Puffer (NaAc, pH4) gemessen. Der Verlauf der Bindungskurve ist in Abbildung 2 A aufgetragen (orangefarbene Linie, pH4). Nach einem Bindungsschritt von 10 μ g/ml biotinyliertem ephrin-A2-Fc an den Biosensor (L) und anschließendem *Baseline*-Schritt (BL), erkennt man im ersten Assoziationsschritt (A1) mit 30 μ g/ml EphA3-Fc in saurem NaAc-Puffer einen langsameren Anstieg der Kurve auf ca. 1.7nm (Abbildung 4 A). Im folgenden Dissoziationsschritt (D1) in NaAc ohne EphA3, sinkt die Kurve rapide ab und fällt bis auf den Ursprungswert von 0.5nm ab, was der initialen Schichtdicke von ephrin-A2 nach dessen Kopplung an den Biosensor entspricht (Abbildung 4 B). Die Schichtdicke des Biolayers nimmt demnach auf den Ausgangswert ab und lässt vermuten, dass sich das gebundene EphA3 weitgehend vollständig von ephrin-A2 abgelöst hat. Eine Berechnung und Mittelung der Dissoziationskonstanten von acht unabhängig voneinander durchgeführten Messreihen, ergibt hierbei einen Wert von 7.05×10^{-7} M, mit einer Standardabweichung von 6.64×10^{-7} M (Abbildung 4 B, schraffierter Balken). Im saurer Lösung ist die Dissoziationskonstante damit um etwa das 790-fache reduziert.

Um zu überprüfen, ob das gekoppelte ephrin-A2-Fc bei einer Rückführung von saurem in neutralen Puffer noch funktional ist und wieder von EphA3-Fc gebunden werden kann, erfolgte im Anschluss an den Dissoziationsschritt (D1) ein technisch notwendiger *Baseline*-Schritt in neutralem *Kinetics Buffer* (hier nicht gezeigt), mit anschließender zweiter Assoziation von 30 μ g/ml EphA3-Fc in pH7. Hierbei konnte eine rapide Steigerung der Bindung von EphA3 an ephrin-A2 auf ca. 2.8nm beobachtet werden (A2; Abbildung 4 A, orangene Linie). In dem zweiten Dissoziationsschritt in pH7 (D2) konnte eine bloß unwesentliche Abnahme der Schichtdicke des Biolayers ausgemacht werden. Das während des A2-Schritts gebundene EphA3 scheint sich während des D2-Schritts nur zu einem sehr geringen Teil abzulösen.

A



B

pH-abhängige Bindungsaffinität von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc

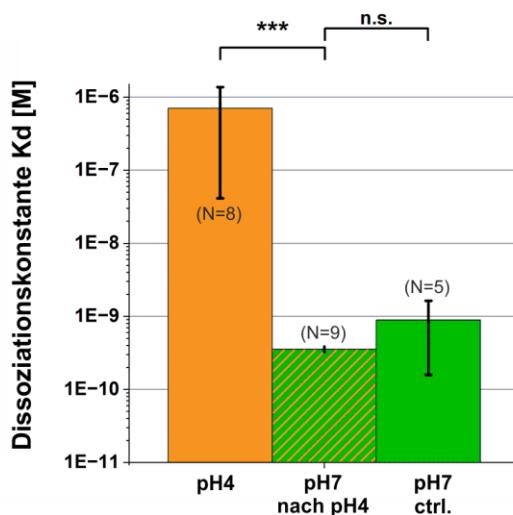


Abbildung 4: Einfluss des pH-Wertes auf die Bindungskinetik von ephrin-A2-Fc und EphA3-Fc

A: Bindungskurve der Biolayer-Interferometrie: Kopplung von biotinyliertem ephrin-A2-hFc an den Biosensor (L) und entsprechende Baseline-Messung (BL). Bindung von 30 μ g/ml EphA3-Fc an biotinyliertes ephrin-A2-mFc in neutralem Puffer (pH7, grüne Linie) bzw. saurem Puffer (pH4, orangefarbene Linie) während des Assoziations schritts (A1). Dissoziation von EphA3-Fc in pH7 bzw. pH4 (D1) und erneute Assoziation in neutralem Puffer nach Rückführung des Biosensors in pH7 (A2). Die Dissoziation erfolgt ebenfalls in pH7 (D2 orangene Linie). B: Quantifizierung der Dissoziationskonstanten (K_d) von ephrin-A2-hFc und EphA3-Fc pH7, pH4 sowie pH4 und Rückführung in pH7. Die K_d in pH4 sinkt von 7.05×10^{-7} M auf 3.53×10^{-10} M nach Rückführung in pH7. Dissoziationskonstante der Positivkontrolle beträgt ebenfalls 3.53×10^{-10} M. Fehlerbalken und -bereiche geben die Standardabweichung an. N= Anzahl unabhängiger Messungen. T-Test Signifikanzangaben mit: ***: $p < 0.001$. n.s.: nicht signifikant.

Die Dissoziationskonstante aus neun unabhängigen Messungen nach einem Wechsel von einem sauren in einen neutralen pH-Wert unterscheidet sich mit 3.53×10^{-10} M und einer Standardabweichung von 3.84×10^{-10} M signifikant von der Dissoziationskonstante von ephrin-A2-Fc und EphA3-Fc in saurer Lösung (Abbildung 4 B, $p = 0.009$, schraffierter Balken). Dieser Wert unterscheidet sich zudem statistisch nicht von dem der Positivkontrolle in pH7 (Abbildung 4 B), was dafür spricht, dass die während des im D1-Schritt beobachtete Abnahme der Bindungsaffinität von EphA3 und ephrin-A2 in einem sauren Puffer durch eine Rückführung in pH7 wiederhergestellt ist. Diese Ergebnisse bestätigen zunächst einmal die biologische Funktionalität und hohe Bindungsaffinität der verwendeten EphA3- und

ephrin-A2-Fc-Fusionsproteine in einem pH-neutralen Puffer. Die Bindungsaffinität der beiden Proteine lässt sich in einem sauren Natrium-Acetat Puffer bei pH4 signifikant reduzieren und durch eine Rückführung des ephrin-A2-Fc in ein neutrales pH-Milieu wiederherstellen.

Damit sind die notwendigen Voraussetzungen für die Herstellung von kontinuierlichen Gegengradienten gelegt, in welchen die Bindung und gegenseitige Maskierung von EphA3- Fc und ephrinA2-Fc reversibel unterdrückt werden soll ohne die Proteinfunktionalität irreversibel zu inhibieren.

4.1.2. Dreiecksförmige Strukturen als Modell für *in vitro* Gegengradienten

Um *in vitro* Gegengradienten aus zwei gegenläufigen Lenkungsmolekülen zu rekonstituieren wurde ein, wie in Abschnitt 3.6. beschriebenes, Design aus länglichen Dreiecken erstellt. Per *Direct Laser Writing* wurde hierfür ein Master erstellt und durch Auffüllen mit PDSM ein Silikon-Stempel der Struktur abgeformt. Über eine insgesamte Breite von 453 μ m sind parallele Streifen angeordnet, welche an ihrem schmalsten Ende eine Breite von 2.2 μ m und an ihrem anderen Ende eine Breite von 68 μ m aufweisen und somit eine insgesamt trapezartige in guter Näherung gleichschenklig dreieckige Form erhalten (Abbildung 5). Diese längliche Struktur soll der natürlichen Krümmung projizierender Axone entgegen wirken und ein gerichtetes Auswachsen sowie vereinfachte Interpretation der Experimente ermöglichen. Die Länge eines Dreiecks und damit die des gesamten Feldes beträgt 7000 μ m. Die Orientierung ausgehend von schmalen Streifen in Richtung breite Streifen wurde als *uphill* deklariert (Zunahme der Proteinmenge entlang des Gradienten). Entsprechend wurde die Orientierung beginnend von breiten Streifen in Richtung schmale Streifen als *downhill* deklariert (Abnahme der Proteinmenge entlang des Gradienten).

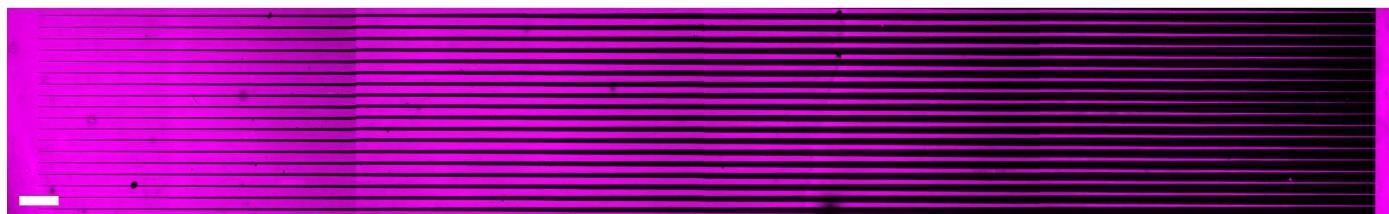


Abbildung 5: Darstellung der Dreiecksgradienten-Struktur für kontinuierliche Gegengradienten *in vitro*. Dreiecksgradient aus gestempeltem EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas mit parallel angeordneten, sich verbreiternden Streifen (Breite 2.2- 68 μ m, von rechts nach links), sowie entsprechend breiter werdenden Zwischenlücken (Breite 3- 48.8 μ m, von links nach rechts) EphA3-Fc gefärbt mit goat anti-human Alexa Fluor 546. Darstellung als Collage aus fluoreszenten Einzelbildern. Maßstabsbalken 200 μ m.

Axonale Lenkung in EphA3-Fc Dreiecksgradienten-Assays

Für eine Charakterisierung des Lenkungsverhaltens retinaler Axone in einem Dreiecksgradienten-Feld, wurden Gradienten-Assays aus 30 μ g/ml EphA3-Fc in PBS via *micro contact printing* auf epoxysilanisiertem Glas hergestellt und mit 20 μ g/ml Laminin überschichtet. Nasale und temporale Explantat-Streifen der Retina wurden so platziert, dass die Wuchsrichtung der Axone sowohl *uphill* (von dünnen in Richtung breite Seiten) als auch *downhill* (von breiten in Richtung dünne Seiten) beobachtet werden konnte.

In Abbildung 6 A ist das Auswachsen nasaler Axone *uphill* entlang eines EphA3-Fc Dreiecksgradienten exemplarisch gezeigt. Am unteren Bildrand erkennt man retinales Gewebe, welches sich leicht auf dem Laminin-Substrat ausflacht und in den Dreiecksgradienten-Assay hineinragt. Überraschenderweise stoppen die Axone auf den Dreiecksgradienten nicht. Es ist zu beobachten, dass Axone auf dem ersten Drittel des Gradientenfeldes über die EphA3-Fc Streifen hinweg wachsen und nicht von dem Protein beeinflusst werden. Erst weiter *uphill* reagieren sie repulsiv auf die Proteinstreifen, finden sich anschließend in den Zwischenstreifen ohne Protein ein, wo sie zunehmend miteinander faszikulieren und die EphA3-Fc Dreiecke im weiteren Verlauf nicht mehr übertreten. In Abbildung 6 B ist das Lenkungsverhalten nasaler Axone vergleichbarer Exzentrizität gezeigt, die auf die Seite breiter Dreiecksgradient-Streifen gelegt wurden und *downhill* entlang des EphA3-Fc Gradienten auswachsen. Das Retinagewebe ist am oberen Bildrand zu erkennen. Anders als in der *uphill*-Kondition, vermeiden die nasalen Axone in der *downhill*-Situation nach einer sehr kurzen Überwachungsstrecke die breiteren EphA3-Fc Streifen und wachsen innerhalb der Zwischenstreifen aus. Im unteren Drittel des Gradientenfeldes erkennt man einzelne Axone, welche nicht mehr von den schmalen EphA3-Fc Streifen abgestoßen werden und diese schließlich übertreten. Trotz ihrer Herkunft aus der gleichen Retina und identischer Kultivierungsdauer, sind nasale Axone in der *downhill*-Kondition meist weniger weit ausgewachsen als die der *uphill* Situation (Vergleich Abb. 6 A mit B).

In Abbildung 7 sind exemplarische Dreiecksgradienten-Assays mit Explantat-Streifen der temporalen Retina gezeigt. In Abbildung 7 A wachsen diese *uphill* entlang des EphA3-Fc Gradienten. Hierbei ist zu beobachten, dass RGC-Axone zunächst über die EphA3-Fc Streifen hinweg wachsen und erst kurz vor der Hälfte des Feldes, repulsiv auf diese reagieren und die Dreiecke nicht mehr übertreten. Auch hier erkennt man im weiteren Verlauf ihrer Elongation eine zunehmende Faszikulation der Axone, die sich auf diese Weise in den Zwischenstreifen ohne Protein fortbewegen. In Abbildung 7 B ist ein exemplarisches Bild gezeigt, in welchem sich Axone temporaler RGC vergleichbarer Exzentrizität *downhill* zu dem EphA3-Fc Gradienten fortbewegen. Anders als bei nasalen Axonen, ist bei temporalen von Beginn ihrer Projektion an ein vermehrtes Ignorieren und Überwachsen der breiten Proteinstreifen zu beobachten. Dabei beginnen temporale Axone erst ab dem ersten Drittel des Feldes repulsiv auf die EphA3-Dreiecke zu reagieren und übertreten die schmaler werdenden Dreiecke während der anschließenden Projektion nicht mehr.

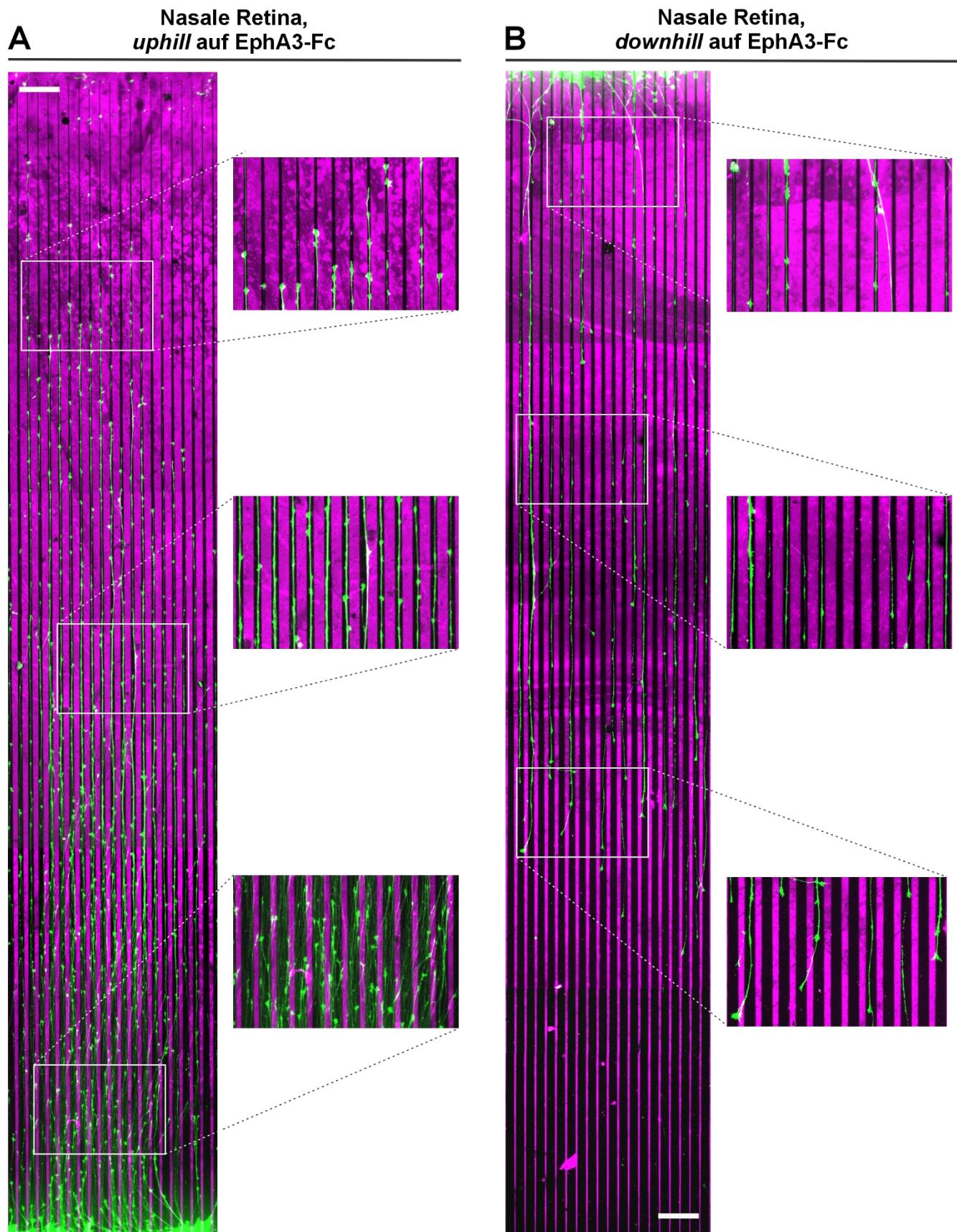


Abbildung 6: Nasale Axone in Dreiecksgradienten-Assay aus EphA3-Fc in PBS

A: Axone retinaler Ganglienzellen wachsen entlang der Dreieckstruktur uphill von Bereichen schmaler Dreieckseiten (unten) in Richtung der breiteren Bereiche des Dreiecks. Retinagewebe befindet sich am unteren Bildrand. B Axone retinaler Ganglienzellen wachsen entlang der Dreiecksstruktur downhill von breiten Dreiecksbreiten (oben) in Richtung der schmalen Bereiche (unten). Retinagewebe am oberen Bildrand. Axone gefärbt mit Phalloidin Alexa 488 (grün), EphA3-Fc gefärbt mit goat anti-human IgG Alexa Fluor 549 (magenta). Darstellung als Collage aus fluoreszten Einzelbildern. Maßstabsbalken 200 μ m

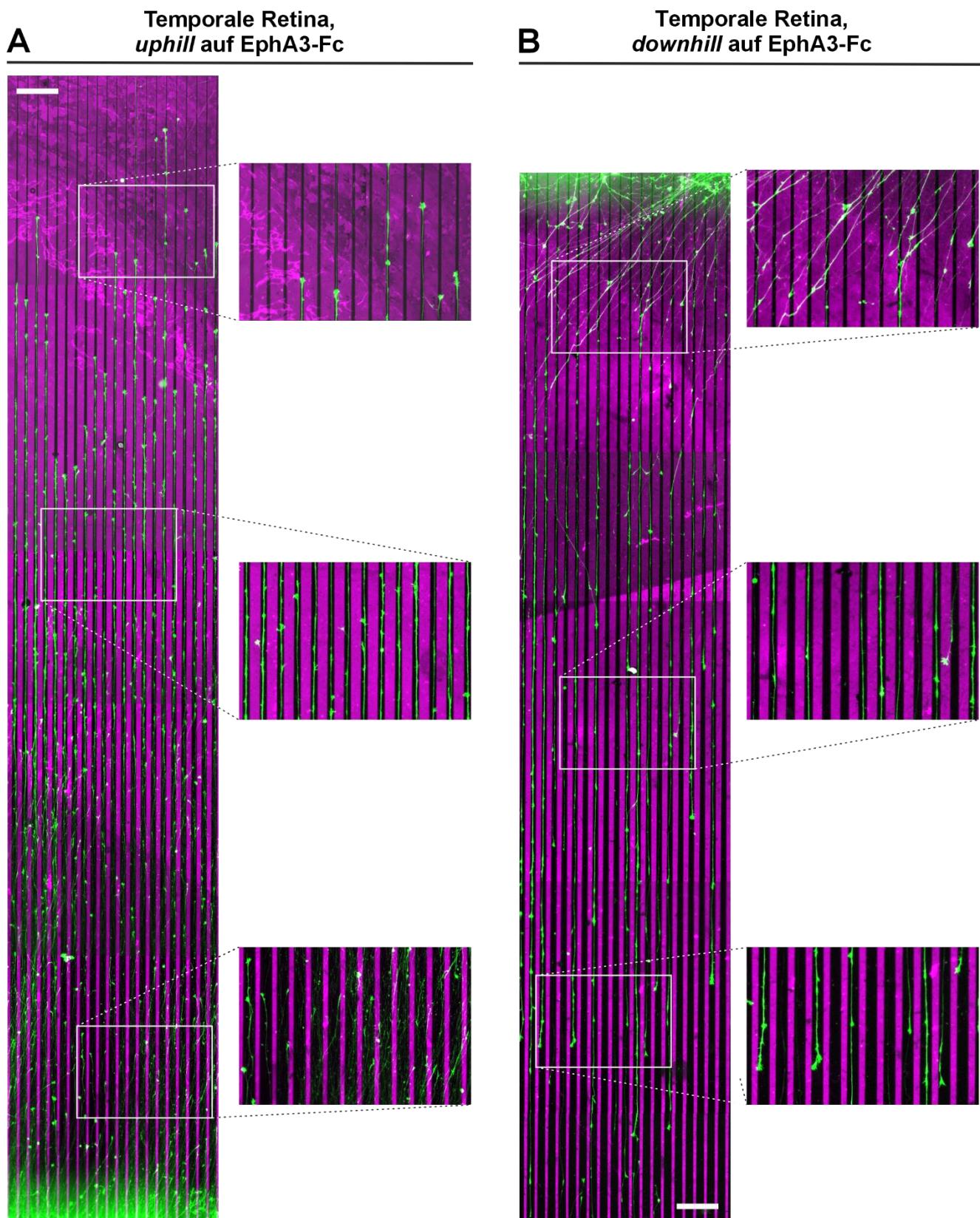


Abbildung 7: Temporale Axone in Dreiecksgradienten-Assay aus EphA3-Fc in PBS

A: Axone retinaler Ganglienzellen wachsen uphill entlang der dünnen Dreiecksbreiten (unten) in Richtung der breiten Dreiecksbreite (oben). Retinagewebe befindet sich am unteren Bildrand. **B:** Axone retinaler Ganglienzellen wachsen downhill entlang der breiten Dreiecksbreiten (oben) in Richtung der dünnen Dreiecksbreiten (unten). Retinagewebe befindet sich am oberen Bildrand. Axone mit Phalloidin Alexa 488 (grün) und EphA3-Fc mit goat anti-human IgG Alexa Fluor 549 (magenta) gefärbt. Darstellung als Collage aus fluoreszenten Einzelbildern. Maßstabsbalken: 200µm.

Zusammenfassend ergab sich die Beobachtung, dass sowohl nasale als auch temporale Axonpopulationen in *uphill* Richtung des Dreiecksgradienten-Feldes nicht repulsiv auf das sehr dünne Ende der Dreiecke aus 30 μ g/ml EphA3 reagieren und diese während ihrer Projektion über das erste Drittel des Stempelfeldes übertreten. In *downhill* Richtung dagegen reagieren Axone der nasalen Population sehr viel früher und stärker repulsiv auf die breiten Enden der EphA3-Dreiecke, während temporale Axone diese zunächst überwachsen und erst später das EphA3-Fc vermeiden und sich in den Zwischenstreifen einfinden. Des Weiteren wurde in keinem der Experimente beobachtet, dass temporale oder nasale Axone an einer bestimmten Dreiecksbreite, bzw. einer bestimmten Proteinkonzentration, ihre Projektion stoppen. Im Gegenteil projizieren Axone, in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer, teilweise vollständig bis an das andere Ende des Gradientenfeldes, indem sie die Fläche ihrer Wachstumskegel entsprechend reduzieren (Abbildung 8).

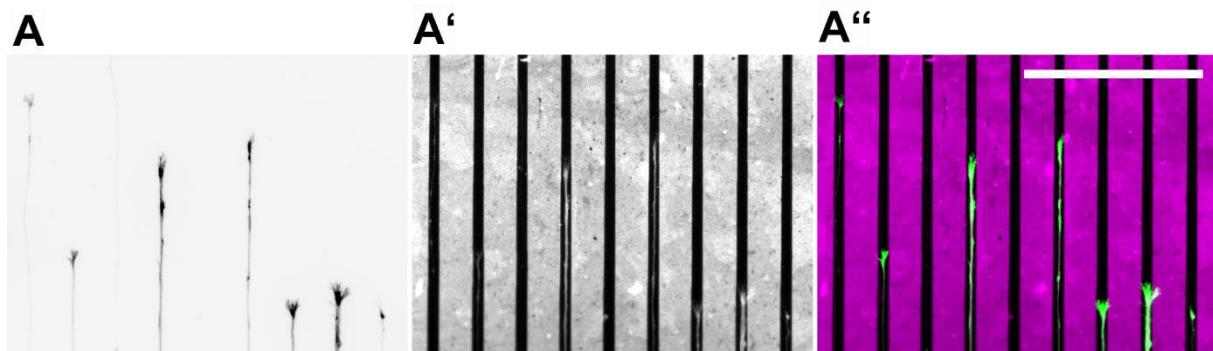


Abbildung 8: Retinale Axone stoppen nicht in Abhängigkeit der Breite von EphA3-Fc Dreiecken
 Vergrößerte Ansicht retinaler Axone in *uphill*-Richtung auf der Seite breiter EphA3-Dreiecke. Obwohl Axone repulsiv auf die Proteinstreifen reagieren, stoppen sie ihre Projektion nicht in Abhängigkeit der Dreiecksbreite. Stattdessen passen sich Wachstumskegel der Breite der Zwischenstreifen ohne Protein an. **A:** Axone temporaler Ganglienzellen in invertiertem Phalloidin Alexa 488 Signal. **B:** 30 μ g/ml EphA3-Fc gefärbt mit goat anti-human IgG Alexa Fluor 549. **C:** Überlagerung beider Kanäle, Axone in grüner Pseudofarbe, EphA3-Dreiecke in Pseudofarbe Magenta. Maßstabsbalken: 200 μ m.

Herstellung von EphA3/ephrin-A2-mFc Gegengradienten durch Überschichtung von ephrin-A2-mFc in saurem Puffer

Für die Herstellung von gegenläufigen *in vitro* Gegengradienten aus zwei Lenkungsproteinen wurde EphA3-Fc via *micro contact printing* auf epoxysilanisiertes Glas aufgestempelt und mit ephrin-A2-mFc in saurem Natrium-Aacetat Puffer (im Folgenden NaAc, pH4) überschichtet. Durch die in Abschnitt 4.1.1. gezeigte, reduzierte Bindungsaffinität soll eine gegenseitige Bindung und Maskierung beider Proteine verhindert werden, während diese dennoch kovalent an das Epoxysilan binden. 30 μ g/ml EphA3-Fc in PBS wurde auf die Dreiecksgradienten-Struktur eines entsprechenden PDMS-Stempels aufgetragen und auf epoxysilanisierte Deckgläser aufgestempelt. Anschließend wurde mit donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor 647 geclustertem ephrin-A2-mFc in NaAc darüber geschichtet, eine Stunde bei 37°C inkubiert und das gesamte Feld anschließend mit PBS gewaschen. Nach einem Blockierungsschritt mit 1%BSA in PBS, wurde EphA3-Fc mit 3 μ g/ml eines goat anti-human IgG Alexa Fluor 546 Antikörpers angefärbt.

In Abbildung 9 sind exemplarisch Ausschnitte von jeweils einem der Enden des Dreiecksgradienten dargestellt. Es ist hierbei gut zu erkennen, dass das aus saurer Lösung adsorbierte ephrin-mA2-Fc gut von den gestempelten EphA3-Fc Streifen unterscheidbar ist und sich die beiden Signale gut separieren lassen. Dies ist vor allem an Stellen zu beobachten, an welchen sich Lücken im Stempelmuster von EphA3-Fc ergeben und diese von ephrin-A2-mFc aufgefüllt werden. In saurer Lösung bei pH4 kommt es zu einer bereits in meiner Masterarbeit (Ruisi, 2019) beschriebenen Bildung größerer Cluster in der sauren Proteinlösung. Wie von der Idee eines Gegengradienten-Assays vorgesehen, entstehen in Arealen mit schmalen EphA3-Fc Dreiecksbreiten entsprechend breite ephrin-A2-mFc Dreiecksbreiten und *vice versa* (Abbildung 9 A und B). Es ist somit gelungen, längliche dreiecksförmige Gegengradienten-Substrate zweier hochaffiner Lenkungsmoleküle zu erzeugen, indem man ihre Bindungsaffinität zueinander temporär durch Applikation eines sauren Puffers reduziert hat.

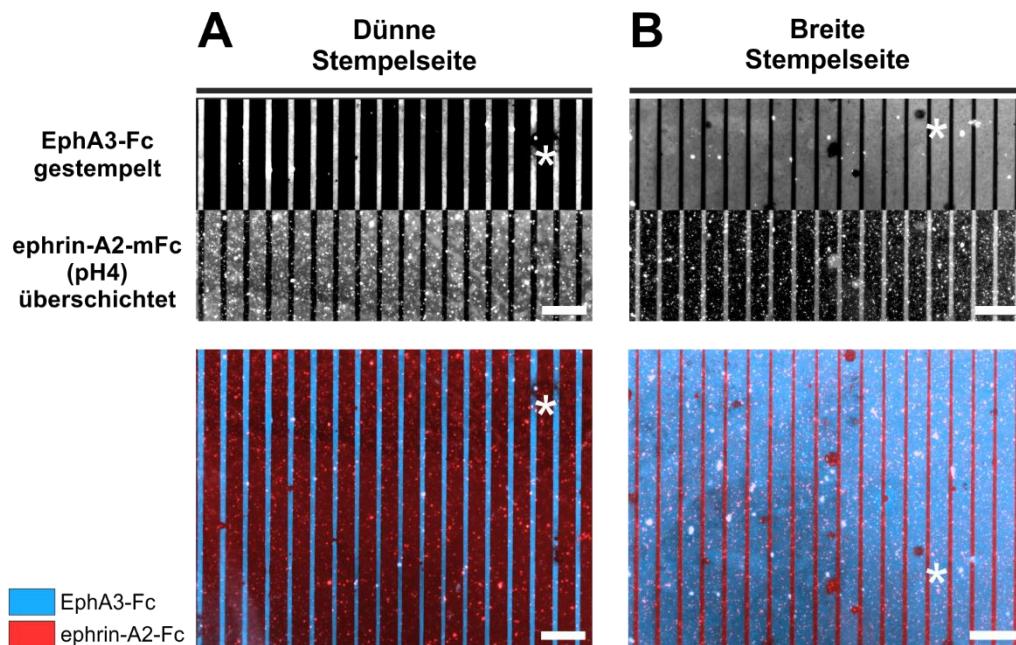


Abbildung 9: EphA3-/ephrin-A2-mFc (pH4) Gegengradienten-Assay

Dreiecksgradienten-Assay mit gestempeltem EphA3-Fc in PBS und überschichtetem ephrin-A2-mFc nach pH4 auf epoxysilanisiertem Glas. Beide Proteine sind sowohl auf der Seite der dünneren Dreieckseite (A) als auch auf der breiteren Dreieckseite (B) voneinander separiert, wobei die Fluoreszenzsignale des Musters gut voneinander unterscheidbar sind (Übersicht in unterer Reihe). EphA3-Fc mit goat anti-human AF 546 gefärbt (blaue Pseudofarbe), ephrin-A2-mFc geclustert mit donkey anti-mouse AF 647 (rote Pseudofarbe). Die Asterischen markieren markante Vergleichspunkte im Muster an. Maßstabsbalken 100µm.

4.2. Einfluss des Phosphat-Citrat Puffers (pH4) auf axonales Wachstum in Gegengradienten-Assays

Erste Versuche zur Herstellung von Dreiecksgradienten-Substraten sowie Gegengradienten-Substraten durch Aufstempeln von EphA-Fc und Überschichtung mit ephrin-A2-mFc aus saurer Lösung auf epoxysilanisiertem Glas, konnte in Abschnitt 4.1.2. erfolgreich durchgeführt werden. Als nächstes Kontrollexperiment sollte nun das Verhalten retinaler Axone in einem Dreiecksgradienten-Assay nach sauer aufgebrachtem ephrin-A2-mFc untersucht und

charakterisiert werden, um die Ergebnisse späterer Gegengradienten-Assays besser interpretieren zu können.

Dafür wurde zunächst humanes Fc-Fragment in PBS in äquimolaren Verhältnis zum danach verwendeten Lenkungsprotein mit einem PDMS-Stempel mit Dreiecksgradienten-Struktur auf epoxysilanisiertes Glas aufgestempelt und anschließend mit 16 μ g/ml geclustertem ephrin-A2-mFc in einem für *in vitro* Anwendungen geeigneten Phosphat-Citrat Puffer (pH4, nach McIlvaine) ohne weiteren Waschschritt für eine Stunde bei 37°C aus der Lösung heraus überschichtet. Das gesamte Muster wurde anschließend mehrmals gründlich mit HBSS gewaschen und so zurück in ein neutrales pH-Milieu überführt. Nach der Beschichtung mit 20 μ g/ml Laminin bei 37°C und Äquilibrierung in F12-Medium bei 37°C, wurden retinale Explantat-Streifen aus Hühnerembryonen präpariert und orthogonal zu den dreiecksförmigen Streifen gelegt, mit F12-MZ überschichtet und 24-48 Stunden bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

Das markante Ergebnis dieses Experiments ist das vollständig fehlende Auswachsen von Axonen retinaler Ganglienzellen, sobald ephrin-A2-mFc in saurem Phosphat-Citrat Puffer appliziert und durch gründliche Waschschritte mit HBSS zurück in ein neutrales Medium überführt wurde. In Abbildung 10 ist ein exemplarisches Beispiel für diese Beobachtung

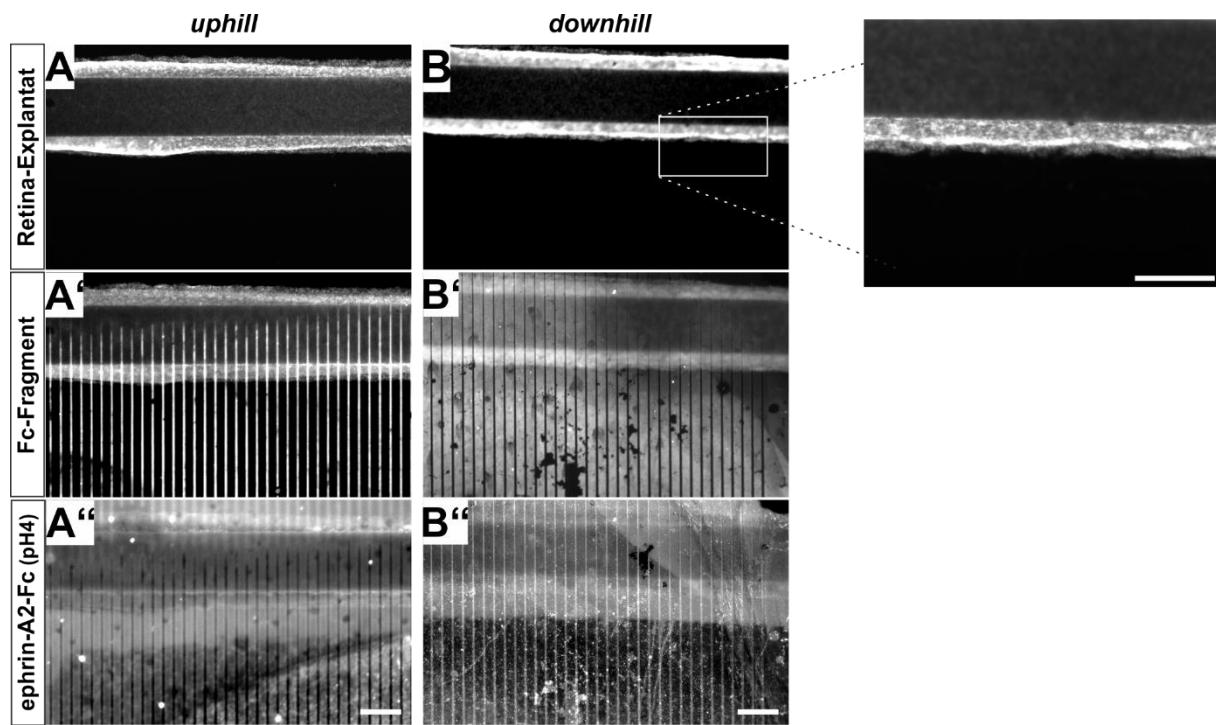


Abbildung 10: Einfluss von ephrin-A2-mFc in Phosphat-Citrat Puffer auf axonales Wachstum

Sowohl auf der *downhill*-Seite des Dreiecksgradienten mit dünnen Fc-Streifen (A') und breiten ephrin-A2-mFc Streifen (A'') als auch auf der *uphill*-Seite des Dreiecksgradienten mit breiten Fc-Streifen (B') und dünnen ephrin-A2-mFc Streifen (B'') wachsen keine Axone aus Retina-Explantaten, wenn ephrin-A2-mFc in saurem Phosphat-Citrat Puffer (pH4) appliziert wird (A und B). Maßstabsbalken 200 μ m. **Vergrößerung:** Das Retina-Gewebe zeigt eine untypisch scharfe Abgrenzung mit linienförmigen Strukturen an der Schnittkante des Gewebes. Fc-Fragment mit goat anti-human AF 549 gefärbt, ephrin-A2-mFc geclustert in pH4 mit donkey anti-human AF 647. Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin AF 488 markiert. Maßstabsbalken 100 μ m.

gezeigt. Hier erkennt man sowohl in Bereichen schmaler Fc-Streifen und breiter ephrin-A2-mFc Streifen (Abbildung 10 A-A“, *downhill*), als auch in Bereichen breiter Fc-Streifen und schmaler ephrin-A2-mFc Streifen (10 B-B“, *uphill*) das fehlende Auswachsen von Axonen. Ebenso markant ist hierbei das Fehlen der typischen, adhärenten Morphologie des retinalen Gewebes auf dem Laminin-Substrat (Vergleich Abbildung 6 und 7). Besonders auffallend dagegen sind linienartige Strukturen innerhalb des Gewebes an der Schnittkante der Explantate (siehe Vergrößerung, Abbildung 10). Das vollkommen fehlende Auswachsen von Neuriten nach Rückführung von ephrin-A2-mFc aus saurer in neutrale Lösung wurde in $N > 14$ unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens zwei Explantat-Streifen beobachtet und trat stets in Kombination mit den scharfen Abgrenzungen innerhalb des Explantat-Streifens auf.

4.2.1. Wiederherstellung des axonalen Wachstums nach Überschichtung mit saurer Lösung in Streifen-Assays

Im Folgenden wurde versucht, durch verschiedene Ansätze die Kulturbedingungen für Retina-Explantate auf sauer aufgebrachtem und in ein neutrales Milieu zurückgeföhrt ephrin-A2-mFc anzupassen und mögliche Auslöser für die vollkommen ausbleibende Projektion retinaler Axone zu ermitteln. Da die einzige veränderte Komponente zu herkömmlichen Entscheidungsassays die Verwendung eines Phosphat-Citrat Puffers anstelle von PBS war, stand hierbei vor allem die Suche nach einem alternativem Puffersystem mit niedrigem pH-Wert im Vordergrund.

Die verschiedenen Einflüsse von Vorinkubationen mit sauren Puffern auf die Kultivierung retinaler Axone wurde getestet, indem ein leichter zu handhabender Doppelstreifen-Assay mit 90 μ m Streifenbreite aus 30 μ g/ml gestempeltem EphA3-Fc auf epoxysilanisierten Deckgläsern und überschichtetem 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc in verschiedenen Puffersystemen hergestellt wurde. Zu diesen gehörte der bis hierhin verwendete Phosphat-Citrat Puffer (nach McIlvain, pH4), der Natrium-Aacetat Puffer der BLItz-Messreihen (NaAc, pH4), ein Kalium-Phosphatpuffer (pH4) sowie PBS als Positivkontrolle. Nach mehrmaligem Waschschritten mit HBSS und anschließender Beschichtung mit Laminin, wurden Retina-Explantate auf ihnen platziert. Nach einer Kultivierung von 24-48 Stunden bei 37°C wurde die Länge projizierender Axone, ungeachtet der Lenkungsentscheidungen, subjektiv eingeschätzt. Hierbei stellte sich heraus, dass die Bedingung mit dem bisher verwendeten Phosphat-Citrat Puffer die einzige war, in welcher ein Auswachsen von Axonen vollständig ausblieb. In einem direkten Vergleich stach insbesondere die Bedingung mit dem Natrium-Aacetat Puffer weit vor dem Kalium-Phosphat Puffer heraus. Die Länge projizierender Axone war hier vergleichbar mit der Positivkontrolle in PBS und gilt demnach als besonders geeignet für zukünftige Experimente mit ephrin-A2-Fc in saurer Lösung.

Als zusätzliche Modifikation der Kulturbedingungen wurden alle weiteren Streifenassays, die mit ephrin-A2-Fc aus saurem Natrium-Acetat Puffer überschichtet wurden, mit einer Mischung aus 10 μ g/ml Laminin (Laminin-111) und 8 μ g/ml Merosin (Laminin-211) in HBSS überschichtet. Merosin soll hierbei zusätzlich die Ausbildung von Neuriten unterstützen (Adnan et al., 2020; Goldberg et al., 2002; Marler et al., 2014).

Ein Auswachsen von Axonen aus retinalen Explantaten in Assays aus sauer überschichtetem ephrin-A2-mFc und anschließender Rückführung in ein neutrales pH-Milieu konnte schließlich vollständig wiederhergestellt werden (siehe Abschnitt 4.3.1). Dies war möglich durch:

- den Austausch des bisher verwendeten Phosphat-Citrat Puffers (pH4) durch einen Natrium-Acetat Puffer (pH4)
- die zusätzliche Verwendung von Merosin neben Laminin als permissives Wachstumssubstrat
- einer verlängerten Überschichtung des Substrates mit den ECM-Molekülen von mindestens zwei Stunden bei 37°C,
- eine verlängerte Kultivierung der Explantat-Kulturen von mindestens 48 bis maximal 72 Stunden bei 37°C mit zwischenzeitlicher Erneuerung des F12-Mediums.

4.3. Lenkungseigenschaften von ephrin-A2-Fc und EphA3-Fc auf Epoxysilan

4.3.1. Repulsion durch ephrin-A2-Fc nach adsorptiver Immobilisierung in PBS bzw. pH4 auf epoxysilanisiertem Glas

Nachdem die axonale Projektion auf sauer überschichtetem und in ein neutrales pH-Milieu zurück geführtem ephrin-A2-mFc wiederhergestellt werden konnte, sollten die biologische Funktionalität und repulsiven Eigenschaften von ephrin-A2-Fc auf epoxysilanisierten Deckgläsern nach adsorptiver Applikation in PBS bzw. einem Natrium-Acetat Puffer (pH4, im folgenden NaAc) weiter untersucht werden. Hierfür wurden Einzelstreifen-Assays mit 90 μ m Streifenbreite verwendet, da die entsprechenden PDMS-Matrizen eine vergleichsweise einfache Handhabung und eine effiziente Einschätzung von axonalen Lenkungsentscheidungen ermöglichen.

Konzentrationsreihen von ephrin-A2-Fc in PBS auf epoxysilanisiertem Glas

Um die Repulsivität von ephrin-A2-Fc in NaAc (pH4) auf epoxysilanisiertem Glas mit einer Immobilisierung in physiologischen Bedingungen (pH 7.4) zu vergleichen, wurden für eine Positivkontrolle zunächst Einzelstreifen-Assays mit einer Konzentrationsreihe aus 16, 12, 8 und 4 μ g/ml geclustertem ephrin-A2-Fc in PBS hergestellt. Für jede Konzentrationsbedingung wurde zunächst äquimolar humanes Fc-Fragment auf epoxysilanisiertes Glas gestempelt und die Zwischenräume über die Mikrokanäle der Silikonmatrize mit den jeweiligen ephrin-A2-Fc Konzentrationen befüllt. Nach der

Beschichtung des Musters mit 20 μ g/ml Laminin erfolgte die Kultivierung temporaler Retina-Explantate und die Auswertung deren Lenkungsverhaltens.

Axone der temporalen Retina zeigen eine sehr deutliche Repulsion gegenüber 16 μ g/ml ephrin-A2-Fc. Nur 16.8% der Axone befinden sich nach der Kultivierung auf den ephrin-Streifen, was im Umkehrschluss 83.2% der Axone ausmacht, die ephrin-A2-Fc vermeiden und Fc-Streifen bevorzugen (Abbildung 11 A und B).

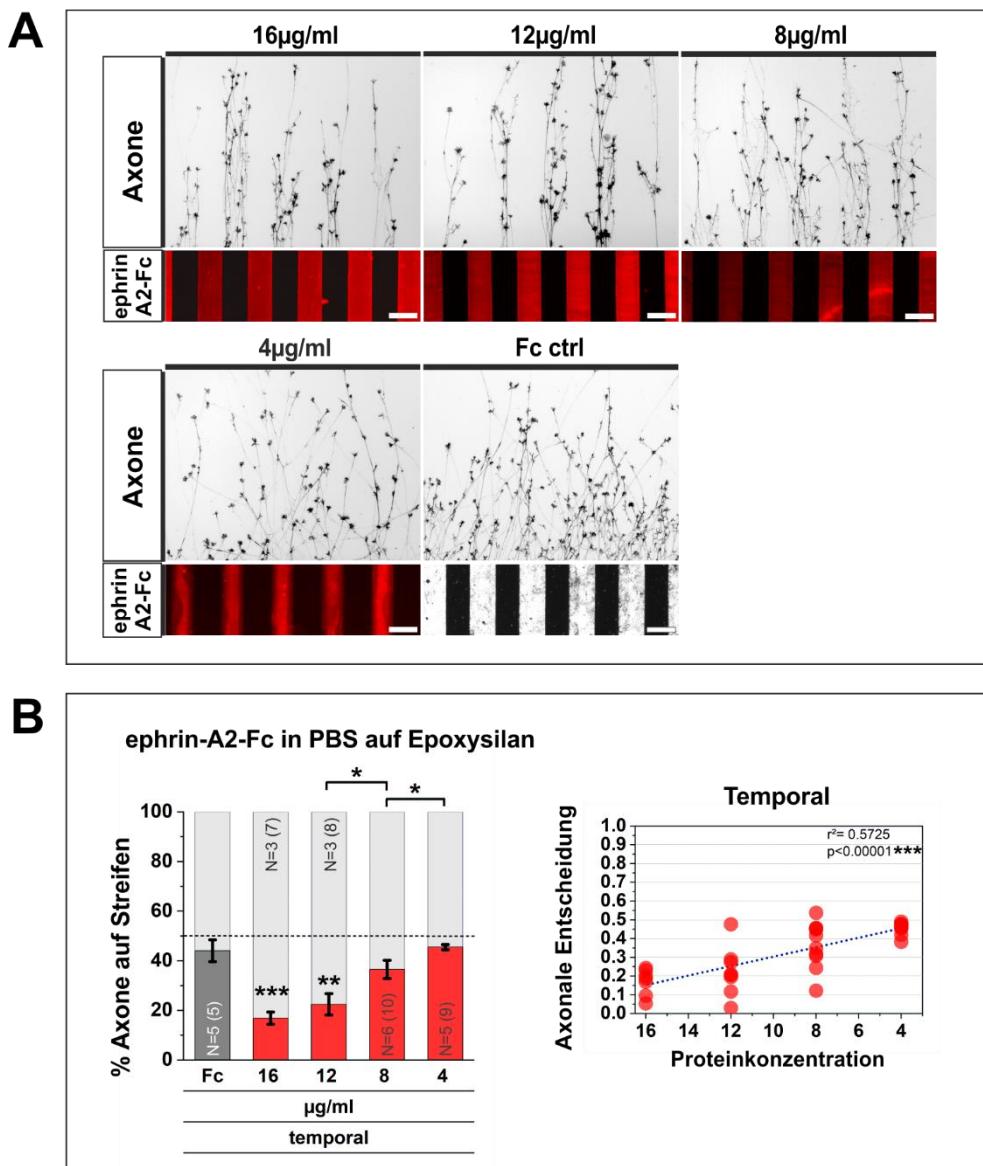


Abbildung 11: Temporale Axone auf ephrin-A2-Fc Streifenassays in PBS auf epoxySilanisiertem Glas

A: temporale Axone reagieren repulsiv auf 16 und 12 μ g/ml ephrin-A2-Fc in PBS. Die Repulsion nimmt bei 8 μ g/ml ab und ist bei 4 μ g/ml sowie der Fc-Kontrolle nicht mehr zu beobachten. Ephrin-A2-Fc mit donkey anti-mouse AF647 geclustert (rote Pseudofarbe), Fc-Kontrolle mit goat anti-human AF 546 gefärbt (weiße Pseudofarbe), Axone in invertiertem Fluoreszenzsignal der Phalloidin AF488 Färbung. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt. **B:** (Links) Quantifizierung der repulsiven Reaktion von Axonen auf ephrin-A2-Fc Konzentrationen als Mittelwert der Prozentverteilung von Axonen, die sich auf Proteinstreifen befinden: 16 μ g/ml: 16.8%, 12 μ g/ml: 22.4%, 8 μ g/ml: 36.5%, 4 μ g/ml: 45.4%, Fc-Kontrolle: 44%. Die gestrichelte Linie zeigt die 50%-Grenze an. (Rechts) Korrelation der axonalen Entscheidung mit der Proteinkonzentration zeigt mit $p=0.00001$ eine starke Korrelation. p -Wert ermittelt aus Pearson-Korrelationskoeffizient r mit einem Signifikanzniveau von 0.05. N = unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, n.s.: nicht signifikant. Maßstabsbalken 100 μ m.

Dieses Ergebnis unterscheidet sich statistisch stark signifikant von den 44% der Axone, die sich auf den Fc-Kontrollen befinden ($p=0.0003$). 12 μ g/ml ephrin-A2-Fc werden von 77.6% der Axone vermieden, was sich ebenso signifikant von der Fc-Kontrolle unterscheidet ($p= 0.01$). Auf 8 μ g/ml reagieren 63.5% und auf 4 μ g/ml ephrin-A2-Fc 54.6% der Axone mit repulsivem Verhalten und unterscheiden sich damit nicht mehr von der Fc-Kontrolle ($p>0.05$, Abbildung 11 A und B). Signifikante Unterschiede der Repulsivität lassen sich jedoch noch zwischen 12 und 8 μ g/ml ($p= 0.03$), sowie zwischen 8 und 4 μ g/ml ($p= 0.04$) beobachten. Mit einer Reduktion der Proteinkonzentration lässt sich somit eine signifikante und gradiente Abnahme der Repulsion temporaler Axone beobachten. Überprüft man die Korrelation der prozentualen Anteile von Axonen auf den Proteinstreifen mit der jeweiligen Proteinkonzentration, erhält man einen r^2 -Score von 0.572 und damit eine stark signifikante Korrelation ($p<0.00001$, Abbildung 11 B). Die biologische Aktivität und gradiente Repulsion von adsorbiertem ephrin-A2-Fc in PBS auf epoxysilanisiertem Glas ist somit bestätigt.

Ephrin-A2-mFc Konzentrationsreihen nach adsorptiver Applikation in NaAc (pH4) auf epoxysilaniertem Glas

Auf die gleiche Weise wurden solche Konzentrationsreihen mit geclustertem ephrin-A2-mFc in NaAc-Puffer (pH4) durchgeführt und mit temporalen sowie nasalen Explantaten aus der Retina getestet. Hierfür wurde erneut äquimolar humanes Fc-Fragment auf epoxysilanisiertes Glas gestempelt und die Zwischenräume durch Überschichtung mit der jeweiligen Proteinkonzentration in saurem Puffer aufgefüllt. Nach Rückführung des sauer applizierten ephrin-A2-mFc in ein neutrales Milieu, folgte eine mindestens zweistündige Beschichtung mit 10 μ g/ml Laminin und 8 μ g/ml Merosin, bevor nasale sowie temporale Retina-Explantate für 48 Stunden kultiviert wurden. Die Auswertung dieser Streifenassays ist in Abbildung 12 dargestellt.

In Streifenassays mit 12 μ g/ml ephrin-A2-mFc befinden sich 12.7% temporaler Axone auf Streifen mit ephrin-A2-mFc, was einen Anteil von 87.3% temporaler Axone ausmacht, die sich gegen die ephrin-A2-Streifen entscheiden und stattdessen auf den Fc-Streifen wachsen (Abbildung 12 A und B). Daneben reagieren 89.4% temporaler Axone repulsiv auf 12 μ g/ml und 87.7% auf 8 μ g/ml ephrin-A2-mFc Streifen und unterscheiden sich damit statistisch stark signifikant von der Fc-Kontrolle (Abbildung 12 B, p -Wert jeweils <0.000001). Auf 4 μ g/ml ephrin-A2-mFc reagieren 51.5% und auf 2 μ g/ml 50% temporaler Axone repulsiv, was nicht mehr statistisch signifikant von der Reaktion auf die Fc-Kontrolle unterscheidbar ist (Abbildung 12 A und B). Ein Test der Korrelation zwischen der ephrin-A2-mFc Konzentration und axonaler Entscheidung ergab für die temporale Population mit einem r^2 -Wert von 0.648 eine starke Signifikanz ($p< 0.0000$, Abbildung 12 B).

Für die nasale Population der RGC ergibt sich eine Repulsion von 71.3% der Axone auf 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc, was sich signifikant von den 58% der Axone in der Fc-Kontrolle

unterscheidet ($p=0.00005$, siehe Abschnitt 12 A und B). Während sich 64.1% der nasalen Axone gegen 12 μ g/ml ephrin-A2-mFc entschieden (n.s.), ist die Reaktion von 67.6% der Axone gegen 8 μ g/ml des Proteins erneut signifikant unterschiedlich zu der Fc-Kontrolle ($p= 0.004$, Abbildung 10 B).

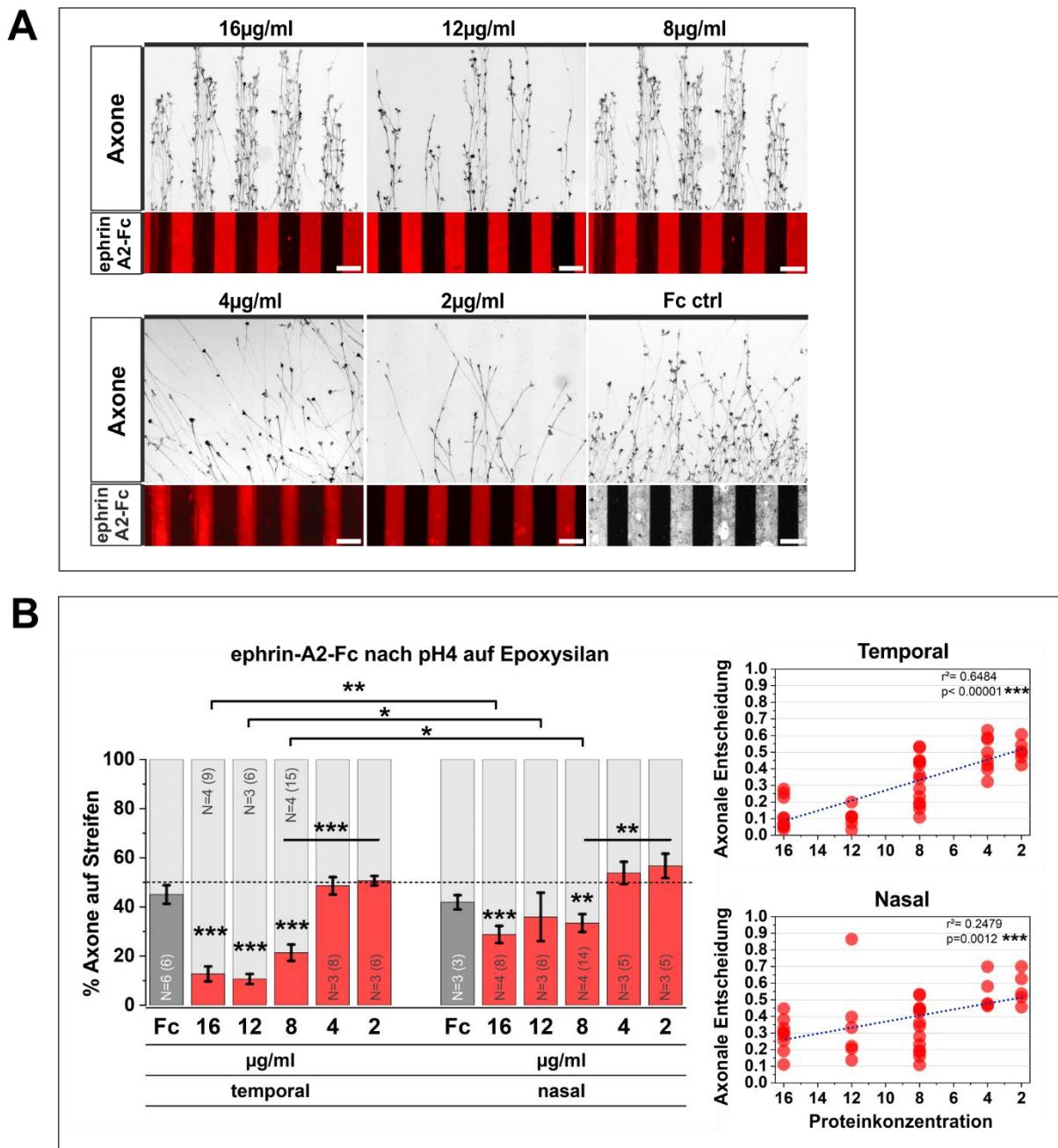


Abbildung 12: Retinale Axone auf ephrin-A2-mFc Streifenassays nach pH4 auf epoxysilanisiertem Glas

A: Temporale Axone vermeiden 16, 12 und 8 μ g/ml ephrin-A2-mFc nach Rückführung aus saurem Milieu. Eine Repulsion ist bei 4 und 2 μ g/ml nicht mehr zu beobachten. ephrin-A2-mFc glckt mit donkey anti-mouse AF647 (rote Pseudofarbe), Fc-Kontrolle gefärbt mit goat anti-human AF 546 (weiße Pseudofarbe), Axone in invertiertem Fluoreszenzsignal der Phalloidin AF488 Färbung. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt.

B: (Links) Quantifizierung der repulsiven Reaktion von Axonen auf ephrin-A2m-Fc als Mittelwert der Prozentverteilung von Axonen auf Proteinstreifen: für temporale Axone 16 μ g/ml: 12.7%, 12 μ g/ml: 10.6%, 8 μ g/ml: 21.3%, 4 μ g/ml: 48.5%, 2 μ g/ml: 50%, Fc-Kontrolle: 45%. Für nasale Axone 16 μ g/ml: 28.7%, 12 μ g/ml: 35.9%, 8 μ g/ml: 33.4%, 4 μ g/ml: 53.8%, 2 μ g/ml: 56.6%, Fc-Kontrolle: 42%. Gestrichelte Linie zeigt die 50%-Grenze an. (Rechts) Korrelation der axonalen Entscheidung mit der Proteinkonzentration zeigt für temporale Axone $p=0.00001$ und nasale Axone $p=0.0012$ eine stark signifikante Korrelation. p -Wert ermittelt aus Pearson-Korrelationskoeffizient r^2 mit einem Signifikanzniveau von 0.05. N= unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Maßstabsbalken 100 μ m.

Auf 4 bzw. 2 µg/ml ephrin-A2-mFc reagieren noch 46.2% bzw. 43.4% der nasalen Axone repulsiv, was sich signifikant von der Reaktion auf 8µg/ml und 16µg/ml unterscheidet ($p= 0.009$ bzw. 0.003 und $p= 0.001$ bzw. 0.008), jedoch nicht mehr zur Fc- Kontrolle (Abbildung 12 B). Insgesamt würde man hierbei sogar von einer attraktiven Entscheidung der Axone für das Protein sprechen. Mit einem r^2 -Wert von 0.247 korrelieren die repulsiven Entscheidungen nasaler Axone stark signifikant mit den jeweiligen ephrin-A2-mFc Konzentrationen der Streifen (Abbildung 12 B). Damit konnte bestätigt werden, dass ephrin-A2-mFc seine biologische Aktivität und repulsive Lenkungseigenschaft nicht verliert, wenn dieses in saurem NaAc-Puffer auf epoxysilanisiertes Glas aufgebracht und anschließend in ein neutrales Milieu zurückgeführt wird. Es konnte außerdem mit abnehmender Proteinkonzentration ein graduell reduziert repulsives Verhalten temporaler Axone beobachtet werden, welches sich besonders in den hohen Konzentrationsbedingungen von repulsiven Reaktionen nasaler Axone unterscheidet (16µg/ml, $p= 0.005$ bzw. 12µg/ml, $p= 0.04$; Vergleich temporal und nasal in Abbildung 12 B) und auf eine erwartungsgemäß topographisch differentielle Sensitivität nasaler und temporaler Axone auf ephrin-A2-mFc schließen lässt.

4.3.2. EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas

Das Entscheidungsverhalten nasaler und temporaler Axone wurde sodann in Doppelstreifen-Assays aus EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc aus saurer Überschichtung weiter untersucht. Gemäß ihrer eigenen molekularen Identität wurde hierbei erwartet, dass temporale Axone aufgrund ihrer erhöhten EphA Expression repulsiver auf ephrin-A2-mFc reagieren, während nasale Axone aufgrund ihrer erhöhten ephrin-A Expression repulsiver auf EphA-Fc reagieren. Diese erwartete Reaktion der beiden Retina-Populationen auf das respektive Lenkungsmolekül, wird als binär topographisch korrekt und nicht mehr nur als topographisch differenziell bezeichnet.

Aufgrund der einfacheren Handhabung und spätere Quantifizierung der Assays wurden hierfür statt der Dreiecksgradienten, Silikon-Matrizen mit 90µm Streifenbreite verwendet und 30µg/ml EphA3-Fc in PBS auf epoxysilanisiertes Glas aufgestempelt. Das gestempelte Proteinmuster wurde mit 16µg/ml geclustertem ephrin-A2-mFc in NaAc (pH4) überschichtet. Nach einer Überschichtung des Assays mit 10µg/ml Laminin und 8µg/ml Merosin für mindestens zwei Stunden bei 37°C, wurden nasale und temporale Explantat-Streifen ca. 48 Stunden auf dem Doppelstreifen-Substraten kultiviert. Die Auswertung dieser Experimente in Abbildung 13 zeigt, dass sich 55.3% der temporalen Axone auf EphA3-Fc und 44.7% der temporalen Axone auf ephrin-A2-mFc Streifen befindet (Abbildung 13 A und B). Es lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied einer Entscheidung gegen eines der beiden Proteine feststellen. 60% der nasalen Axone vermeiden ephrin-A2-mFc und wachsen signifikant gehäuft auf EphA3-Fc Streifen (Abbildung 13 A und B). Die verstärkte Repulsion nasaler Axone durch ephrin-A2 ist

hierbei signifikant höher, als die durch EphA3-Fc ($p<0.00001$, Abbildung 13 B). Während für temporale Axone keine eindeutige Entscheidung gegen eines der beiden Lenkungsmoleküle beobachtbar ist fällt die Entscheidung nasaler Axone eindeutig zugunsten von EphA3- statt ephrin-A2-mFc aus. Sie werden also entgegen der Erwartung von ephrin-A2-mFc mehr abgestoßen als von EphA3-Fc. Allerdings ist der Unterschied zu temporalen Axonen nicht signifikant.

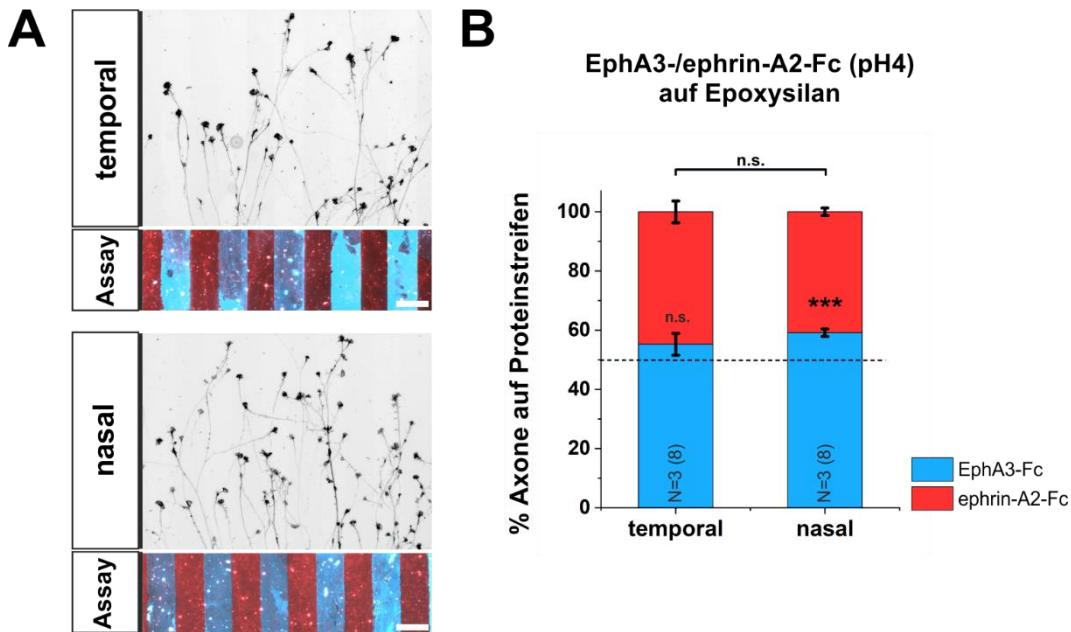


Abbildung 13: Retina-Explantate auf EphA3-ephrin-A2-mFc (pH4) Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas

A: Temporale (oben) und nasale Axone (unten) zeigen in den Doppelstreifen-Assays keine topographisch richtige Reaktion auf das gestempelte EphA3-Fc oder das sauer überschichtete ephrin-A2-mFc. EphA3-Fc mit goat anti-human AF546 gefärbt (blaue Pseudofarbe), ephrin-A2-mFc in pH4 mit donkey anti-mouse AF647 geclustert (rote Pseudofarbe), Axone in invertiertem Phalloidin AF488 Fluoreszenzsignal. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt. **B:** Quantifizierung der axonalen Entscheidung im Doppelstreifen-Assay auf epoxysilanisiertem Glas, basierend auf der Mittelwertverteilung der Axone auf den jeweiligen Proteinstreifen. Temporale Axone befinden sich zu 55.3% auf EphA3-Fc und zu 44.7% auf ephrin-A2-mFc, nasale Axone befinden sich zu 59% auf EphA3-Fc und zu 41% auf ephrin-A2-Fc. Gestrichelte Linie zeigt 50%-Grenze an. N= unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit: ***: $p<0.001$, n.s.: nicht signifikant. Maßstabsbalken 100µm.

Eine binär topographisch korrekte Entscheidung wie bei Gebhardt (2009) konnte hier somit nicht reproduziert werden. Die verstärkte Repulsion beider Axonpopulationen durch ephrin-A2-mFc statt EphA3-Fc, lässt eine verminderte Aktivität von EphA3-Fc in diesem experimentellen Aufbau vermuten.

4.3.3. Repulsion durch EphA3-Fc nach Immobilisierung auf epoxysilanisiertem Glas

Aufgrund der scheinbar verminderten biologischen Aktivität von EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas wurden die Lenkungseigenschaften von EphA3-Fc, ähnlich wie in Abschnitt 4.3.1. in Einzelstreifen-Assays mit verschiedenen Proteinkonzentrationen isoliert überprüft. Hierfür wurde eine Konzentrationsreihe von jeweils 30, 20, 15 und 5 µg/ml EphA3-Fc in PBS erstellt und über Silikon-Matrizen mit 90 µm Streifenbreite auf

epoxysilanisierte Deckgläser gestempelt. Um die Gesamt molekülzahl in jeder der Bedingungen konstant zu halten, wurde jeweils Fc-Fragment bis zur Äquimolarität mit der höchsten Konzentration von EphA3-Fc zugemischt.

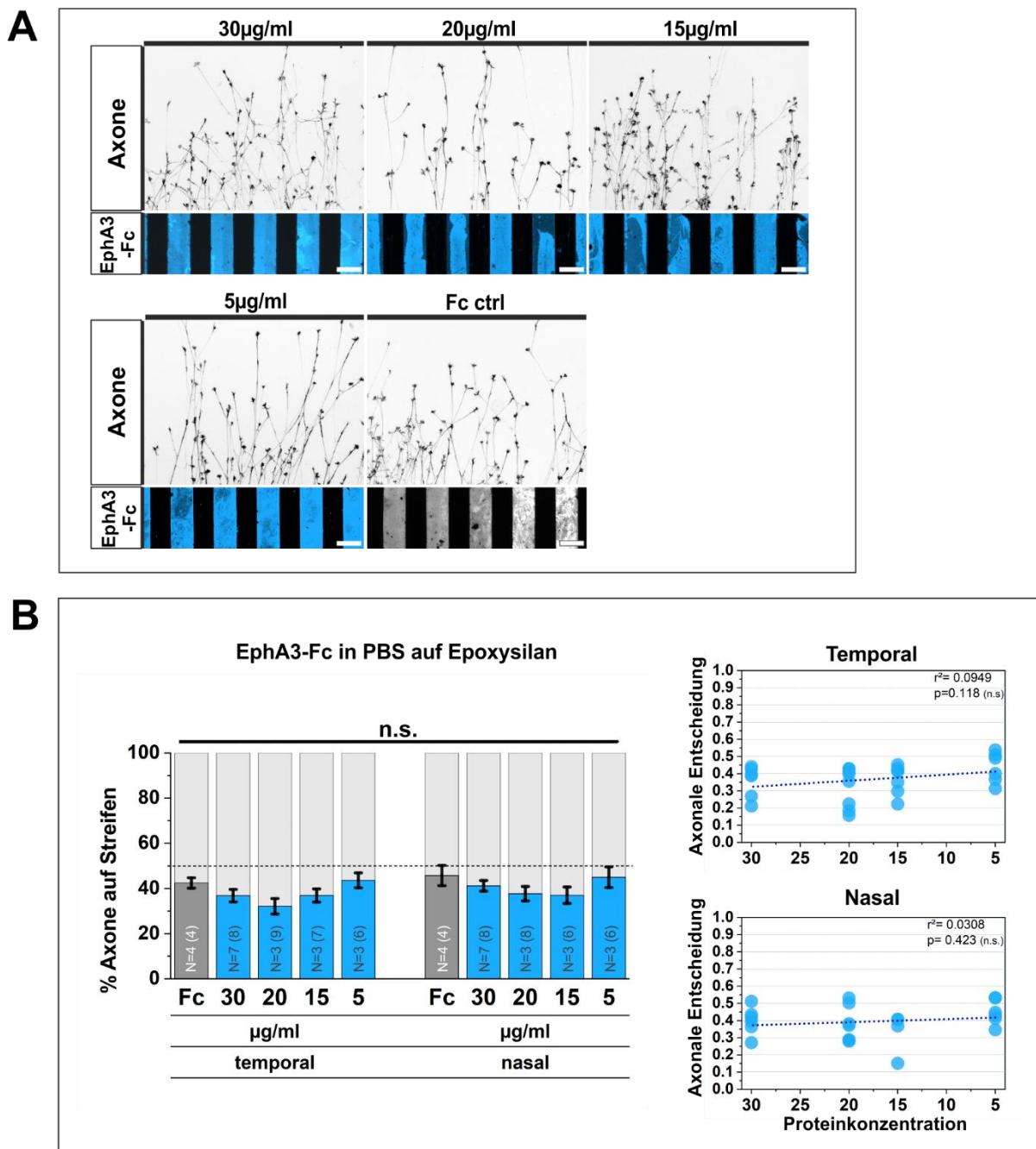


Abbildung 14: Retinale Axone auf EphA3-Fc Streifenassays in PBS auf epoxysilanisiertem Glas

A: Nasale Axone zeigen insgesamt keine repulsive Reaktion auf gestempeltes EphA3-Fc in den verschiedenen Konzentrationen, obwohl eine leichte Repulsion bei 20 $\mu\text{g/ml}$ erkennbar ist. Die extrazelluläre Domäne von EphA3-Fc mit einem rabbit Primär- und goat anti-rabbit Cy3 Sekundärantikörper gefärbt (blaue Pseudofarbe), Fc-Kontrolle mit goat anti-human AF 546 gefärbt (weiße Pseudofarbe), Axone in invertiertem Fluoreszenzsignal der Phalloidin AF488 Färbung. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt **B:** (Links) Quantifizierung der repulsiven Reaktion der Axone auf EphA3-Fc in verschiedenen Konzentrationen basierend auf der Mittelwertverteilung der Axone auf EphA3-Fc. Für temporale Axone 30 $\mu\text{g/ml}$: 36%, 20 $\mu\text{g/ml}$: 32%, 15 $\mu\text{g/ml}$: 36%, 5 $\mu\text{g/ml}$: 43%, Fc-Kontrolle: 42%. Für nasale Axone 30 $\mu\text{g/ml}$: 41%, 20 $\mu\text{g/ml}$: 37%, 15 $\mu\text{g/ml}$: 37%, 5 $\mu\text{g/ml}$: 44%, Fc-Kontrolle: 45%. Gestrichelte Linie zeigt 50%-Grenze an. (Rechts) Korrelation der axonalen Entscheidung mit der Proteinkonzentration zeigt mit $p=0.118$ für temporale und mit $p=0.423$ für nasale Axone keine signifikante Korrelation. p -Wert ermittelt aus Pearson-Korrelationskoeffizient r mit einem Signifikanzniveau von 0.05. N = unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit: n.s.: nicht signifikant. Maßstabsbalken 100 μm .

Die Zwischenstreifen des aufgestempeltem Musters wurden ebenso äquimolar mit Fc-Fragment durch Adsorption aus den Mikrokanälen aufgefüllt. Der gesamte Proteinteppich wurde mit 20 μ g/ml Laminin beschichtet und nasale sowie temporale Retina-Explantate 24 Stunden auf den Streifenassays kultiviert. Um das EphA3-Fc nach der Fixierung von dem verwendeten Fc-Fragment zu unterscheiden, wurde die extrazelluläre Domäne von EphA3-Fc mit einem rabbit anti-EphA3 Primär- und einem goat anti-rabbit Cy3 Sekundärantikörper gefärbt.

In diesem Streifenassay reagieren 64% der temporalen Axone repulsiv und meiden Streifen aus 30 μ g/ml EphA3-Fc (Abbildung 14 A und B). Dieses Ergebnis ist nicht signifikant unterschiedlich zu dem Ergebnis der Fc-Kontrolle (58%, $p=0.25$). Ebenso reagieren auf 20, 15 und 5 μ g/ml EphA3-Fc jeweils 68%, 64% bzw. 57% der temporalen Axone nicht signifikant repulsiv auf das Protein ($p>0.05$). Auch wenn bei der mikroskopischen Betrachtung der Explantate eine leichte Repulsion gegen die EphA3-Fc Streifen vermutet werden könnte (Abbildung 14 A), lässt sich diese nicht quantitativ erfassen (Abbildung 14 B). Eine ähnliche Beobachtung konnte ebenso für nasale Axone gemacht werden: hier vermeiden 59% der Axone die EphA3-Fc Streifen mit der höchsten Konzentration von 30 μ g/ml, was jedoch nicht signifikant gegenüber der Fc-Kontrolle ist (55%, $p=0.4$, Abbildung 14 A und B). Auch für die Konzentrationen von 20, 15 und 5 μ g/ml EphA3-Fc konnte mit jeweils 63%, 63% bzw. 56% keine eindeutige Repulsion gegen das Protein festgestellt werden ($p>0.05$, Abbildung 14 B). Somit ergibt sich keine Reaktion temporaler und nasaler Axone auf eine der EphA3-Fc Konzentrationen. Bei der Betrachtung der Korrelation von axonaler Lenkungsentscheidung und Proteinkonzentration, ergab sich mit einem r^2 -Wert von 0.0949 für temporale und mit einem r^2 -Score von 0.0308 für nasale Axone in beiden Fällen keine signifikante Korrelation (Abbildung 14 B).

Demnach konnte für gestempeltes EphA3-Fc auf epoxysilanisierten Deckgläsern bei keiner der Konzentrationsbedingungen eine signifikante Repulsion auf temporale oder nasale Axone beobachtet werden. Damit erhärtete sich der Verdacht, dass EphA3-Fc auf epoxysilanisierten Deckgläsern mindestens partiell inaktiviert zu sein scheint, sodass die biologische Aktivität in dem hier verwendeten experimentellen Ansatz nicht für einen repulsiven Effekt auf Wachstumskegel ausreicht.

4.4. Hitze-Inaktivierung zeigt eine Restaktivität von EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas

Die Denaturierung bzw. Konformationsänderungen eines Proteins führen zum Verlust seiner biologischen Funktionalität. Konformationsänderungen von Proteinen sind z.B. auch bei der Bindung an ein Substrat oder eine Oberfläche möglich (Latour, 2020). Im Fall von Streifenassays mit aufgestempeltem EphA3-Fc, bindet das Protein zunächst aus der Lösung an die Silikon-Matrix und wird anschließend von dort auf eine weitere Oberfläche via *micro contact printing* übertragen. Dies schafft somit insgesamt zwei potenzielle Möglichkeiten der Konformationsänderung (Butler, 2000). Dadurch ergibt sich die Vermutung, dass der fehlende bzw. nicht ausreichend repulsive Effekt von EphA3-Fc auf epoxysilanisierten Deckgläsern durch Inaktivierung bzw. Denaturierung an der Oberfläche verursacht sein könnte. Bemerkenswerterweise war jedoch schon sehr früh beobachtet worden, dass auch denaturierte Proteine einen repulsiven Einfluss auf retinale Axone haben können (Walter et al., 1987). Deshalb wurde überprüft, ob mit anderen Mitteln denaturiertes EphA3-Fc tatsächlich inaktiv in Bezug auf axonale Lenkung ist und sich die Vermutung als haltbar erweist.

Ob eine mögliche Denaturierung von EphA3-Fc an der epoxysilanisierte Oberfläche die in Abschnitt 4.3.3 beobachtete fehlende Repulsion auslöst oder EphA3-Fc hier aus anderen Gründen inaktiv ist, wurde durch eine Inaktivierung bzw. Denaturierung durch Hitze überprüft. Dafür, wurde 30 μ g/ml EphA3-Fc für 5 min bei 98°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und über Silikon-Matrizen mit 90 μ m Streifenbreite auf epoxysilanisiertes Glas aufgestempelt. Auf ein äquimolares Auffüllen der Zwischenstreifen mit Fc-Fragment wurde hierbei verzichtet und der Proteinteppich mit 20 μ g/ml Laminin überschichtet.

Erstaunlicherweise konnte so tatsächlich in einer Positivkontrolle mit nativem EphA3-Fc ein repulsives Verhalten von 77% sowohl temporaler als auch nasaler Axone beobachtet werden (Abbildung 15 A und B). Dieses repulsive Verhalten wurde durch Erhitzung von EphA3-Fc aufgehoben: so vermeiden temporale Axone nur noch zu 56% und nasale zu 58% die Streifen mit denaturiertem EphA3-Fc und unterschieden sich damit signifikant von der Positivkontrolle (temporal: p= 0.0008; nasal: p= 0.01, Abbildung 15 A und B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass denaturiertes EphA3-Fc tatsächlich inert in Bezug auf seine Lenkungseigenschaften ist. Dies ist kompatibel mit der Interpretation, dass der oben beobachtete Verlust an Lenkungsvermögen auf epoxysilanisiertem Glas gegenüber Fc auf Denaturierung an der aktvierten Oberfläche zurückzuführen ist. Allerdings zeigen sie auch dass diese Denaturierung nicht vollständig ist, da gegenüber Laminin wird eine Restaktivität sichtbar ist.

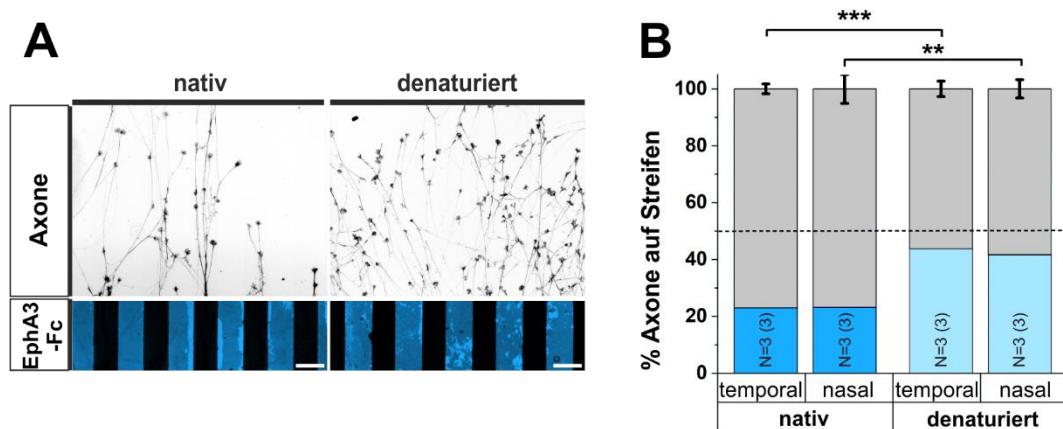


Abbildung 15: Fehlende repulsive Reaktion retinaler Axone auf EphA3-Fc nach Denaturierung

A: (links) Axone zeigen eine repulsive Reaktion auf 30 μ g/ml EphA3-Fc. (rechts) Dieser Effekt geht verloren, wenn EphA3-Fc durch Hitze inaktiviert wird. EphA3-Fc mit goat anti-human AF546 gefärbt (blaue Pseudofarbe), Axone in invertiertem Phalloidin AF488 Fluoreszenzsignal. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt
B: Quantifizierung der repulsiven Entscheidung gegen natives oder hitze-inaktiviertes EphA3-Fc Einzelstreifen-Assays. Angegeben ist der Mittelwert der Prozentverteilung von Axonen, die sich auf Proteinstreifen befinden. 23% temporale Axone und 23% nasale Axone auf nativem EphA3-Fc (blau). Im Vergleich dazu 43.7% temporaler Axone und 41.6% nasaler Axone auf hitze-inaktiviertem EphA3-Fc (hellblau). Gestrichelte Linie zeigt 50%-Grenze an. N= unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit: **: p<0.01, ***: p<0.001. Maßstabsbalken 100 μ m.

4.5. Lenkungseigenschaften von ephrin-A2-mFc und EphA3-Fc auf Epoxysilan mit Poly-L-Lysin (PLL) und Disuccinimidylcarbonat (DSC)

4.5.1. EphA3/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC-Linker

Während in ephrin-A2-mFc Streifenassays eine topographische differenzielle Repulsion zwischen temporalen und nasalen Axonen beobachtet werden konnte, ließ sich ein entsprechendes Ergebnis für EphA3-FC Streifenassays nicht einstellen. Es wurde vermutet, dass die epoxysilanisierte Oberfläche zu einer Denaturierung durch Ausbildung multipler Bindungen zwischen dem Epoxysilan und EphA3-Fc führen könnte. Um eine kovalente Bindung aufrecht zu erhalten und eine Entfaltung des Proteins zu vermeiden bzw. den Abstand zur Oberfläche zu vergrößern, wurde nun PLL als Unterlage und Disuccinimidylcarbonat (im Folgenden DSC genannt), das mit den Aminogruppen des PLL und der Proteine reagiert, als Linker verwendet.

Um die Lenkungseigenschaften von EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc auf epoxysilanisiertem Glas mit Poly-L-Lysin und DSC-Linker *in vitro* zu überprüfen, wurden Doppelstreifen-Assays mit Retina-Explantaten durchgeführt. Dafür wurden epoxysilanisierte Deckgläser mit 200 μ g/ml Poly-L-Lysin (PLL) in PBS und anschließend mit 150mM des Linkers Disuccinimidylcarbonat (DSC) in DMF beschichtet. Für den Doppelstreifen-Assay wurde 30 μ g/ml EphA3-Fc mit einer Silikon-Matrize mit 90 μ m Streifenbreite auf die beschichteten Deckgläser aufgestempelt und die Zwischenstreifen durch Überschichtung mit 16 μ g/ml geclustertem ephrin-A2-mFc in NaAc

(pH4) aufgefüllt. Nach Rückführung in ein neutrales pH-Milieu durch HBSS, wurde das Muster mindestens zwei Stunden bei 37°C mit 10 μ g/ml Laminin und 8 μ g/ml Merosin in HBSS überschichtet und nasale sowie temporale Explantat-Streifen für 48 Stunden auf ihnen kultiviert.

Die Ergebnisse dieses Doppelstreifen-Assays sind in Abbildung 16 dargestellt. Hierbei ergab sich, dass jeweils sowohl 71% temporale als auch nasale Axone die Streifen mit EphA3-Fc vermeiden und sich demnach zu großem Teil auf ephrin-A2-mFc Streifen befinden (Abbildung 16 A). Diese axonale Verteilung zwischen EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc ist für beide Populationen stark signifikant ($p>0.000001$). Aufgrund ihrer erhöhten EphA-Expression temporaler RGC wäre zu erwarten, dass diese repulsiver auf ephrin-A2-mFc reagieren und es stattdessen bevorzugen auf EphA3-Fc zu wachsen. In diesem Experiment vermeiden jedoch beide Populationen EphA3, was vermuten lässt, dass gestempeltes EphA3-Fc auf epoxysilanisierten Gläsern mit PLL und DSC aktiver als ephrin-A2-mFc zu sein scheint. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde in einer Konzentrationsreihe die EphA-Fc Konzentration in Doppelstreifen-Assays auf jeweils 15, 10 und 5 μ g/ml reduziert und die Gesamt molekülzahl durch Zumischung von Fc-Fragment äquimolar beibehalten. Die Konzentration von geclustertem ephrin-A2-mFc von 16 μ g/ml in NaAc (pH4) blieb dabei in jeder der Konditionen unverändert (Abbildung 16 B-D).

In Doppelstreifen-Assays mit 15 μ g/ml EphA3-Fc entscheiden sich 79% der temporalen ($p>0.000001$), sowie 76% der nasalen Axone ($p>0.000001$) repulsiv gegen EphA3-Fc und entschieden sich eher für die ephrin-A2-mFc Streifen (Abbildung 16 B). Damit gibt es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Lenkungsentscheidung zwischen den beiden Populationen in dieser Kondition. In Assays mit 10 μ g/ml EphA3-Fc entscheiden sich 65% der temporalen Axone gegen das EphA3-Fc und stattdessen für ephrin-A2-mFc ($p=0.002$) während sich 75% der nasalen Axone gegen EphA3-Fc und für ephrin-A2-mFc entscheiden ($p>0.000001$, Abbildung 16 C). Auch bei einer weiteren Reduktion von EphA3-Fc auf 5 μ g/ml beobachtet man bei einer Verteilung von 67% temporaler und 77% nasaler Axone auf ephrin-A2-mFc, eine sehr ähnliche Vermeidung von EphA3-Fc (Abbildung 16 D, für beide Populationen gilt $p>0.000001$).

Abbildung 16: Axonales Lenkungsverhalten in EphA3-/ephrin-mA2-Fc (pH4) Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC

A: (links) temporale und nasale Axone vermeiden 30 μ g/ml gestempeltes EphA3-Fc (blaue Pseudofarbe) und wachsen bevorzugt auf 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc nach pH4 (rote Pseudofarbe). (rechts) 71.3% der temporalen Axone entscheiden sich gegen EphA3-Fc und bevorzugen ephrin-A2-mFc nach pH4. Nasale Axone entscheiden zu 71.4% ähnlich für ephrin-A2-Fc. **B:** 15 μ g/ml gestempeltes EphA3-Fc werden von 80% temporalen und 77% nasalen Axone vermieden, welche dagegen ephrin-A2-mFc nach pH4 bevorzugen. **C:** Bei 10 μ g/ml reagieren 65% der temporalen und 75% der nasalen Axone repulsiv auf EphA3-Fc und wachsen stattdessen auf ephrin-A2-mFc nach pH4. **D:** Auf 5 μ g/ml EphA3-Fc reagieren 67% der temporalen und 77% der nasalen Axone repulsiven und wachsen auf 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc. EphA3-Fc mit goat anti-human AF546 gefärbt (blaue Pseudofarbe), ephrin-A2-mFc in pH4 mit donkey anti-mouse AF647 geclustert (rote Pseudofarbe), Axone in invertiertem Phalloidin AF488 Fluoreszenzsignal. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt. Gestrichelte Linie zeigt 50%-Grenze an. N= unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, n.s.: nicht signifikant. Maßstabsbalken 100 μ m.

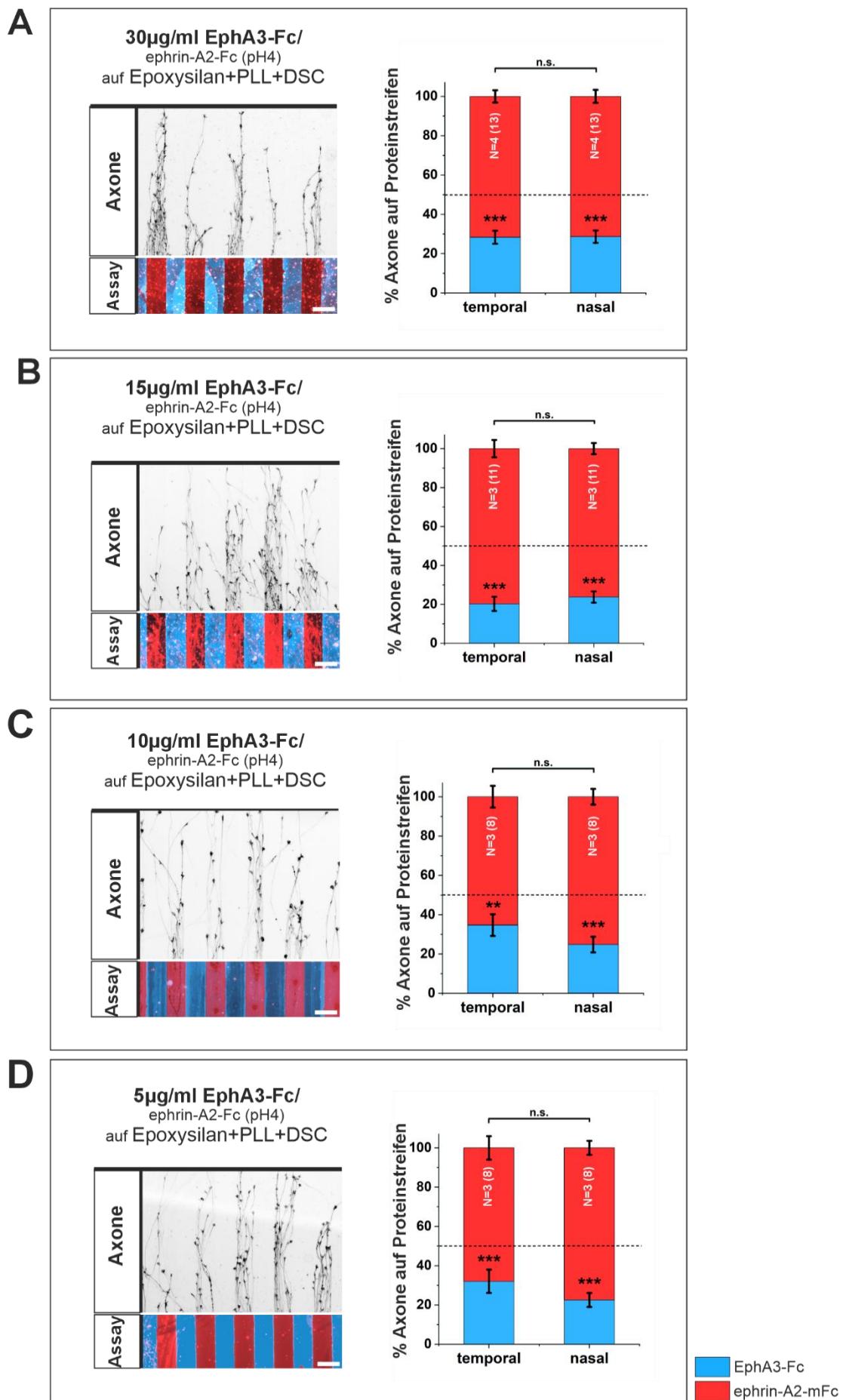


Abbildung 16: Axonales Lenkungsverhalten in EphA3-ephrin-A2-mFc (pH4) Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC
Abbildungsbeschreibung auf der linken Seite

Während nasale Axone in jeder der Konzentrationsbedingungen der Doppelstreifen von 30, 15, 10 bzw. 5 μ g/ml EphA3-Fc und 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc eine binär topographisch richtige Entscheidung gegen EphA3-Fc und stattdessen für ephrin-A2-mFc treffen, entscheiden sich temporal Axone selbst bei der geringsten Konzentration von 5 μ g/ml nicht binär topographisch richtig für EphA3-Fc und stattdessen gegen ephrin-A2-mFc. Des Weiteren wird keine topographisch differentielle Entscheidung temporaler und nasaler Axone auf EphA3- oder ephrin-A2-mFc festgestellt. Insgesamt führt dieses Ergebnis zu der Vermutung, dass die Aktivität von EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL- und DSC-Beschichtung zu hoch ist und es durch ein erhöhtes *reverse signaling* in den Wachstumskegeln selbst in geringen Konzentrationen zu einer axonalen Entscheidung gegen EphA3-Fc kommt.

4.5.2. Repulsion durch EphA3-Fc nach Immobilisierung auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC

In Doppelstreifen-Assays aus EphA3-Fc und sauer überschichtetem ephrin-A2-mFc auf epoxysilanisiertem Glas mit Poly-L-Lysin (PLL) und dem Linker Disuccinimidylcarbonat (DSC), reagieren sowohl nasale als auch temporale Axone stark repulsiv auf EphA3-Fc und wachsen stattdessen auf ephrin-A2-mFc Streifen (Abbildung 16). Während diese Beobachtung für nasale Populationen aufgrund ihrer molekularen Identität zu erwarten war, entspricht sie nicht der erwarteten, topographisch richtigen Entscheidung temporaler Axone. Selbst in mit einer geringen Konzentration von 5 μ g/ml EphA3-Fc, im Gegensatz zu 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc, reagierten temporale Axone in EphA3/ephrin-A2 Doppelstreifen-Assays noch immer signifikant repulsiver auf das EphA3-Fc statt das ephrin-A2-mFc (Abbildung 16).

Für die Untersuchung der Aktivität und Lenkungseigenschaften von gestempeltem EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC wurden, ähnlich wie in Abschnitt 4.3.3., Einzelstreifen-Assays mit unterschiedlichen EphA3-Fc Konzentrationen erstellt und mit sowohl temporalen als auch nasalen Explantat-Streifen getestet. Für die Konzentrationsreihe wurden Konzentrationen von jeweils 30, 15, 10, 5 und 1 μ g/ml EphA3-Fc in PBS gewählt und über Silikon-Matrizen mit 90 μ m Streifenbreite auf epoxysilanisierte Deckgläser mit PLL und DSC gestempelt. Um die Gesamtzahl in jeder der Bedingung konstant zu halten, wurde Fc-Fragment bis zur Äquimolarität mit der höchsten Konzentration von EphA3 zugemischt. Die leeren Zwischenstreifen des gestempelten Proteinmusters wurden ebenso äquimolar mit Fc-Fragment durch Adsorption aus den Mikrokanälen aufgefüllt. Das gesamte Feld wurde mit 20 μ g/ml Laminin beschichtet und nasale sowie temporale Explantat-Streifen 24 Stunden auf den Assays kultiviert. Nach der Fixierung wurde die extrazelluläre Domäne von EphA3-Fc mit einem rabbit anti-EphA3 Primär- und einem goat anti-rabbit Cy3 Sekundärantikörper gefärbt.

Wie in Abbildung 17 gezeigt, vermeiden in einem solchen Assay 67.2% der temporalen Axone 30 μ g/ml EphA3-Fc, was eine statistisch signifikante Repulsion im Vergleich zur Fc-Kontrolle darstellt (42.2% der Axone auf Fc-Streifen; $p=0.008$).

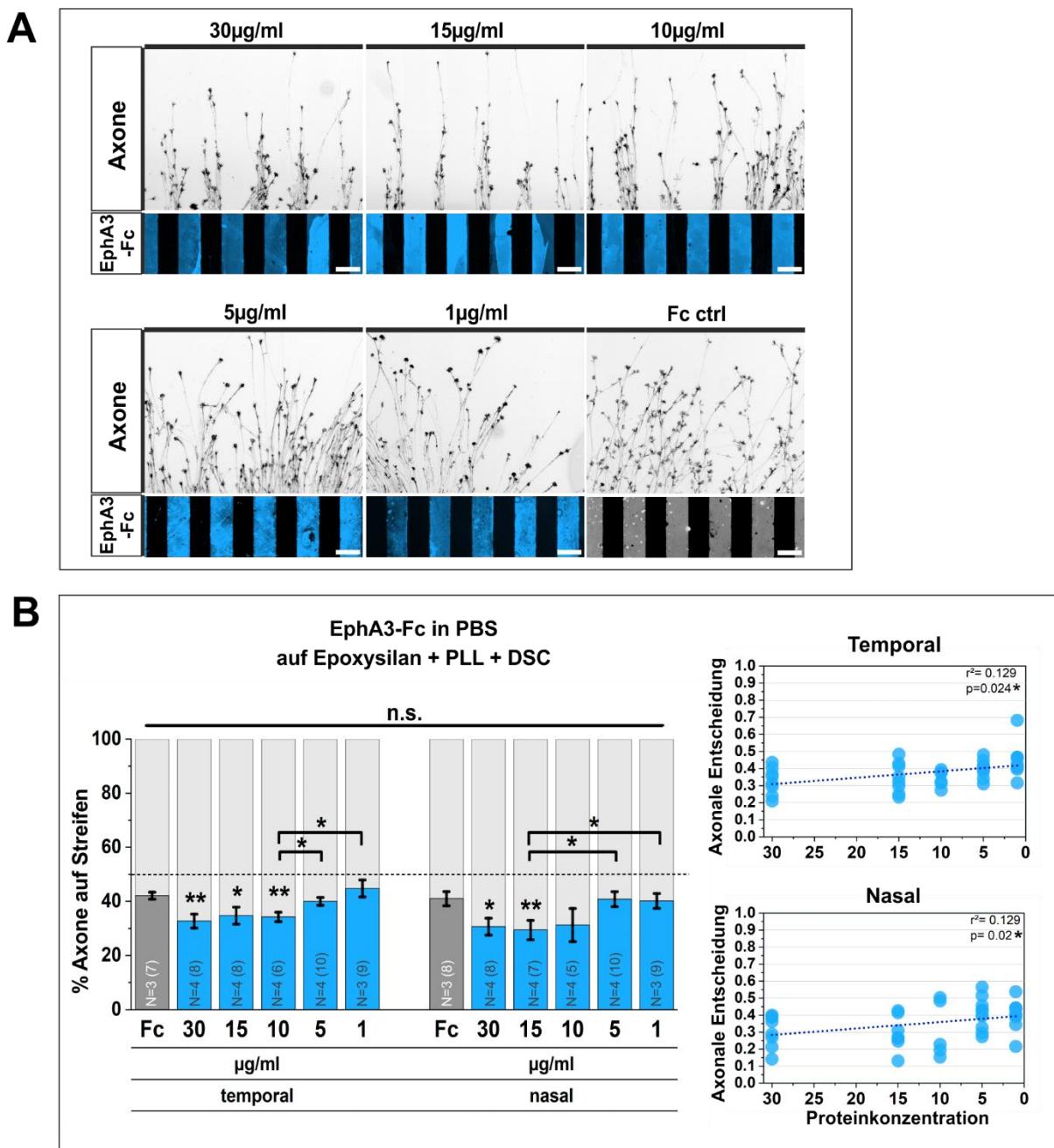


Abbildung 17: Retinale Axone auf EphA3-Fc Streifenassays in PBS auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC

A: Temporale und nasale Axone reagieren repulsiv auf hohe Konzentrationen wie 30, 15 und 10 μ g/ml EphA3-Fc, nicht aber auf niedrige Konzentrationen von 5 μ g/ml und 1 μ g/ml. Extrazelluläre Domäne von EphA3-Fc mit einem rabbit Primär- und goat anti-rabbit Cy3 Sekundärantikörper gefärbt (blaue Pseudofarbe), Fc-Kontrolle mit goat anti-human AF 546 gefärbt (weiße Pseudofarbe), Axone in invertiertem Fluoreszenzsignal der Phalloidin AF488 Färbung. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt **B:** (links) Quantifizierung der repulsiven Reaktion der Axone auf EphA3-Fc in verschiedenen Konzentrationen basierend auf der Mittelwertverteilung der Axone auf das Protein. Für temporale Axone 30 μ g/ml: 32.8%, 15 μ g/ml: 34.8%, 10 μ g/ml: 34.3%, 5 μ g/ml: 40%, 1 μ g/ml: 44.8%, Fc-Kontrolle: 42.2%. Für nasale Axone 30 μ g/ml: 30.7%, 15 μ g/ml: 29.5%, 10 μ g/ml: 31.3%, 5 μ g/ml: 40.9%, 1 μ g/ml: 40.2%, Fc-Kontrolle: 41%. Gestrichelte Linie zeigt 50%-Grenze an. (rechts) Korrelation der axonalen Entscheidung mit der Proteinkonzentration zeigt mit $p=0.024$ für temporale und mit $p=0.02$ für nasale Axone eine signifikante Korrelation. p -Wert ermittelt aus Pearson-Korrelationskoeffizient r mit einem Signifikanzniveau von 0.05. N= unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit: *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, n.s.: nicht signifikant. Maßstabsbalken 100 μ m

Mit jeweils 65% vermeiden temporale Axone Streifen aus 15 und 10 μ g/ml EphA3-Fc ($p=0.01$ bzw. 0.004). Mit 40% der Axone auf 5 μ g/ml und 45% auf 1 μ g/ml EphA3-Fc ergab sich zwar keine signifikante Repulsion gegenüber der Fc-Kontrolle mehr (Abbildung 17 B), allerdings ist eine gradierte Abstufung der repulsiven Entscheidung gegen 10 μ g/ml und jeweils 5 bzw. 1 μ g/ml EphA3-Fc zu erkennen (mit jeweils $p=0.03$). Betrachtet man die Korrelation zwischen axonaler Lenkungsentscheidung und Höhe der Eph-A3-Fc Konzentration, ergibt sich hier mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.129 eine signifikante Korrelation ($p=0.024$, Abbildung 17 B).

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Lenkung nasaler Axone in der EphA3-Fc Konzentrationsreihe. Hier vermeiden 69.3% der nasalen Axone EphA3-Fc Streifen mit 30 μ g/ml und 70% der Axone Streifen mit 15 μ g/ml des Proteins (Abbildung 17 A und B). Diese Lenkungsentscheidungen sind signifikant repulsiv gegenüber der Fc-Kontrolle ($p=0.03$ bzw. $p=0.005$). 10 μ g/ml EphA3-Fc werden noch von 68% der nasalen Axone vermieden, was sich nicht mehr statistisch signifikant von der Fc-Kontrolle unterscheidet, dafür aber signifikant von den 59% der nasalen Axone, die 5 μ g/ml EphA3-Fc vermeiden ($p=0.02$, Abbildung 17 B). Die 59.8% nasal Axone auf 1 μ g/ml EphA3-Fc unterscheiden sich ebenso nicht mehr von der Fc-Kontrolle, ergeben jedoch eine weitere statistisch signifikante Abstufung zu der Repulsion, ausgelöst durch 15 μ g/ml EphA3-Fc ($p=0.03$, Abbildung 17 B). Die Korrelation der axonalen Entscheidung nasal Populationen und der EphA3-Fc Konzentration, lässt sich mit einem r^2 -Wert von 0.129 ebenso signifikant bestätigen ($p=0.02$, Abbildung 17).

Somit ist es durch die zusätzliche Beschichtung von epoxysilanisierten Deckgläsern mit PLL und DSC als Linker gelungen, ein repulsives Verhalten temporaler und nasal Axone der Retina durch EphA3-Fc auszulösen, welches stärker ist als auf rein epoxysilanisierten Gläsern. Die Repulsion durch EphA3-Fc zeigt keinen topographisch differentiellen Einfluss auf temporale und nasale RGC, jedoch kann eine leicht gradierte Abnahme der Repulsion in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration innerhalb der Populationen beobachtet werden (Abbildung 17B).

4.5.3. Repulsion durch ephrin-A2-mFc nach Immobilisierung in pH4 auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC

Die zusätzliche Beschichtung epoxysilanierter Deckgläser mit PLL und DSC-Linker erwies sich als gut geeignet, um in EphA3-Fc Einzelstreifen-Assays ein repulsives Lenkungsverhalten von Axonen retinaler Ganglienzellen auszulösen. Ebenso lässt sich das Ausmaß der Repulsion durch eine Reduzierung der Proteinkonzentration graduell verringern. Da sich in EphA3-ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisierten Deckgläsern mit PLL und DSC-Linker jedoch sowohl nasale als auch temporale Axone selbst gegen geringe EphA3-Fc Konzentrationen und stattdessen für höher konzentriertes ephrin-A2-mFc entscheiden. Um die Frage zu klären ob ephrin-A2-mFc möglicherweise eine Unteraktivität

aufweist, sollte in einem nächsten Experiment nun die Aktivität und Lenkungseigenschaft von sauer aufgebrachtem und ins neutrale rückgeführte ephrin-A2-mFc mit Konzentrationsreihen in Einzelstreifen-Assays genauer untersucht werden.

Hierfür wurde über Silikon-Matrizen mit 90 μ m Streifenbreite äquimolar Fc-Fragment in PBS auf epoxysilanisiertes Glas mit PLL und DSC-Linker aufgestempelt und die leeren Zwischenstreifen mit geclusterten ephrin-A2-mFc Konzentrationen von jeweils 16, 12, 8, 4 und 2 μ g/ml in saurem NaAc (pH4) durch Überschichtung aufgefüllt. Um die Gesamt molekülzahl in jeder der Bedingungen konstant zu halten, wurde ggf. Fc-Fragment bis zur Äquimolarität mit der höchsten Konzentration von ephrin-A2-mFc zugemischt. Nach Rückführung des gebundenen Proteins in ein neutrales pH-Milieu durch gründliches Waschen mit HBSS, wurde der Assay für mindestens zwei Stunden mit 10 μ g/ml Laminin und 8 μ g/ml Merosin beschichtet und mit temporalen und nasalen Explantat-Streifen getestet.

In Abbildung 18 sind die Ergebnisse dieses Experiments gezeigt. Temporale Axone entscheiden sich hierbei zu 76.7% gegen Streifen aus 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc und entscheiden sich damit statistisch signifikant vom Lenkungsverhalten in der Fc-Kontrolle ($p= 0.005$, Abbildung 18 A und B). Ähnlich hierzu vermeiden 76.9% temporaler Axone 12 μ g/ml ephrin-A2-mFc ($p= 0.01$ gegenüber der Fc-Kontrolle). Eine Entscheidung gegen 8, 4 und 2 μ g/ml ephrin-A2-mFc ist von jeweils 60.8%, 51.3% bzw. 51.6% der Axone statistisch nicht mehr signifikant von der in der Fc-Kontrolle zu unterscheiden, jedoch lassen sich zwischen 12 und 4 μ g/ml ($p=0.03$) sowie 12 und 2 μ g/ml ephrin-A2-mFc ($p=0.01$) eine graduell reduzierte Repulsion zwischen den Proteinkonzentrationen quantifizieren (Abbildung 18 B).

Nasale Axone hingegen entscheiden sich in keiner der Konzentrationsbedingungen signifikant gegen ephrin-A2-mFc Streifen (Abbildung 18 A und B). Hier befinden sich 58% der nasalen Axone auf Streifen aus 16 bzw. 12 μ g/ml ephrin-A2-mFc, während es 50% bzw. 47% nasaler Axone auf 8 bzw. 2 μ g/ml ephrin-A2-mFc sind. In Einzelstreifen-Assays aus 4 μ g/ml ephrin-A2-mFc befinden sich bemerkenswerterweise tendenziell sogar mehr Axone auf den ephrin-A2-mFc Streifen ($p=0.03$ gegenüber der Fc-Kontrolle, Abbildung 18 B). Des Weiteren lässt sich hier, ähnlich wie in Abbildung 12, eine topographische Differentialität zwischen nasalen und temporalen erkennen ($p=0.04$; Abbildung 18 B). Die Korrelationen der axonalen Lenkungsentscheidungen mit der Höhe der eingesetzten ephrin-A2-mFc Konzentration, erweist sich für temporale Populationen als stark signifikant ($p= 0.001$ bei einem r^2 -Wert von 0.4708; Abbildung 18 B). Mit einem p -Wert von 0.02 ist die Korrelation zwischen den Lenkungsentscheidungen nasaler Axone und der Höhe der jeweiligen ephrin-A2-mFc Konzentration ebenso statistisch bestätigt ($r^2= 0.2579$; Abbildung 18 B).

Dies zeigt, dass ephrin-A2-mFc nach Immobilisierung in pH4 auf epoxysilanisierten Deckgläsern mit PLL und DSC und einer Rückführung in ein pH-neutrales Milieu einen repulsiven Effekt auf temporale Axone hat.

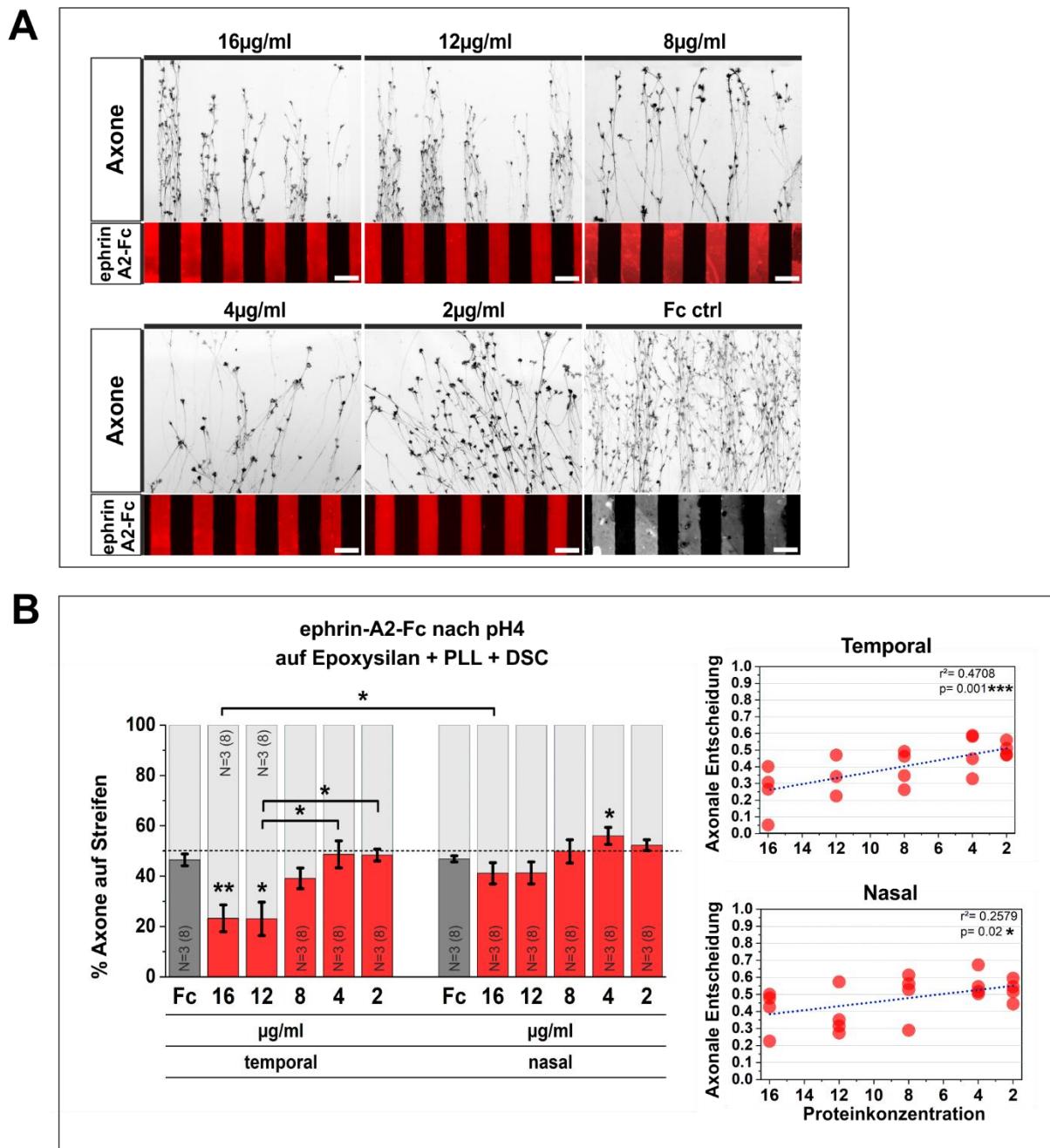


Abbildung 18: Retinale Axone auf ephrin-A2-mFc Streifenassays nach pH4 auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC-Linker

A: Temporale und nasale Axone reagieren repulsiv auf 16 µg/ml und 12 µg/ml ephrin-A2-mFc nach Bindung in pH4. Die Repulsion nimmt bei 8 µg/ml stark ab und ist bei 4 µg/ml und 2 µg/ml nicht mehr zu beobachten. Ephrin-A2-mFc mit donkey anti-mouse AF647 geclustert (rote Pseudofarbe), Fc-Kontrolle mit goat anti-human AF 546 gefärbt (weiße Pseudofarbe), Axone in invertiertem Fluoreszenzsignal der Phalloidin AF488 Färbung. Retina-Explantat jeweils am unteren Rand, nicht gezeigt B: (Links) Quantifizierung der repulsiven Reaktion der Axone auf ephrin-A2-mFc als Mittelwert der Prozentverteilung von Axonen dem Protein. Für temporale Axone 16 µg/ml: 23.3%, 12 µg/ml: 20.1%, 8 µg/ml: 39.2%, 4 µg/ml: 48.7%, 2 µg/ml: 48.4%, Fc-Kontrolle: 46.5%. Für nasale Axone 16 µg/ml: 41.2%, 12 µg/ml: 41.3%, 8 µg/ml: 49.9%, 4 µg/ml: 56%, 2 µg/ml: 53%, Fc-Kontrolle: 53%. Gestrichelte Linie zeigt 50%-Grenze an. (Rechts) Korrelation der axonalen Entscheidung mit der ephrin-A2-mFc Konzentration, zeigt mit $p=0.001$ für temporale Axone eine starke und mit $p=0.02$ für nasale Axone eine leicht signifikante Korrelation. p -Wert ermittelt aus Pearson-Korrelationskoeffizient r mit einem Signifikanzniveau von 0.05. N =unabhängige Experimente, in Klammern Anzahl analysierter Retina-Explantate. Fehlerbalken geben Standardfehler an. T-Test mit *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$. Maßstabsbalken 100 µm.

Der Grad der Repulsion lässt sich durch Reduzierung der Proteinkonzentration graduell abschwächen, was durch die Korrelation zwischen Proteinkonzentration und axonaler

Entscheidung bestätigt wird. Auf nasale Axone hingegen hat ephrin-A2-mFc auf dieser Oberfläche keinen repulsiven Einfluss und zeigt demnach einen topographisch differentiellen Einfluss von ephrin-A2-mFc auf RGC in den Einzelstreifen-Assays.

Zusammenfassend ergibt sich damit das Bild, dass EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas inaktiv ist, während ephrin-A2-mFc zumindest moderat aktiv ist. Dadurch ergibt sich in EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays ein leicht *forward signaling* dominiertes Ergebnis. Auf epoxysilanisierten Gläsern mit zusätzlicher PLL- und DSC-Beschichtung dagegen, scheint EphA3-Fc nun auch moderat aktiv, während der Aktivität von ephrin-A2-mFc eher abnimmt, was sich in einem EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assay auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL- und DSC-Linker wiederum zu *reverse signaling* dominierenden Ergebnissen des Assays führt. Es scheint demnach ein empfindliches Gleichgewicht der axonalen Antwort auf bestimmte Proteinkonzentrationen zu geben, deren Verhältnis in Doppelstreifen-Assays in weiteren Verdünnungsexperimenten mit einer eventuell alternativen Verdünnungsstrategie weiter angepasst werden muss. Erst nachdem die eine erfolgreiche Balance der Einflüsse des *forward* und *reverse signalings* in Doppelstreifen-Assays etabliert sind und sich eine topographisch binär korrekte Lenkungsentscheidung herstellen lässt, können gegenläufige Dreiecks-Gradienten aus EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc zur Untersuchung topographisch kontinuierlich korrekter Lenkungsentscheidung herangezogen werden.

4.6. Expression von HaloTag-EphA3 und SNAP-Tag ephrin-A5 *in vitro*

Für die Untersuchung der Lokalisation und Dynamiken von Lenkungsmolekülen in retinalen Wachstumskegeln *in vitro*, wurden in vorangegangenen Arbeiten die selbstmarkierenden Fusionsproteine SNAP-Tag-ephrin-A5 und HaloTag-EphA3 hergestellt. Durch die Verwendung von jeweils zellpermeablen und nicht-zellpermeablen und Tag-spezifischen Liganden, ermöglicht dieses System die beiden Proteine in lebenden Zellen simultan zu verfolgen, dabei extra- und intrazelluläre Subpopulationen zu unterscheiden und die komplexe Dynamik der Sensoren während der axonalen Lenkung zu beobachten. In dieser Arbeit werden dafür die Expressionsvektoren pSNAP-ephrin-A5 (Weschenfelder, 2014) und pCIG2 HaloTag-EphA3 (Kornstädt, 2017; Ruisi, 2019) verwendet. Das pCIG2 HaloTag-EphA3 konnte in NIH 3T3 Zellen und RGCs zwar erfolgreich exprimiert und nachgewiesen werden, jedoch war die axonale Projektion retinaler Ganglienzellen nach Transfektion mit dem rekombinanten Protein massiv gestört (Ruisi, 2019). Da eine wachstumsinhibierende Überexpression des Plasmids vermutet wurde, sollte eine Reduktion der Expressionsstärke des pCIG2 HaloTag-EphA3 in dieser Arbeit durch eine Verkürzung der CMV-Promoter Sequenz erreicht werden (Vullhorst et al., 2017).

4.6.1. Reduktion der Expressionsstärke von pCIG2 HaloTag-EphA3

Die verkürzte CMV-Sequenz wurde, wie in Abschnitt 3.1. beschrieben, enzymatisch aus seinem Vektor herausgeschnitten und in den vorbereiteten pCIG2 HaloTag-EphA3 hineinligiert und über eine Ampicillin-Resistenz selektiert. In Abbildung 19 sind die Plasmid-Karten des ursprünglichen pCIG2 HaloTag-EphA3 und die des Plasmids mit nun verkürzter CMV-Sequenz schematisch dargestellt. Das korrekte Ligationsprodukt mit verkürztem CMV-Enhancers wurde über einen Restriktionsfingerprint mit *Pvu*I und *Bp*I identifiziert (Daten nicht gezeigt) und die korrekte Assemblierung des so entstandenen attenuierten HaloTag-EphA3 Plasmids über Sequenzierung bestätigt (LGC genomics GmbH, Berlin).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das aus dem attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 exprimierte Fusionsprotein als *attenuated* HaloTag-EphA3 bezeichnet (im Folgenden auch *atten.* HaloTag-EphA3).

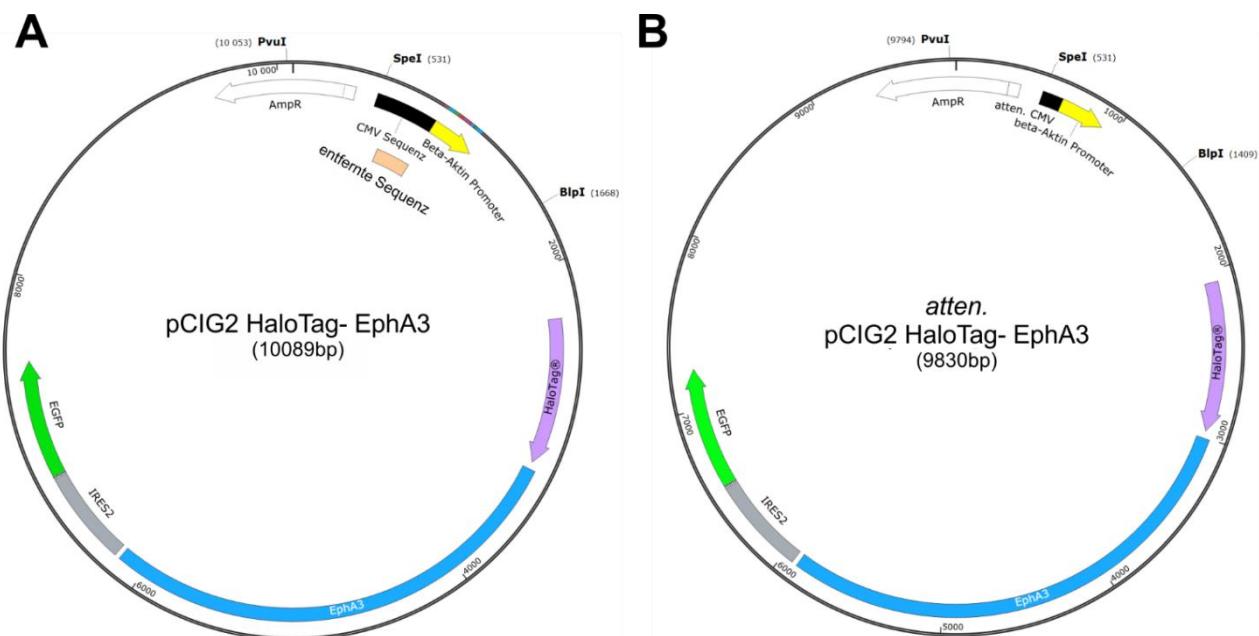


Abbildung 19: Plasmidkarten von pCIG2 HaloTag-EphA3 mit unterschiedlichen Enhancern

A: pCIG2 HaloTag-EphA3 Karte zur Expression von HaloTag-markiertem EphA3 (violett und blau) unter Kontrolle eines CMV-Enhancer/Promoter (schwarz und gelb). CMV-Sequenz die nach Vullhorst et al. entfernt wurde in orange dargestellt. Über eine IRES (grau) wird bicistronisch eGFP (grün) transkribiert. Ebenso annotiert ist das Gen für die Ampicillin-Resistenz (weiß). **B:** Plasmidkarte des attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 mit verkürzter CMV-Sequenz zur Reduktion der Expressionsstärke des Plasmids nach Vullhorst et al. 2017.

4.6.2. Expression des attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 in NIH 3T3 Zellen

Aufgrund ihrer vergleichsweise unkomplizierten Kultivierung und Transfizierung, eignen sich embryonale Mausfibroblasten gut, um in ersten Kontrollexperimenten die generelle Expression rekombinanter Proteine zu überprüfen und ggf. zu charakterisieren. Für die Expression des *atten.* pCIG2 HaloTag-EphA3 *in vitro*, wurde dieses mittels Lipofektion in NIH 3T3 Zellen eingebracht (siehe Abschnitt 3.2.). Nachdem die Zellen das Protein über einen Zeitraum von ca. 48 Stunden exprimiert haben, wurden sie einer Lebendfärbung mit dem zellpermeablen

Halo-Liganden Janelia Fluor 549 unterzogen und fixiert. Es folgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des eGFP-Signals unter Kontrolle einer IRES-Sequenz und des markierten *atten*. HaloTag-EphA3.

In Abbildung 20 ist eine exemplarische NIH 3T3 Zelle nach der Transfektion abgebildet. Die Transfektion kann über das bicistronisch exprimierte eGFP-Signal bestätigt werden (Abbildung 20 A). Ebenso konnte die Expression des *atten*. HaloTag-EphA3 Expression durch Detektion des Halo-Tags mit dem zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 bestätigt werden (Abbildung 20 A'). Das *atten*. HaloTag-EphA3 ist hierbei im gesamten Zytosol und in der Plasmamembran der Zelle zu erkennen. Des Weiteren erkennt man hier eine markante perinukleäre Akkumulation des Fusionsproteins. Die Expression des attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 konnte somit in NIH 3T3 Zellen bestätigt werden.

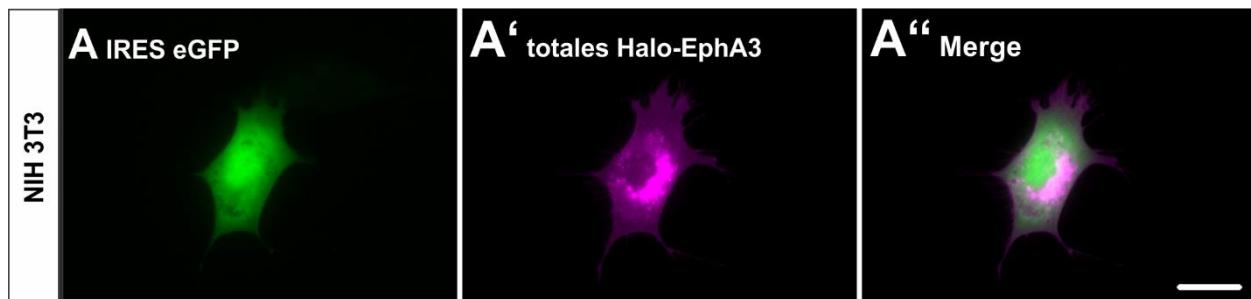


Abbildung 20: Expression von attenuiertem HaloTag-EphA3 in NIH 3T3 Zellen

A: Das eGFP-Signal der IRES bestätigt die erfolgreiche Transfektion und Expression des Plasmids. **A':** das gesamte exprimierte *atten*. HaloTag-EphA3 lässt sich durch den zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 in lebenden Zellen markieren. Die Färbung ist in der gesamten Zelle detektierbar, wobei kleinere Cluster perinukleär akkumulieren (DAPI-Färbung nicht dargestellt). **A'':** Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle. Maßstabsbalken 50µm.

4.6.3. Expression des attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 in RGC

Nachdem die prinzipielle Expression und der Nachweis des *atten*. pCIG2 HaloTag-EphA3 in embryonalen Mausfibroblasten bestätigt werden konnte, wurde das Plasmid im nächsten Schritt in Retina-Explantate eingebracht. Hierfür wurde die Retina von Hühner-Embryonen (E6-7, H&H Stadium 29-30) herauspräpariert und das Plasmid über Elektroporation in das undissozierte retinale Gewebe eingebracht (siehe Abschnitt 3.3.). Die elektroporierte Retina wurde auf Laminin/Merosin-Substraten für mindestens 48 Stunden bei 37°C in F12-MZ „Plus“ Medium kultiviert. Nach der Kultivierung und der Lebendzelloffnung mit einem Regenerationsschritt (siehe Abschnitt 3.7.1.), wurden die Explantate fixiert und in Mowiol eingebettet.

Die erfolgreiche Transfektion der Retina konnte über das IRES-eGFP Signal und einer HaloTag Markierung mit dem Halo-Liganden Janelia Fluor 546 bestätigt werden (Abbildung 21 A und A'). Das eGFP befindet sich hierbei vor allem entlang des Axons und verstärkt in der zentralen Domäne der Wachstumskegel. Aufgrund der abgeschwächten Expressionsstärke des Plasmids und der damit verringerten Signalintensität des eGFP, konnten transfizierte Axone

fast ausschließlich über die zusätzliche Markierung des HaloTag- EphA3 eindeutig identifiziert werden (Abbildung 21 A' und A''). Es konnte zudem beobachtet werden, dass Wachstumskegel transfizierter RGCs in erhöhtem Maße kollabiert waren. Anders als bei der Verwendung des nicht attenuierten pCIG2 HaloTag-EphA3 (Ruisi, 2019) entsprach die generelle Morphologie transfizierter Wachstumskegel aber immer der charakteristisch pinselartigen Morphologie physiologischer Wachstumskegel.

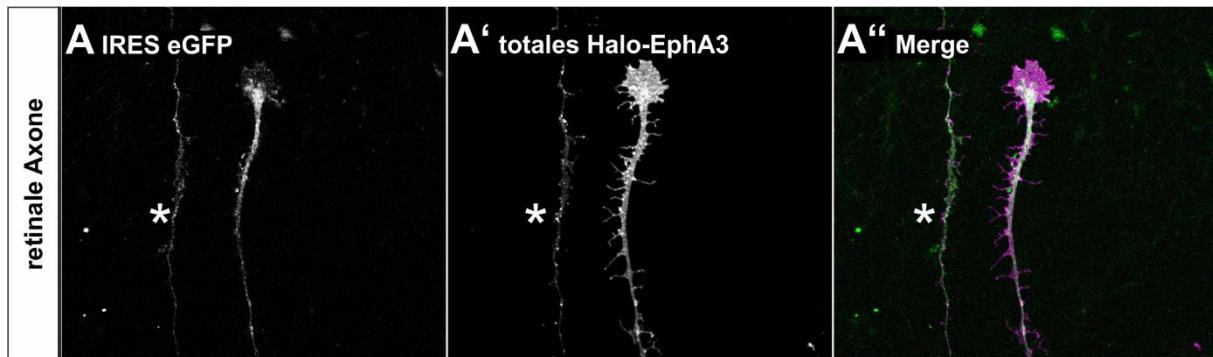


Abbildung 21: Expression von attenuiertem HaloTag-EphA3 in retinale Ganglienzellen

A: Das eGFP-Signal der IRES ist schwach in Axonen und verstärkt in der zentralen Domäne von Wachstumskegeln erfolgreich transfizierter RGCs detektierbar. **A':** das gesamte exprimierte HaloTag-EphA3 lässt sich durch den zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 markieren und ist über das gesamte Axon, den Wachstumskegel bis hin in interstitielle Verzweigungen detektierbar. Entlang des Axons und im Wachstumskegel sind kleine Vesikel erkennbar. **A'':** Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle (HaloTag-EphA3, Pseudofarbe magenta). Der Asterisk markiert ein weiteres Axon einer anderen transfizierten RGC. Maßstabsbalken 50µm.

Im Gegensatz zu Transfektionen mit dem Plasmid mit vollständiger CMV-Sequenz, führte die Transfektion der Retina mit *atten.* pCIG2 HaloTag-EphA3 zu einer stark erhöhten Anzahl transfizierter Axone (siehe Abbildung 21 und Tabelle 1). Während mit der vorherigen Version des Plasmids aus 14 unabhängig voneinander transfizierten Retinae auf homogenen Laminin-Substraten lediglich insgesamt 8 transfizierte Axone identifiziert wurden (Ruisi, 2019), konnten nach der Transfektion des Plasmids mit attenuierter CMV-Enhancer bereits in drei unabhängig voneinander elektroporierten Retinae auf Substraten aus Laminin und Merosin über 400 transfizierte Axone identifiziert werden (siehe Tabelle 1).

Plasmid	Anzahl elektroporierte Retinae; Medium	Anzahl identifizierter transfizierter Axone
pCIG2 HaloTag-EphA3	14 in F12-MZ; Laminin	8
<i>attenuated</i> pCIG2 HaloTag-EphA3	1 in F12-MZ; Laminin	22
	1 in F12-MZ „Plus“; Laminin/Merosin	258
	1 in F12-MZ „Plus“; Laminin/Merosin	142

Tabelle 1: Einfluss angepasster Kulturbedingungen auf *atten.* HaloTag-EphA3 exprimierende RGCs
In drei Elektroporationen mit *atten.* pCIG2 HaloTag-EphA3 in dieser Arbeit, wurden mehr als 400 transfizierte Axone identifiziert. Die Daten für das ursprüngliche pCIG2 HaloTag-EphA3 stammen aus Ruisi (2019).

Es konnte damit gezeigt werden, dass die Reduktion der Expressionsstärke durch die Verkürzung des CMV-Enhancers zu einer erhöhten Ausbildung und Projektion von Axonen transfizierter RGCs führt und deren Wachstumskegel eine physiologische Morphologie aufweisen. Die Strategie zur Reduktion der Expressionsstärke des HaloTag-EphA3 Plasmids erwies sich damit als erfolgreich. Des Weiteren konnte ein deutlich vermehrtes Auswachsen transfizierter Axone durch eine modifizierte Zusammensetzung des Zellkulturmediums erreicht und die *in vitro* Kultivierungsbedingungen transfizierter Retina-Explantate weiter optimiert werden.

4.6.4. Co-Expression von SNAP-ephrin-A5 und *atten*. HaloTag-EphA3 *in vitro*

Nach der Etablierung der Expression von *atten*. Halo-EphA3 in RGCs wurde eine Co-Transfektion von NIH 3T3 Zellen mit SNAP-ephrin-A5, sowie dem *atten*. HaloTag-EphA3 Plasmid durchgeführt, in welcher zunächst einmal die gleichzeitige Transfektion und simultane Expression beider Plasmide etabliert und charakterisiert werden sollte. Die Transfektion mit jeweils 2.5µg beider Plasmide erfolgte durch Lipofektion. Nach der Kultivierung und Lebendzellfärbung mit entsprechenden Halo- und SNAP-Liganden, wurden die Zellen fixiert und in Mowiol eingebettet.

In Abbildung 22 A ist eine exemplarische NIH 3T3 Zelle gezeigt, in der die erfolgreiche Lipofektion und Expression der Plasmide über das eGFP-Signal als Transfektionskontrolle bestätigt werden konnte. Die Färbung der gesamten HaloTag-EphA3 Population mit dem zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 zeigt eine Lokalisation des Fusionsproteins in Vesikeln sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytosol, insbesondere stark akkumuliert um den Zellkern herum (Abbildung 22 A, hellblaue Pseudofarbe). Eine gleichzeitige Färbung von extrazellulärem SNAP-ephrin-A5 mit dem nicht-zellpermeablen SNAP-Liganden Janelia Fluor 646, zeigt nach ca. 30 min. erstaunlicherweise eine sehr ähnliche Lokalisation von SNAP-ephrin-A5 in der Zelle. Dabei befindet sich das SNAP-ephrin-A5 sowohl in der Zellmembran, als auch in perinukleären Clustern (Abbildung 22 A, rote Pseudofarbe). Da der SNAP-Ligand Janelia Fluor 646 nicht zellpermeabel sein sollte und damit idealerweise lediglich die SNAP-Tags bindet, welche sich zum Zeitpunkt der Färbung in der Zellmembran befanden, muss es sich demnach bei den nun intrazellulär lokalisierten Signalen um endozytierte Vesikel handeln. Bei einer Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle kann zudem eine starke Co-Lokalisation von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 sowohl in der Zellmembran, als auch im Zytosol beobachtet werden (Abbildung 22 A, Merge). Die subzellulären Verteilungen der getagten Fusionsproteine in der hier gezeigten NIH 3T3 Zelle und ihrer getagten Proteine, wurden über einen Zeitraum von 2:51 Minuten während einer *Live Cell Imaging* Demonstration eines *Lattice Light Sheet* 7 Mikroskops mit integrierter Inkubationskammer (Zeiss, Oberkochen) aufgenommen.

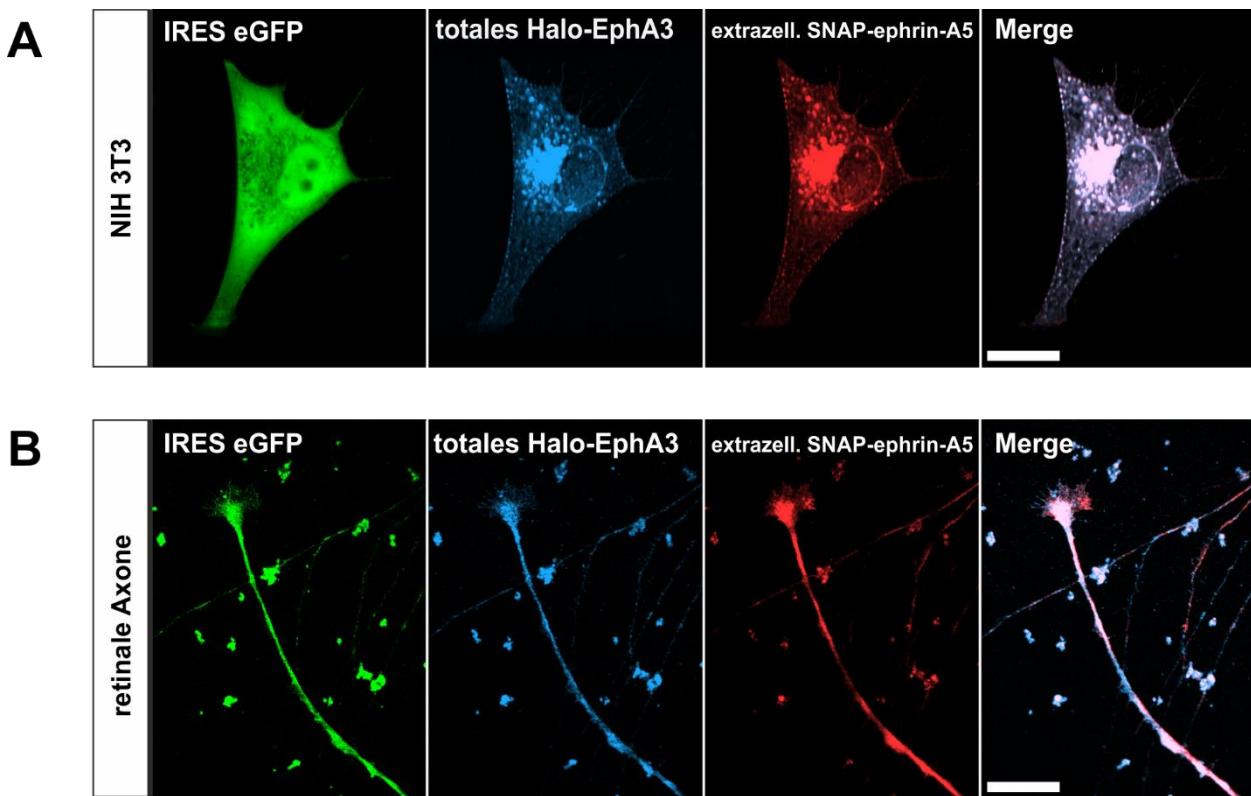


Abbildung 22: Co-Expression von atten. HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in NIH 3T3 und RGCs

A: In NIH 3T3 Zellen bestätigt das bicistronisch exprimierte eGFP-Signal die erfolgreiche Transfektion und Expression der Plasmide. Das gesamte atten. HaloTag-EphA3 wurde mit dem zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 nachgewiesen (Pseudofarbe Blau). Es ist in der Plasmamembran und innerhalb kleiner Vesikel im Zytosol lokalisiert und akkumuliert vor allem perinukleär (DAPI-Färbung nicht gezeigt). Extrazelluläres SNAP-ephrin-A5 wurde mit dem nicht-zellpermeablen SNAP-Liganden Janelia Fluor 646 nachgewiesen (Pseudofarbe Rot). Es befindet sich ebenso entlang der Plasmamembran und akkumuliert in der Nähe des Zellkerns. Das Merge-Bild zeigt die deutliche Co-Lokalisation der beiden Fluoreszenzsignale und damit der beiden Fusionsproteine. Die Bilder stammen aus einem Live Cell Imaging bei Aufnahmebeginn. Maßstabsbalken 50µm.

B: in Axonen retinaler Ganglienzellen bestätigt das eGFP-Signal ebenso die Expression der Plasmide. Es zeigt eine Verteilung entlang des Axons bis in die zentrale Domäne des Wachstumskegels. Auch hier lässt sich das gesamte HaloTag-EphA3 mit dem zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 (Pseudofarbe Blau), sowie das extrazelluläre SNAP-ephrin-A5 mit dem nicht-zellpermeablen SNAP-Liganden Janelia Fluor 646 nachweisen (Pseudofarbe Rot). Das Merge-Bild zeigt ebenfalls eine starke Co-Lokalisation beider Fluoreszenzsignale. Nicht-transfizierte Axone und Methylzellulose-Partikel sind als Hintergrundsignal sichtbar. Maßstabsbalken 50µm.

Hier konnte eine sehr ausgeprägte Dynamik und starke Co-Lokalisation der jeweiligen Vesikel in allen Kompartimenten der Zelle, wie der Plasmamembran und durch das gesamte Zytosol, beobachtet werden. Die simultane Transfektion und Expression von atten. Halo-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in NIH 3T3 Zellen konnte damit sowohl mit zellpermeablen als auch nicht-zellpermeablen Liganden bestätigt sowie ihre subzellulären Dynamiken und Lokalisationen gezeigt werden.

In einem weiterführenden Schritt wurde eine Co-Elektroporation von atten. HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in der Retina von Hühnerembryonen durchgeführt. Hierfür wurden 300ng/µl atten. pCIG2 HaloTag-EphA3 und 600ng/µl SNAP-Tag-ephrin-A5 über ex ovo Elektroporation in die Retina eingebracht. Nach einer Kultivierung in F12-Medium für 24 Stunden auf Substraten mit Laminin und Merosin bei 37°C, erfolgte eine weitere Kultivierung in F12-MZ „Plus“ Medium für weitere 48 Stunden bei 37°C. Nach der Kultivierung

und der Lebendzellfärbung mit einem Regenerationsschritt, wurden die Explantate fixiert und in Mowiol eingebettet.

Ein Abbildung 22 B ist ein exemplarisches Axon einer transfizierten retinalen Ganglienzelle dargestellt. Das eGFP unter der IRES ist hier, ähnlich wie in Abbildung 21 A, entlang des Axons sowie in der zentralen Domäne des Wachstumskegels zu erkennen. Dies bestätigt die erfolgreiche Transfektion mit mindestens einem der beiden Plasmid-Varianten. Eine Färbung mit dem zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 markiert hierbei deutlich das gesamte exprimierte *atten*. HaloTag-EphA3, welches sich entlang des Axons befindet und bis in den Wachstumskegel hinein reicht, sich hier jedoch weitestgehend auf die zentrale Domäne beschränkt (Abbildung 22 B, hellblaue Pseudofarbe). Eine gleichzeitige Färbung mit dem nicht-zellpermeablen SNAP-Liganden Janelia Fluor 646 für 15-30 min. bestätigt auch hier die simultane Expression beider Fusionsproteine in der gleichen retinalen Ganglienzelle (Abbildung 22 B, rote Pseudofarbe). Das extrazellulär zugängliche SNAP-ephrin-A5 ist ebenso entlang des Axons, sowie hauptsächlich in der zentralen Domäne der Wachstumskegel lokalisiert und wurde demzufolge nach der Lebendzellfärbung endozytiert. Ähnlich wie in co-transfizierten NIH 3T3 Zellen, überlagern die Fluoreszenz-Signale der fluoreszenten Halo- und SNAP-Liganden deutlich (Abbildung 22B, *Merge*), was auf eine mögliche Co-Lokalisation beider Fusionsproteine in retinalen Axonen und Wachstumskegeln schließen lässt. Auffallend war jedoch die Beobachtung, dass trotz optimierter Kulturbedingungen sowohl die Anzahl co-transfizierter RGCs als auch die Anzahl co-transfizierter Axone im Vergleich zu einer Transfektion mit nur einer Plasmid-Variante deutlich reduziert war (Reduktion um ca. 70%, Daten nicht gezeigt), weshalb diese Effizienz in zukünftigen Experimenten noch erhöht werden muss. Ein mögliches *Live Cell Imaging* co-transfizierter RGCs und deren Wachstumskegel mit *atten*. HaloTag-EphA3 und SNAP-Tag-ephrin-A5, wird in Abschnitt 5.7. diskutiert.

Zusammenfassend ist es damit in dieser Arbeit gelungen, retinale Ganglienzellen sowohl mit *atten*. Halo-EphA3 als auch SNAP-ephrin-A5 gemeinsam zu transfizieren und die simultane Expression beider rekombinanter Proteine in retinalen Axonen und Wachstumskegeln *in vitro* nachzuweisen. Dadurch war es möglich die subzellulären Dynamiken von *atten*. Halo-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 nach einer Lebendfärbung mit Halo- bzw. SNAP-Liganden in einem Live-Cell Imaging von NIH 3T3 Zellen simultan zu verfolgen und damit die Grundlage für eine spätere *Live Cell* Beobachtung in retinalen Wachstumskegeln zu schaffen.

4.7. Expansion retinaler Wachstumskegel mit *Expansion Microscopy*

Für die Visualisierung kleinster Strukturen, wie die hier betrachteten Vesikel oder frühe Endosomen deren Größe unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen, stehen heute hochentwickelte mikroskopische Methoden und Superresolution-Mikroskope zur Verfügung. Eine weitere, raffinierte Methode die Auflösung kleinstter Strukturen zu verbessern ohne dafür noch größere Anforderungen an die mikroskopische Hard- und Software stellen zu müssen,

findet sich in der Expansionsmikroskopie (*Expansion Microscopy*, ExM, siehe auch Abschnitt 3.8.). Hierbei wird ein quellbares Polymernetzwerk in ein biologisches Präparat infundiert und geeignete fluoreszente Marker bzw. fluoreszent-gekoppelte Antikörper chemisch kovalent an dieses gebunden. Nach proteolytischem Verdau organischer Bestandteile, bleiben die Fluorophore an den Positionen der markierten Struktur im Polymernetzwerk zurück, welches im Anschluss durch Inkubation in Wasser isotrop aufquillt. Die Positionen der Fluorophore im Hydrogel verschieben sich idealerweise auch isotrop und die Struktur wird somit physisch vergrößert und besser aufgelöst.

In ersten Experimenten der ExM wurden Retina-Explantate auf homogenen Laminin-Substraten kultiviert, anschließend fixiert und mit Phalloidin Alexa Fluor 488 angefärbt. Da Phalloidin für die Inkorporation in das Polymernetzwerk während der ExM ungeeignet ist, erfolgte eine weitere Färbung mit einem rabbit anti-Alexa Fluor 488 Primär- und einem donkey anti-rabbit Alexa Fluor 568 Sekundärantikörper und die anschließende Funktionalisierung von Aminen mit Acrylamid-Gruppen mit AcX. Nach Einbringen eines Acrylamid-Gels mit verschiedenen Konzentrationen Acrylamid (2%, 5%, 7%, 10%) und anschließendem proteolytischem Verdau mit Protease K, erfolgte die Expansion des Gels in destilliertem H₂O. Der detaillierte Ablauf des Prozesses ist im Methodenabschnitt 3.8. erläutert.

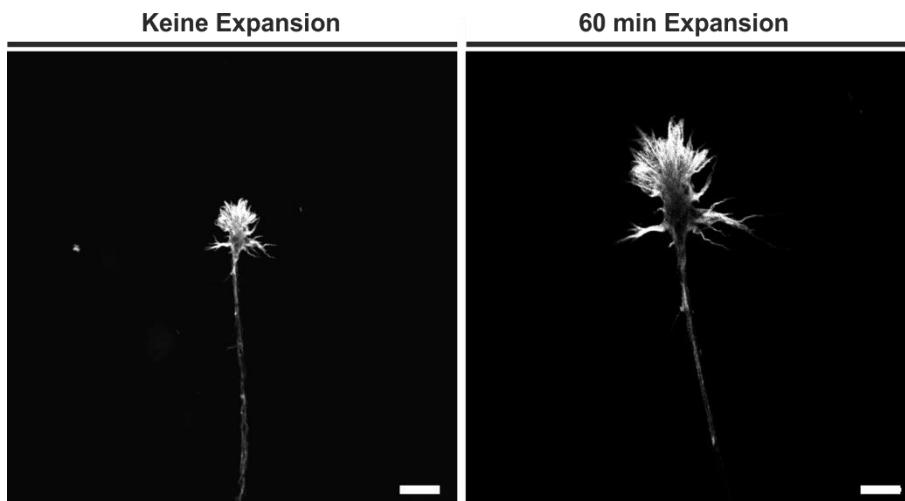


Abbildung 23: Expansionsmikroskopie (ExM)

Exemplarische Darstellung eines retinalen Wachstumskegels vor der Expansion (links) und nach Aufquellen eines Hydrogels mit 5% Acrylamid für eine Stunde in H₂O (rechts). Aktin-Zytoskelett gefärbt mit Phalloidin Alexa Fluor 488, rabbit anti-Alexa Fluor 488 Primär- und donkey anti-rabbit Alexa Fluor 568 Sekundärantikörper (weiße Pseudofarbe). Retina-Explantat nicht gezeigt. Fluoreszenzaufnahme aufgenommen mit einem Konfokalmikroskop LSM 800 (Zeiss). Maßstabsbalken: 20µm

Das Aufquellen des Hydrogels in H₂O dest. erfolgte sehr rasch. Der Grad der Expansion wird hierbei durch den Grad der Vernetzung des Hydrogels und damit durch den prozentualen Anteil von Acrylamid beeinflusst: je weniger Acrylamid eingesetzt wird, desto weicher und auch größer wird das aufgequollene Gel. Je mehr Acrylamid verwendet wird, desto fester wird es und kann weniger stark expandieren. In ersten Versuchen zeigte sich hierbei, dass ein Gel mit 5% Acrylamid-Anteil einen guten Kompromiss zwischen Expansion und der Handhabung des

relativ weichen Gels darstellt (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 23 ist ein exemplarischer Wachstumskegel einer retinalen Ganglienzelle sowohl vor, als auch nach der Expansion in einem Hydrogel mit 5% Acrylamid gezeigt. Es zeigt sich hierbei eindrucksvoll, eine etwa 3.5-fache Expansion des vorher fluoreszent-markierten Aktin-Zytoskeletts. Damit erweisen sich diese ersten Experimente und die Handhabung des hier gewählten Protokolls als erfolgreich. Nach weiterer Feinjustierung des gewünschten Expansionsgrades und der Auswahl geeigneter fluoreszenter Marker bzw. Antikörpern mit geeigneten Fluorophoren, stellt die ExM eine ideale Methode dar, um subzelluläre Strukturen im Nanometerbereich besser aufzulösen und mithilfe von hochauflösender Mikroskopie zu visualisieren. In Kombination mit Halo- bzw. SNAP-getaggten Lenkungsmolekülen steht damit eine wertvolle Methode zur Verfügung, um in Zukunft die molekularen Mechanismen axonaler Lenkung im Detail zu studieren und weitere Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen zu erhalten.

5 Diskussion

5.1. Die Bindungsaffinität zwischen EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc lässt sich reversibel reduzieren

Endozytierte Rezeptor-Liganden werden für deren Recycling an die Oberfläche in frühen Endosomen voneinander getrennt, wobei die leichte Ansäuerung in den Endosomen dabei vermutlich für eine Reduktion der Bindungsaffinität von Rezeptor und Ligand sorgt und die Auftrennung dieser Komplexe ermöglicht (Boissier et al., 2013). Für die Rekonstitution eines Gegengradienten aus EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc, wurde sich dieser Umstand einer reduzierten Bindungsaffinität zu Nutze gemacht. Um die Bindungskinetiken von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc in einem sauren pH-Wert zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Dissoziationskonstante zwischen EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc in einem sauren Natrium-Acetat Puffer (NaAc, pH 4) mithilfe von Bio-Layer Interferenz (BLI) gemessen und mit der Dissoziationskonstante in pH-neutralem *Binding Kinetics* Puffer verglichen. Da die Bindungskinetik von Proteinen u.a. von der Umgebungstemperatur abhängt, wurden an drei Tagen jeweils mehrere, voneinander unabhängige Messungen mit jeweils identischer Proteinkonzentration durchgeführt und die Messwerte anschließend gemittelt.

Eine Positivkontrolle der Interaktion von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc in pH-neutralem *Binding Kinetics* Puffer ergab eine Dissoziationskonstante K_d von 8.93×10^{-10} M und entspricht damit bereits bekannten Werten dieser Interaktionspartner (Cheng & Flanagan, 1994; Monschau et al., 1997; Noberini, Rubio de la Torre, et al., 2012). Dies bestätigt sowohl die Validität der BLI-Messung als auch die Funktionalität der hier verwendeten Lenkungsmoleküle. Eine Untersuchung der Bindungskonstanten in einem sauren pH-Milieu zeigt dabei, dass sich die Dissoziationskonstante von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc mit 7.05×10^{-7} M um das etwa 790-fache reduziert, was eine signifikant reduzierte Affinität der beiden Proteine im Vergleich zur Positivkontrolle darstellt. Gemeinsam mit der aufgetragenen Bindungskurve der gemittelten Messreihen spricht dies für eine fast vollständige Ablösung von EphA3-Fc von dem gekoppelten ephrin-A2-Fc (Abbildung 4).

Das Verschieben des pH-Wertes in einen sauren Bereich kann die Struktur und Konformation eines Proteins und damit auch seine Funktionalität beeinflussen (Boyken et al., 2019). Abhängig vom Ausmaß der Konformationsänderung kann diese eine irreversible Denaturierung zur Folge haben. Ob die in diesem Experiment reduzierte Bindungsaffinität ebenso durch einen irreversiblen Verlust der biologischen Aktivität bedingt ist, wurde durch eine Rückführung von gekoppeltem ephrin-A2-Fc aus einem sauren in ein neutrales pH-Milieu überprüft. Mit einer gemittelten Dissoziationskonstante von 3.53×10^{-10} M aus mehreren unabhängigen Messungen, konnte ich zeigen, dass die Dissoziationskonstanten nach der Rückführung wieder dem niedrigen Nanomolarbereich der Positivkontrolle und der Angaben der Literatur entspricht (Abbildung 4). Ebenso zeigt die Bindungskurve während des

Wechsels in den neutralen Puffer eine zur Positivkontrolle vergleichbare Assoziation und reduzierte Dissoziation von EphA3-Fc. Dies spricht dafür, dass das Senken des pH-Wertes zu einer signifikanten Reduktion der Bindungsaffinität von EphA3-Fc und ephrin-A2-Fc führt, welche nach einer Rückstellung auf einen neutralen pH-Wert vollständig reversibel ist.

Bei der Herstellung eines *in vitro* Gegengradienten durch das Aufstempeln von EphA3-Fc und anschließende Überschichtung mit ephrin-A2-mFc aus saurem Natrium-Acetat Puffer, konnte über fluoreszente Antikörperfärbungen die erfolgreiche Separation beider Proteine bestätigt werden (Abbildung 9). Die Ausbildung von sichtbaren Clustern im sauer applizierten ephrin-A2-Fc ist ein Phänomen, welches bereits in meiner Masterarbeit mit ephrin-A5-Fc in einem Phosphat-Citrat Puffer (pH 4) in retinalen Explantatkulturen beobachtet werden konnte (Ruisi, 2019). Trotz des Clusters beider ephrine durch Antikörper, traten solche sichtbaren Cluster lediglich in einem sauren und nicht in neutralem pH-Wert auf. Sowohl der saure pH-Wert des Phosphat-Citrat Puffers als auch der hier verwendete Natrium-Acetat Puffer scheinen einen Einfluss auf die Bildung größerer Protein-Antikörper Cluster zu haben. In meiner Masterarbeit konnte in Streifenassays weder mit EphA3-Fc noch ephrin-A5-Fc in saurem Citrat-Phosphat Puffer ein verändertes Lenkungsverhalten von temporalen bzw. nasalen Axonen im Vergleich zur Positivkontrolle in PBS beobachtet werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um ein ähnliches technisches Artefakt aufgrund des sauren pH-Wertes handelt und ein Einfluss auf die Lenkungsentscheidung von Axonen durch ein Aufbringen von ephrin-A2-Fc aus saurer Lösung und anschließende Rückführung in ein neutrales Milieu in dieser Arbeit nicht zu erwarten ist.

5.2. Verhalten retinaler Axone in Dreiecksgradienten

Für die Rekonstitution von Gegengradienten aus EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc *in vitro*, sollte in dieser Arbeit ein entsprechendes Stempeldesign für die Strukturierung einer Oberfläche mit beiden Lenkungsmolekülen etabliert werden.

Retinale Axone *in vitro* tendieren dazu nicht geradlinig, sondern auf einer nach nasal gekrümmten Bahn aus dem Explantat heraus zu wachsen (Rosentreter et al., 1998). Dies beeinträchtigt die Auswertung der Assays, da die Axone so zwar definierte Endpositionen aber unkontrollierte Pfade haben, was ihren Adaptationszustand beeinflusst. Dies hat z.B. die Interpretierbarkeit der Ergebnisse von v. Philipsborn erschwert (von Philipsborn et al., 2006). Um Axonen eine artifizielle, gerade Wuchsrichtung vorzugeben, wurde das Gradientendesign so gewählt, dass kontinuierlich breiter werdende Streifen längs und parallel zueinander angeordnet sind (Abbildung 5). Ein solcher „Dreiecks-Gradienten“-Stempel aus Polydimethylsiloxan (PDMS) lässt sich dabei wie eine klassische Streifenassay-Matrize für das *micro contact printing* verwenden (Abschnitt 3.6.1.).

An ihrer breitesten Seite weisen die Dreiecke mit einem gegenseitigen Abstand von jeweils 3 μ m eine Breite von 68 μ m und an ihrer schmalsten Seite mit einem Abstand von jeweils 48.8 μ m eine Breite von 2 μ m auf (siehe Abbildung 5). Hierdurch ergibt sich auf einer Fläche von 453 μ m x 7000 μ m eine kontinuierliche Variabilität der Streifenbreite, sowie eine umgekehrt proportionale Breite der Lücken. Auf diese Weise kann ein Protein über *micro contact printing* aufgebracht und der respektive Bindungspartner durch Überschichtung in einem sauren pH-Wert in den Lücken adsorbieren ohne dass beide Partner aneinander binden. Auf diese Weise kann ein kontinuierlicher Gegengradient aus zwei Proteinen *in vitro* entstehen.

Die Funktionalität eines solchen Dreiecksgradienten wurde durch Aufstempeln von 30 μ g/ml EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas mit retinalen Explantatkulturen *in vitro* getestet. Hier konnte sowohl mit temporalen als auch nasalen Axonen ein geradliniges Auswachsen entlang des Stempelfeldes beobachtet werden, womit sich das artifizielle Vorgeben einer Wuchsrichtung durch die Dreiecksstruktur als erfolgreich erwies. Gemäß unseres Modells würde man erwarten, dass Axone in *downhill* Richtung (mit abnehmender Breite der Gradientenstempel) bis an das andere Ende des Stempelfeldes hindurchwachsen. In *uphill* Richtung (mit zunehmender Breite der Gradientenstempel) würde erwartet werden, dass Axone stoppen sobald die wahrgenommene Konzentration von EphA3-Fc ihre Detektionsgrenze erreicht hat.

Es wurde beobachtet, dass nasale Axone bei *uphill*-Wachstum im ersten Drittel des Feldes die EphA3-Fc Dreiecke überwachsen, was vermutlich auf die lokal geringe Proteinkonzentration und dadurch ein *reverse signaling* unterhalb der Sensitivitätsschwelle zurückzuführen ist. Diese könnte zudem durch Adaptation erhöht sein. Mit zunehmender Breite der Dreiecke reagieren Wachstumskegel nasaler Axone zunehmend auf das Lenkungssignal und vermeiden die breiter werdende Proteinstreifen schließlich vollständig. Dieses Verhalten entspricht prinzipiell der erwarteten topographischen Reaktion nasaler RGCs, welche vermehrt ephrin-A exprimieren (Abbildung 1). Laut unseres Modells wäre jedoch keine repulsive Vermeidung der EphA3-Fc Streifen, sondern eine Stopreaktion der Axone und ihrer Projektion zu erwarten. Betrachtet man die entgegengesetzte Richtung von *downhill*-Wachstum, zeigen die Dreiecke eine starke repulsive Wirkung auf nasale Axone, was wiederum in Einklang mit deren erhöhter ephrin-A Expression und dem dadurch erhöhten *reverse signaling* steht. Axone die zuerst aus dem Retina-Explantat auswachsen überwachsen über eine sehr kurze Strecke die Dreiecke, wahrscheinlich durch eine starke Adaptation der Wachstumskegel gegen das EphA3-Fc. Da die Adaptation nasaler Wachstumskegel gegen EphA3-Fc in diesem Assay stärker ist als für temporale Axone und wahrscheinlich eine gewisse Zeit benötigt, könnte dies, trotz identischer Kultivierungsdauer, die insgesamt kürzeren Axone nasaler im Gegensatz zu temporalen RGCs erklären. Nach dem Austreten aus dem Gewebeverband durch die starke Adaptation und anschließende Verringerung des

wahrgenommenen Signals, nimmt vermutlich ebenso die Adaptation der Wachstumskegel ab und Axone beginnen stark auf die EphA3-Proteinstreifen zu reagieren und bewegen sich in den Zwischenstreifen ohne Protein weiter fort. Nachfolgende Axone wachsen vermehrt entlang bereits vorausgewachsenen Axonen, was zu einer starken Faszikulation der Axone in den schmalen Zwischenstreifen führt. Mit abnehmender Breite der Dreiecke verringert sich vermutlich die wahrgenommene EphA3-Fc Menge weiter und die repulsive Reaktion nimmt entsprechend ab, sodass nasale Axone schließlich beginnen die schmäler werdenden Strukturen zu überwachsen.

Temporale Axone verhalten sich in *uphill* Richtung auf ähnliche Weise wie nasale Axone, obwohl man aufgrund ihrer erhöhten EphA-Expression eine geringere Sensitivität auf die EphA3-Dreiecke vermuten würde und sie demzufolge erst auf sehr viel höhere lokale EphA3-Fc Konzentrationen bzw. breitere Dreiecke repulsiv reagieren sollten. Jedoch scheinen temporale Axone im gleichen Maße repulsiv auf EphA3 zu reagieren wie Axone der nasalen Population. In *downhill* Richtung reagieren temporale Axone zunächst weniger repulsiv auf die breiten Proteindreiecke und überwachsen diese von Beginn an. Erst ab etwa dem ersten Drittel des Feldes, mit entsprechend abnehmender Dreiecksbreite, zeigen die Axone eine Vermeidungsreaktion auf das repulsive EphA3-Fc und finden sich in den Zwischenlücken ein. In weiterer Folge überwachsen sie die Eph3-Fc Dreiecke nicht mehr. Dieses Verhalten könnte durch eine moderate Adaptation bzw. Desensitivierung der Wachstumskegel gegenüber EphA3-Fc erklärt werden. Die Adaptation beschreibt dabei eine Anpassung bzw. Verringerung der Sensitivität (Desensitivierung) von Wachstumskegeln gegenüber anhaltenden Signalen, wie beispielsweise von Lenkungsmolekülen.

Eine solche Desensitivierung gegenüber repulsiv wirkenden Lenkungsmolekülen wurde bereits von Rosentreter et al. (1998) beschrieben und später in sogenannten „Gap-Assays“ für isoliertes ephrin-A5-Fc und EphA3-Fc beobachtet (Fiederling, 2016; Fritz, 2012). In Gap-Assays werden retinale Explantate auf einem homogenen Proteinfeld kultiviert, welches durch eine schmale Lücke aus permissivem Laminin von einem zweiten homogenen Proteinfeld getrennt ist. Axone die auf dem ersten homogenen Proteinfeld auswachsen konnten die schmale Laminin-Lücke überqueren und auf dem zweiten homogenen Feld weiter wachsen, ohne an dessen Kante zu stoppen. Die Axone waren an das Lenkungsmolekül adaptiert. Wird die permissive Lücke jedoch vergrößert, kommt es in dieser zu einer Re-Sensitivierung der Wachstumskegel und Axone reagieren mit einer deutlichen Stopreaktion auf die Kante des zweiten Proteinfeldes (Fiederling, 2016; Fritz, 2012).

In dieser Arbeit könnte eine ähnliche Desensitivierung retinaler Axone auf EphA3-Fc in *downhill* Richtung der Dreiecksgradienten beobachtet worden sein. Temporale Axone scheinen während der anfänglichen Projektion das breite Proteinmuster zu ignorieren und erst später mit abnehmender Dreiecksbreite auf dieses zu reagieren. Ein möglicher Grund dafür

könnte eine Adaptation auf der fast homogenen Fläche aus EphA3-Fc sein, auf der das Retina-Explantat in *downhill* Richtung liegt, ähnlich zu der Situation in den oben genannten Gap-Assays (Abbildung 7 B). Die reduzierte Sensitivität temporaler Axone gegen EphA3-Fc bzw. *reverse signaling* aufgrund ihrer reduzierten Expression von ephrin-A, könnte durch die zusätzliche Adaptation auf dem Substrat verstärkt werden. Mit abnehmender Dreiecksbreite und zunehmender Breite der permissiven Zwischenstreifen, waren Wachstumskegel vermutlich in der Lage ihre Sensitivität gegen EphA3-Fc zurück zu erlangen und darauf repulsiv zu reagieren.

Bemerkenswert war die vollständig fehlende Stopreaktion sowohl temporaler als auch nasaler Axone in den Dreiecksgradienten-Assays mit EphA3-Fc. Eine solche konzentrationsabhängige Stopreaktion konnte Anne von Philipsborn an temporalen Axonen in ephrin-A5-Fc Gradienten-Assays mit größer werdenden Punktmustern beobachten (von Philipsborn et al., 2006). Eine solche Steigung der Konzentrationsänderung wurde in der vorliegenden Arbeit mit kontinuierlich breiter werdenden Dreiecken realisiert, um die Veränderung der relativen Proteinkonzentration zu simulieren. Statt jedoch an einer distinkten Position zu stoppen, projizierten Axone häufig bis an das schmalste Ende der permissiven Zwischenstreifen. Ihre Wachstumskegel wurden dabei stark verschmälert, vermutlich um die Kontaktfläche zu dem repulsiven EphA3-Fc zu minimieren. Diese Repulsion löste jedoch nicht, wie bei von Philipsborn, eine klare Stopfront der Axone aus, sondern ausschließlich eine Repulsion an den Kanten der Dreiecke. Ebenso folgten später ausgewachsene Axone den ersten Axonen, welche sich in die dünnen Spalten ohne Protein zwängten. Zu erklären wäre dieses Verhalten durch die steigende Bedeutsamkeit einer Axon-Axon Interaktion gegenüber einer Axon-Target Interaktion mit dem Gradienten-Muster. Ein benachbartes Axon aus der Retina stellt immer ein ideales Target für einen Wachstumskegel dar und je dichter Wachstumskegel benachbarter RGCs zusammengedrängt werden, desto mehr Einfluss gewinnt die Axon-Axon Interaktion. Ein ähnliches Verhalten kann auch in Experimenten von v. Rosentreter beobachtet werden: in seiner Arbeit beschreibt er eine Stopreaktion von Axonen an einer distinkten Stelle in einem linearen Gradienten aus taktalen Membranen (Rosentreter et al., 1998). Vermutlich ist aber auch hier lediglich eine Ausweichreaktion, mit anschließender Faszikulation von Axonen zu beobachten. Eine Ausweichreaktion an Protein- oder Membranstreifen stellt damit im Grunde erneut eine binäre und nicht graduierte Lenkungsentscheidung dar. Mit einem durchschnittlichen Durchmesser eines Wachstumskegels retinaler RGCs des Huhns von $15-20\mu\text{m}$ ist es höchstwahrscheinlich notwendig, das Design des Dreiecksgradienten-Assays anzupassen. Die derzeitige Breite der Dreiecke von $68\mu\text{m}$ bzw. $48.8\mu\text{m}$ in dem aktuellen Design sind damit weit größer als die Wachstumskegel selbst und könnte die Wahrnehmung einer kontinuierliche Konzentrationsänderung erschweren. Eine Reduktion der Dreiecksbreite würde zwar ein Abflachen der Konzentrationssteigung bedeuten, jedoch auch gewährleisten, dass

Wachstumskegel während der Lenkung zu jedem Zeitpunkt eine Änderung der relativen EphA3-Fc Konzentration auf ihrer gesamten Fläche wahrnehmen. Insbesondere für das Zufügen von ephrin-A2-mFc in einem *in vitro* Gegengradienten ist es essentiell, dass ein Wachstumskegel auf seiner Fläche beide Lenkungsmoleküle simultan wahrnehmen kann.

Die Untersuchung des Lenkungsverhaltens retinaler Axone in einem Dreiecksgradienten-Assay aus sauer appliziertem ephrin-A2-mFc und einer Rückführung in ein neutrales pH-Milieu war in dieser Arbeit nicht ohne weiteres möglich. Die dabei aufgetretenen Schwierigkeiten werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.3. Wiederherstellung von inhibiertem Axonwachstum auf ephrin-A2-mFc nach pH4

Ein saurer Phosphat-Citrat Puffer bei pH 4 fand bereits in der Vergangenheit in Streifenassays zur Untersuchung des Einflusses von sauer aufgebrachtem ephrin-A5-Fc auf axonales Lenkungsverhalten Verwendung (Ruisi, 2019) und wurde auch zu Beginn der vorliegenden Arbeit für die Herstellung von EphA3/ephrin-A2-mFc Gegengradienten-Assays und die anschließende Untersuchung axonaler Lenkungsentscheidungen *in vitro* verwendet. Hierfür wurde wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, der PDMS Stempel mit EphA3-Fc inkubiert und das Stempelmuster anschließend auf epoxysilanisiertes Glas übertragen. Die leeren Zwischenstreifen wurden durch einen *backfill* mit ephrin-A2-mFc in saurem Puffer beschichtet und nach gründlichen Waschschritten mit HBSS mit 20 μ g/ml Laminin inkubiert und Explantat-Streifen auf dem Assay kultiviert.

Hierbei ergab sich während der Kultivierung eine unerwartete und erhebliche Schwierigkeit: unabhängig davon ob EphA3-Fc oder reines Fc-Fragment als Kontrolle gestempelt wurde, blieb in mehr als 14 unabhängig voneinander präparierten Retinae eine axonale Projektion retinaler Ganglienzellen in Kultur vollständig aus, sobald das gestempelte EphA3-Muster mit ephrin-A2-mFc in saurem Phosphat-Citrat Puffer überschichtet und anschließend in ein neutrales Milieu überführt wurde (Abbildung 10). Wie kann dieser drastische Effekt zu erklären sein? Bei genauerer Betrachtung fixierter Explantat-Streifen in einem solchen Setup konnte in allen Fällen eine deutliche, linienförmige Begrenzung in oder auf dem retinalen Gewebe erkannt werden (Abbildung 10, Vergrößerung). Es wird vermutet, dass es sich hierbei um Axone retinaler Ganglienzellen handelt, die den Gewebeverband nicht verlassen und entlang der Basallamina der Retina auswachsen. Das heißt, dass die Retina-Explantate zwar intakt sind und die retinalen Ganglienzellen Axone ausbilden können, diese jedoch nicht auf das Substrat übertreten können. Antikörperfärbungen gegen Laminin zeigten keine ausreichende Evidenz dafür, dass sich insgesamt weniger Laminin auf dem Assay mit sauer überschichtetem ephrin-A2-mFc als in einer Kontrolle mit PBS befand (Daten nicht gezeigt). Dies lässt nicht auf eine reduzierte Bindung von Laminin und ein damit inhibiertes Auswachsen von Axonen schließen.

Es ist unbestreitbar, dass ein saurer pH-Wert nicht der physiologischen Umgebung von Proteinen wie EphA und ephrin-A *in vivo* entspricht. Obwohl beide Proteine von einem sauren in ein neutrales pH-Milieu zurückgeführt wurden und auch deren regenerierte Bindungsfähigkeit in den BLItz-Messungen bestätigt werden konnte (Abschnitt 4.1.1), kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass eine Wechselwirkung des Phosphat-Citrat Puffers mit der epoxysilanisierten Glasoberfläche vorliegt oder es einen zusätzlichen Faktor gibt, der einen inhibierenden Effekt auf das Axonwachstum haben könnte. Da jedoch eine Azidifizierung unumgänglich für die Rekonstitution eines *in vitro* Gegengradienten aus Rezeptor und Ligand ist, habe ich für alle folgenden Experimente Natrium-Acetat als alternatives Puffersystem für die Überschichtung von ephrin-A2-mFc in pH4 gewählt. Trotz eines vergleichsweise verzögerten Auswachsens retinaler Axone, stellte alleine der Wechsel des Puffersystems eine signifikante Verbesserung in der Kultivierung retinaler Axone in Streifenassays mit sauer überschichtetem Protein dar. Unklar bleibt dabei, welcher Faktor des Phosphat-Citrat Puffers den immensen wachstumsinhibierenden Effekt auf Axone auslöste. Obwohl der Phosphat-Citrat Puffer als geeignet für die Verwendung in biochemischen und molekularbiologischen Anwendungen gilt, ist ein möglicher Einfluss z.B. der Citrat-Ionen in der *in vitro* Zellkultur nicht von der Hand zu weisen. Möglicherweise bilden die Epoxygruppen der aktivierte Glasoberfläche mit dem Citrat des Puffers einen Zitronensäureester, wodurch sich durch die zwei weiteren Säuregruppen des Citrats eine im neutralen Milieu negativ geladene Oberfläche bildet, welche das Axonwachstum negativ beeinflusst.

Wegen des immer noch verzögerten Auswachsens adressierte eine weitere Modifikation zur Wiederherstellung der axonalen Projektion die Lamininbeschichtung. In Untersuchungen der dynamischen Konformationsänderungen von Laminin-Isoformen mittels *High-Speed Atomic Force Microscopy* (HS-AFM) zeigte Akter et al., dass sich die kurzen Arme der α -, β - und γ -Ketten von Laminin bei pH 3.5 verstärkt versteifen und aggregieren. In Folge dessen verlieren die meisten Laminin-Moleküle ihre physiologische, kreuzförmige Konformation in einem sauren pH-Milieu (Akter et al., 2024). Da sich ein Laminin-Layer über eine Verknüpfung seiner kurzen Arme ausbildet, könnte die veränderte Flexibilität der Ketten einen möglichen negativen Einfluss auf die Assemblierung eines Laminin-Layers haben (McKee et al., 2021).

In dieser Arbeit wurde das sauer applizierte ephrin-A2-mFc mehrmals gründlich mit HBSS gewaschen und der saure Puffer wurde entfernt. Ebenso wurde der Umschlag von einem sauren in einen neutralen pH-Wert Bereich durch das enthaltene Phenolrot des HBSS sichergestellt. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass die im Anschluss überschichteten Laminin-Moleküle noch in Kontakt mit dem sauren Puffer kamen und sich das fehlende Axonwachstum durch eine Konformationsänderung des Laminins erklären lässt. Da anti-Laminin Antikörper jedoch auch Laminin-Moleküle mit veränderter Konformation binden können und aus diesem Grund keine Rückschlüsse auf die Funktionalität des Laminins

zulassen, wurde eine zwar unwahrscheinliche aber dennoch mögliche Beeinflussung des Laminins in Betracht gezogen. Da die Basallamina des Auges *in vivo* nicht ausschließlich aus einer Laminin-Isoform besteht, wurde für die Beschichtung von *in vitro* Assays mit Laminin (Laminin-111) noch Merosin (Laminin-211) zugefügt. Diese Laminin-Isoform wird in experimentellen Zusammenhängen verwendet, in welchen die Induktion und Struktur von Neuriten eine besondere Relevanz hat (Adnan et al., 2020; Goldberg et al., 2002; Marler et al., 2014). Die Inkubationszeit beider Laminin-Isoformen auf Assays mit ephrin-A2-mFc aus saurer Lösung, wurde außerdem um das Zwei- bis Dreifache erhöht, um die Verschiebung des kinetischen Gleichgewichts zugunsten eines intakten Laminin-Netzwerkes über die Zeit zu gewährleisten.

Die Modifikationen der experimentellen Bedingungen durch einen Austausch des sauren Puffersystems und eine veränderte Lamininbeschichtung führten in Kombination in der Tat zu einer vollständig wiederhergestellten Projektion von RGCs Axonen in Streifenassays mit sauer überschichtetem ephrin-A2-mFc *in vitro* (Vergleich Abbildung 10 und Abbildung 12). Die Ergebnisse der ephrin-A2-mFc Streifenassays werden im nächsten Abschnitt im Detail diskutiert.

5.4. Einzel- und Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas

5.4.1. Ephrin-A2-mFc löst nach Rückführung aus saurer Lösung gradiertes und differentielles *forward signaling* aus

Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und der vergleichsweise klaren Interpretation binärer Lenkungsentscheidungen (wird ein Protein vermieden oder nicht vermieden), wurden die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Experimente zur Wiederherstellung der axonalen Projektion auf Streifenteppichen mit 90µm Streifenbreite durchgeführt. Um einen gradiert repulsiven Einfluss von ephrin-A2-mFc auf Axone retinaler Ganglienzellen zu untersuchen, wurden ebenso Einzelstreifen-Assays mit 90µm Streifenbreite mit 16, 12, 8, 4 und 2µg/ml ephrin-A2-mFc und entsprechend zu 16µg/ml ephrin-A2-mFc äquimolaren Fc-Zwischenstreifen auf epoxysilanisiertem Glas durchgeführt. Die Verringerung der ephrin-A2-mFc Konzentration dürfte hierbei nicht zwangsläufig dazu führen, dass weniger Moleküle an die Oberfläche binden, da die Proteinbindung maßgeblich von kinetischen Einflüssen abhängig ist. Da die Proteinbindung auf epoxysilanisiertem Glas kovalent und irreversibel ist, würden, sofern die Bindungskinetik des Proteins schnell gegenüber der Inkubationszeit ist, unabhängig von der Konzentration immer alle Bindungsstellen besetzt werden. Um eine Kompetition um die Bindestellen der Oberfläche zu ermöglichen, und die Gesamtzahl in der Lösung auf dem Niveau von 16µg/ml ephrin-A2-mFc beizubehalten, wurde eine entsprechende Menge Fc-Fragment zu den ephrin-A2-mFc Verdünnungen beigemischt. In einer Positivkontrolle mit ephrin-A2-mFc in PBS konnte eine gradierte Abnahme der repulsiven Antwort temporaler Axone beobachtet werden, welche signifikant mit

der Reduzierung der Proteinkonzentration korrelierte (Abbildung 11). In entsprechenden Einzelstreifen-Assays mit Konzentrationsreihen aus sauer überschichtetem ephrin-A2-mFc löste das Protein eine repulsive Antwort temporaler Axone aus, die für 16 und 12 μ g/ml vergleichbar mit der Positivkontrolle sind, jedoch bei 8 μ g/ml eine signifikant stärkere Repulsion auslöst ($p=0.008$, Abbildung 12). Insgesamt ist auch hier eine gradiente Abnahme der Repulsion mit der entsprechenden Reduzierung der Proteinmenge korreliert. Dieses gradiente Verhalten steht in Einklang mit unserem Modell, in welchem ein geringeres Signal (hier durch eine geringere Konzentration des Proteins) ein geringeres Lenkungspotential hat und damit ebenso zu einer geringeren Repulsion führt.

In der hier vorliegenden Arbeit ist in Streifen-Assays aus ephrin-A2-mFc auf epoxysilanisiertem Glas auch eine deutliche Repulsion nasaler Axone durch ephrin-A2-mFc zu beobachten, welche ebenso mit der jeweils eingesetzten Proteinmenge korreliert (Abbildung 12 B). Des Weiteren reagieren Axone nasaler RGCs signifikant schwächer repulsiv auf 16, 12 und 8 μ g/ml ephrin-A2-mFc als temporale Axone. Ephrin-A2-mFc hat demnach einen topographisch differentiellen Einfluss auf retinale Axone ($p=0.005$, 0.44 und 0.025, Abbildung 12 B). Nasale RGCs exprimieren vermehrt ephrin-A und weniger EphA als temporale RGCs, was nasale Wachstumskegel aufgrund des reduzierten *forward signalings* weniger sensitiv gegenüber ephrin-A2-mFc macht (Hornberger et al., 1999; Monschau et al., 1997). Es ist demnach zu erwarten, dass nasale sowie temporale Populationen retinaler Axone topographisch differentiell auf ephrin-A2-mFc reagieren. Hornberger konnte in ephrin-A2-mFc Streifenassays eine *forward-like* Entscheidung nasaler Axone durch eine Behandlung der retinalen Kulturen mit Phospholipase C induzieren. Diese spaltet GPI-verankerte Proteine wie ephrin-A2 von der Zellmembran ab und inhibiert auf diese Weise die Weiterleitung des *reverse signalings*. In weiterer Folge sind nasale Axone, ähnlich wie temporale Axonpopulationen, sensitiver für *forward signaling*. Da in der hier vorliegenden Arbeit ephrin-A2-mFc kovalent an epoxysilanisiertes Glas gebunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktion nasaler Axone in dieser Arbeit durch eine real höhere Proteinmenge zustande gekommen ist als in Experimenten von v. Hornberger. Eine solche Verschiebung in Richtung eines dominierenden *forward signalings* könnte, ohne die Entfernung des attenuierenden axonalen Liganden wie bei Hornberger, die erhöhte Sensitivität nasaler Axone in diesem Assay erklären.

5.4.2. EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas zeigen keine axonale Lenkung

Das Modell der retinotektaalen Projektion nach Gebhardt et al. (Abschnitt 1.5.) prognostizierte Lenkungsverhalten retinaler Axone in einem Doppelstreifen-Assay aus alternierenden EphA/ephrin-A Streifen gemäß ihrer molekularen Identität in einer binär topographisch korrekten Weise: da nasale RGCs viel ephrin-A und wenig EphA exprimierten, würden diese

aufgrund erhöhten *reverse signalings* Streifen aus EphA meiden und bevorzugt auf Streifen aus ephrin-A wachsen (*reverse-like*). Entsprechend würden temporale RGCs aufgrund ihrer vermehrten EphA Expression und erhöhtem *forward signaling*, Streifen aus EphA- gegenüber ephrin-A bevorzugen (*forward-like*). Diese *in silico* Prognose konnte Gebhardt mit Retina-Explantaten *in vitro* Doppelstreifen-Assays mit alternierenden und 90µm breiten EphA3-Fc und geclustertem ephrin-A2-mFc Streifen auf Polystyrol rekonstituieren und damit die Simulationsergebnisse des Models in 15 aus 77 unabhängigen Doppelstreifen-Assays zeigen (Gebhardt, 2009). Eine topographisch richtige Entscheidung retinaler Axone in Doppelstreifen-Assays war dabei insbesondere von einem bestimmten Konzentrationsverhältnis von EphA3-Fc zu ephrin-A2-mFc geprägt: In hohen Konzentrationen von EphA3-Fc neben niedrigen Konzentrationen von ephrin-A2-mFc, reagierten Axone mit einer *forward-like* Entscheidung gegen EphA3-Fc und wuchsen auf ephrin-A2-mFc Streifen. Im umgekehrten Fall von niedrigen EphA3-Fc und hohen ephrin-A2-mFc Konzentrationen, entschieden sich Axone *reverse-like* gegen die ephrin-A2-mFc Streifen und bevorzugten die EphA3-Fc Streifen. Bei dem Versuch eine binär topographisch richtige Entscheidung der Axone durch eine dazwischenliegende Konzentration von EphA3-Fc zu ephrin-A2-mFc (hier 30µg/ml EphA3-Fc zu 16µg/ml ephrin-A2-mFc) auszulösen, konnte in 20% der Doppelstreifen-Assays ein binär topographisch richtiges Verhalten beobachtet werden. Erstaunlicherweise jedoch, wurde in keinem von nahezu 80 Doppelstreifen-Assays ein „anti-topographisches“ Lenkungsverhalten (nasale Axone auf EphA3-Fc und temporale Axone auf ephrin-A2-mFc) beobachtet. Dies spricht dafür, dass es sich bei den Unterschieden in den Lenkungsentscheidungen um technische Schwankungen aufgrund von Inhomogenitäten des Streifenmusters innerhalb des Assays handelt und ein sehr empfindliches Gleichgewicht von tatsächlich aktivem Protein gegeben sein musste, um eine binär topographisch richtige Entscheidung retinaler Axone hervorzurufen (Gebhardt et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde der experimentelle Ansatz der EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays von Gebhardt adaptiert und die Herstellung der kontinuierlichen Gegengradienten bzw. Doppelstreifen-Assays durch Stempeln von 30µg/ml EphA3-Fc in PBS und Überschichtung von 16µg/ml geclustertem ephrin-A2-mFc in NaAc (pH4) auf epoxysilanisiertem Glas mit Laminin/Merosin hergestellt.

In mehreren unabhängigen Versuchen konnte hierbei beobachtet werden, dass temporale Axone sowohl auf EphA3- (55.3%) als auch auf ephrin-A2-mFc (44.7%) Streifen wachsen und demnach keine eindeutige Lenkungsentscheidung aber die Tendenz zu einer Entscheidung gegen ephrin-A2-mFc vorliegt. Dem gegenüber entschieden sich 60% der nasalen Axone für EphA3-Fc und lediglich 40% für Streifen aus ephrin-A2-mFc, was sogar einen signifikanten Anteil nasaler Axone ausmacht, die repulsiv auf ephrin-A2-mFc reagieren und damit eine binär topographisch falsche und *reverse-like* Entscheidung treffen. Aufgrund der molekularen

Identität der RGCs würde man erwarten, dass sich ihre Axone aufgrund des erhöhten *reverse signalings* gegen das gestempelte EphA3-Fc und stattdessen für das überschichtete ephrin-A2-mFc (*forward-like*) entscheiden würden, wie es auch in früheren Experimenten von Gebhardt gezeigt werden konnte. Da sich das ephrin-A2-mFc in Einzelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas als biologisch aktiv erwies (Abbildung 11 und 12), wird vermutet, dass die *forward-like* Entscheidung nasaler und tendenziell auch temporaler Axone im Doppelstreifenassay durch eine reduzierte Aktivität von EphA3-Fc auf dem epoxysilanisiertem Glas verursacht wird. Das aktive ephrin-A2-mFc dagegen könnte durch dominierendes *forward signaling* zu einer Verschiebung der topographischen Entscheidung führen. Diese Vermutung wird von Ergebnissen von Gebhardt gestützt, in welchen eine niedrige Konzentration von EphA3-Fc gegen eine höhere Konzentration von ephrin-A2-mFc in Doppelstreifen-Assays eine *forward-like* Lenkungsentscheidung retinaler Axone auslöste (Gebhardt et al., 2012; Gebhardt, 2009).

5.4.3. EphA3-Fc löst auf epoxysilanisiertem Glas kein *reverse signaling* aus

Nachdem in Doppelstreifenassays aus EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc kein binär topographisch richtiges Lenkungsverhalten retinaler Axone beobachtet werden konnte und ephrin-A2-mFc biologisch aktiv zu sein scheint, wurde eine verminderte biologische Aktivität von EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas vermutet. Mit Einzelstreifen-Assays einer Konzentrationsreihe aus 30, 20, 15, 10 und 5 μ g/ml EphA3-Fc in PBS wurde dieser Verdacht mit sowohl temporalen als auch nasalen Explantat-Kulturen überprüft. Um die Gesamtzahl in den jeweiligen Verdünnungen auf dem Niveau von 30 μ g/ml EphA3-Fc beizubehalten, wurde eine entsprechende Menge Fc-Fragment äquimolar zugemischt, sowie die Zwischenstreifen des Musters damit aufgefüllt (*backfill*). In keiner der genannten Bedingungen konnte jedoch eine klar repulsive Lenkungsentscheidung retinaler Axone beobachtet werden (Abbildung 14 A). Der nur schwache Trend einer repulsiven Lenkungsentscheidung ist dabei nicht mit der eingesetzten Proteinmenge korreliert (Abbildung 14 B). Obwohl quantitativ ein leicht repulsiver Trend bei sowohl bei temporalen als auch nasalen Axonen erkennbar ist, kann dieser keine statistische Signifikanz erreichen. EphA3-Fc löst auf epoxysilanisiertem Glas weder eine graduierte, noch topographisch differentielle Lenkung in retinalen Wachstumskegeln aus. Da die generelle Funktionalität der in dieser Arbeit verwendeten EphA3-Fc Ektodomäne mit Bio-Layer Interferometrie (BLI) Messungen eindeutig bestätigt werden konnte (Abbildung 4), bestand die Vermutung, dass das Protein durch die kovalente Bindung an das epoxysilanierte Glas möglicherweise inaktiviert wurde und kein *reverse signaling* in Wachstumskegeln auslösen kann.

Neben der BLI-Messung in der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Funktionalität von EphA3-Fc bereits in Streifenassays vergangener Arbeiten mit retinalen Explantatkulturen *in vitro* gezeigt und mehrmals bestätigt. (Fiederling, 2012; Gebhardt, 2009; Ruisi, 2019).

Hierbei ist jedoch besonders hervorzuheben, dass es dabei Unterschiede bei der Wahl der Oberflächensubstrate gab, welche im Folgenden kurz erläutert werden: So ließ Gebhardt beispielsweise in seinen Experimenten EphA3-Fc aus der Lösung heraus auf Polystyrol adsorbieren, nachdem er einen Verlust der biologischen Aktivität des Proteins durch den Stempelvorgang beschrieben hatte (Gebhardt, 2009). Diese Inaktivierung wurde vermutlich durch eine Konformationsänderung oder Denaturierung des Proteins an das hydrophobe Polystyrol verursacht (Butler, 2000). Butler beschreibt in seiner Arbeit außerdem die Bildung eines inaktiven bzw. denaturierten Protein-Monolayers auf Polydimethylsiloxan (PDMS), welches zentraler Bestandteil sämtlicher Silikonmatrizen in den beschriebenen Assays ist. Diese könnte somit eine zusätzliche Möglichkeit der Inaktivierung bzw. Denaturierung bieten, welche die Beobachtungen von Gebhardt erklären würden. Fiederling dagegen gelang es schließlich biologisch aktives EphA3-Fc über eine PDMS-Matrize auf epoxysilanisiertes Glas mit Poly-L-Lysin (PLL) Beschichtung aufzustempeln und so eine repulsive Reaktion retinaler Axone auszulösen (Fiederling, 2012, 2016). Möglich war dies vermutlich durch die Bildung eines „Multilayers“ aus aktivem EphA3-Fc über dem ersten, denaturierten, Monolayer des Proteins auf der Silikonmatrize (Butler, 2000). Dadurch könnte funktionales EphA-Fc von dem Stempel an den PLL-Layer übertragen werden und somit als aktives Lenkungsmolekül im Streifenassay zur Verfügung stehen. Eine Bindung des Proteins an PLL wird dabei insbesondere über nicht-kovalente Ionen-Bindungen seiner Lysine vermittelt.

Für die Rekonstitution eines *in vitro* Gegengradienten aus EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc ist die Verwendung eines sauren Puffers und damit eine kovalente Bindung der Lenkungsmoleküle an die Oberfläche unerlässlich, da sonst im Sauren ein Ablösung erfolgt (Daten nicht gezeigt). Ein Grund für die verminderte Aktivität von EphA3-Fc sowohl in den Doppelstreifen-Assays, als auch in den EphA3-Fc Konzentrationsreihen der Einzelstreifen-Assays in dieser Arbeit, könnte die partielle oder vollständige Denaturierung des Proteins an der epoxysilanisierten Oberfläche sein. EphA3-Fc könnte über mehrere Aminogruppen seiner Oberfläche an die Epoxygruppen des behandelten Glases binden, wobei die Ausbildung mehrerer Kontaktstellen zu einer Entfaltung der Proteinstruktur führen und damit die aktiven Bindestellen des Proteins bzw. seine biologische Funktionalität beeinträchtigt oder gar vollständig zerstört wird (Latour, 2020). Es ist hierbei zu beachten, dass EphA3-Fc in Einzelstreifen-Assays, anders als in den Doppelstreifen-Assays, nicht mit dem sauren NaAc-Puffer in Kontakt kam und auch die BLItz-Messungen nichts über die Säurestabilität des EphA3-Fc aussagen. Dennoch scheint es in einem neutralen pH-Milieu in EphA3-Fc Einzelstreifen-Assays inaktiv zu sein, was die vorher bestandene Möglichkeit ausschließt, dass diese Inaktivität erst durch ein saures pH-Milieu ausgelöst wurde.

Ob die Arbeitshypothese haltbar ist, dass Epoxysilanisierung der Glasoberfläche zu einer Inaktivierung von EphA3-Fc führt, wurde durch eine irreversible Denaturierung des Proteins

durch Hitze überprüft. Dies war nötig, da sich in früheren Arbeiten gezeigt hatte, dass die Axone teilweise auch von denaturierten Proteinen abgestoßen wurden. Hierfür wurden die axonalen Lenkungsentscheidung in EphA3-Streifenassays aus 30µg/ml denaturiertem EphA3-Fc mit der Positivkontrolle mit nativem EphA3-Fc verglichen. Anders als in bisherigen Einzelstreifen-Assays bzw. Konzentrationsreihen, wurde vor der Lamininbeschichtung des Musters auf einen *backfill* der Zwischenstreifen mit Fc-Fragment verzichtet. Dies führt zu einer erhöhten Laminin-Konzentration in den Zwischenstreifen. Die in der Positivkontrolle im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen beobachtete Repulsion retinaler Axone (Abbildung 15) könnte damit auf eine Bevorzugung der permissiven Laminin-Streifen, statt auf einer Repulsion durch EphA3-Fc zurückzuführen sein (Luckenbill-Edds, 1997). Eine Bevorzugung von permissiven Laminin-Streifen kann jedoch durch sämtliche bestehenden Fc-Kontrollen (Fc vs. Laminin; hier nicht gezeigt) ausgeschlossen werden, in welchen sich ebenso ausschließlich Laminin in den Zwischenstreifen befindet und keine axonale Entscheidung beobachtet wird. Damit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Lenkungsentscheidung in der Positivkontrolle um eine echte Repulsion durch EphA3-Fc handeln könnte. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass die Repulsion der Axone durch eine Hitzeinaktivierung des Proteins vollständig aufgelöst wird, ohne dass dabei eine Bevorzugung der Laminin-Streifen erkennbar ist (Abbildung 15). Daraus lässt sich schließen, dass EphA3-Fc durchaus einen repulsiven Effekt hat, dieser jedoch lediglich bei einem starken Kontrast von permissivem zu repulsiven Streifen eine eindeutige Lenkungsentscheidung auslösen kann. Durch einen *backfill* mit Fc-Fragment in den bisherigen Einzelstreifen-Assays und Konzentrationsreihen wird dieser offenbar notwenige Kontrast vermutlich so stark abgeflacht, dass die subtile repulsive Aktivität von EphA3-Fc trotz des angedeuteten Trends nicht quantitativ erfasst werden kann.

Des Weiteren kann keine eindeutige Aussage über die tatsächliche Menge von aktivem EphA3-Fc auf der Oberfläche durch z.B. fluoreszente Antikörper getroffen werden, da diese ebenso denaturiertes Protein binden und damit keine verlässliche Aussage zulassen.

Die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse verdeutlichen die hohe Komplexität der Übertragung von funktionalen Proteinen auf eine Oberfläche und gleichzeitig ihre sehr individuelle, technische Fehleranfälligkeit. Aus diesem Grund war es unbedingt erforderlich die scheinbar fehlende Differentialität sowie die fehlende graduelle Abstufung und unzureichend repulsive Wirkung von EphA3-Fc als technisches Artefakt, durch eine mögliche Inaktivierung auf der Oberfläche auszuschließen.

5.5. Einzel- und Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit Poly-L-Lysin und DSC-Linker

5.5.1. In Doppelstreifen-Assays wirkt EphA3-Fc auf PLL / DSC überaktiv auf retinale Axone

Die Verwendung eines sauren Puffers bei der Herstellung von Gegengradienten- oder Doppelstreifen-Assays durch Überschichtung von ephrin-A2-mFc kann ein Ablösen der Proteine von der Oberfläche zur Folge haben und macht deren kovalente Bindung an die Oberfläche nötig. Die im vorherigen Abschnitt beschriebene mögliche Entfaltung von Proteinen durch die Ausbildung multipler Bindestellen auf polaren Oberflächen (hier Epoxyd) wurde in der vorliegenden Arbeit durch eine zusätzliche Modifikation der Glasoberfläche adressiert. Um eine direkte kovalente Kopplung von EphA3-Fc an die epoxysilanisierte Oberfläche zu vermeiden wurde zunächst Poly-L-Lysin (PLL) als Zwischenlayer kovalent an das epoxysilanisierte Glas gebunden und anschließend Disuccinimidylcarbonat (DSC) als zusätzlicher, homodifunktionaler Crosslinker verwendet. Dieser bindet mit einer Aktivestergruppe kovalent an den PLL-Layer und mit seiner zweiten aktiven Estergruppe das anschließend aufgestempelte EphA3-Fc. Da die Oberflächendichte von Lysinresten auf dem PLL-Layer vermutlich geringer ist als die von Epoxygruppen auf epoxysilanisiertem Glas, wird EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc wohl über weniger Reste kovalent an die Oberfläche gebunden und damit die Wahrscheinlichkeit einer Konformationsänderung bzw. Inaktivierung durch Auffalten der Proteinstruktur reduziert. Außerdem ist das Lenkungsprotein durch die PLL-Zwischenschicht wahrscheinlich weiter von der Oberfläche entfernt und damit sterisch besser zugänglich

In Doppelstreifenassays aus 30 μ g/ml EphA3-Fc und 16 μ g/ml geclustertem ephrin-A2-mFc, ergab sich ein deutlich unterschiedliches Ergebnis axonaler Lenkungsentscheidungen im Gegensatz zu epoxysilanisiertem Glas: 71% sowohl nasaler als temporaler Axone vermeiden signifikant die EphA3-Fc Streifen und wachsen bevorzugt auf ephrin-A2-mFc Streifen (im Gegensatz zu ca. 44% bzw. 55% im Doppelstreifen-Assay auf epoxysilanisiertem Glas). Dies macht einen deutlich verstärkten repulsiven Effekt von EphA3-Fc auf retinale Axone aus (Abbildung 16). Während für Axone der nasalen Population eine erwartete und binär topographisch korrekte Entscheidung gegen EphA3-Fc und für ephrin-A2-mFc vorliegt, ist die Lenkungsentscheidung temporaler Axone topographisch inkorrekt und entspricht einer *reverse-like* Entscheidung. Diese könnte durch die optimierte Bindung von EphA3-Fc in einer nun biologisch funktionalen Form auf der epoxysilanisierten Oberfläche mit PLL und DSC ausgelöst worden sein.

Eine andere Interpretationsmöglichkeit für dieses Ergebnis, wäre der Verlust der biologischen Aktivität von ephrin-A2-mFc auf der modifizierten Oberfläche und ein daraus resultierendes reduziertes *forward signaling*, während das *reverse signaling* weiter dominiert. Versuche den

verstärkten *reverse-like* Effekt auf temporale Axone durch eine schrittweise Reduktion der EphA3-Fc Konzentration in den Doppelstreifen-Assays auszubalancieren, zeigten jedoch nicht den gewünschten Effekt. Selbst die Konzentration von 5 μ g/ml EphA3-Fc führte zu einer signifikanten *reverse-like* Entscheidung sowohl nasaler, als auch temporaler Axone, bei jeweils gleichbleibender ephrin-A2-mFc Konzentration von 16 μ g/ml (Abbildung 16). Ein möglicher repulsiver Einfluss des Disuccinimidylcarbonat Crosslinkers auf dem PLL kann dabei durch die Fc-Kontrolle ausgeschlossen werden.

Unabhängig von der Frage ob ephrin-A2-mFc auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC im Vergleich zu reinem epoxysilanisierten Glas seine Funktionalität vollständig verloren hat, sprechen diese Ergebnisse stark dafür, dass EphA3-Fc auf Epoxydglas mit PLL und DSC selbst in sehr geringen Konzentrationen einen deutlichen repulsiven Einfluss auf Axone ausübt. Dieser Effekt konnte auf rein epoxysilanisierten Gläsern selbst bei hohen Konzentrationen nicht beobachtet werden (Vergleich Abbildung 14 und 16).

Dieses Experiment verdeutlicht in hohem Maße die Vielzahl der Faktoren, die die Übertragung von funktionalem Protein beeinflussen. Neben der Methode der Proteinübertragung (Stempeln oder Adsorbieren aus Lösung), spielen insbesondere die Funktionalisierung der Oberfläche und nicht zuletzt die Eigenschaften der Proteinstruktur selbst eine entscheidende Rolle. Dieser große Parameterraum ist nahezu nicht prognostizierbar und macht es für die Herstellung von Doppel- und insbesondere Gegengradienten dringend erforderlich, die stark unterschiedlichen Lenkungseigenschaften von EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc auf gleichen Oberflächen getrennt voneinander zu untersuchen, um die empfindliche Balance zwischen *forward* und *reverse* Signaling in einem *in vitro* Assay herauszuarbeiten und zu optimieren.

5.5.2. EphA3-Fc löst leicht gradiertes aber kein topographisch differentielles *reverse signaling* aus

In EphA/ephrin-A2-mFc Doppelstreifenassays auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC-Linker, übt EphA3-Fc eine deutlich repulsivere Wirkung auf retinale Axone aus als ephrin-A2-mFc. Selbst bei einer konstanten Konzentration von 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc und einer Reduktion der EphA3-Konzentration auf bis zu 5 μ g/ml konnte das Lenkungsverhalten temporaler Axone nicht effektiv in Richtung einer binär topographisch korrekten Entscheidung eingestellt werden und könnte auf eine Überaktivität von EphA3 hinweisen. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Notwendigkeit die repulsiven Eigenschaften von EphA3-Fc auf diesen Oberflächen detaillierter und isoliert zu untersuchen.

In EphA3-Fc Einzelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC-Linker wurden unterschiedliche Konzentrationen von EphA3-Fc mit Retina-Explantaten getestet. Hierbei konnte eine signifikante Repulsion nasaler Axone gegen 30 und 15 μ g/ml EphA3-Fc festgestellt werden (69.3% bzw. 70.5%), welche sich bei geringeren Konzentrationen von 10, 5 und 1 μ g/ml nicht mehr statistisch von der Fc-Kontrolle unterscheiden lässt (Abbildung 17).

Auch lässt sich eine leicht gradierte Tendenz der abnehmenden Repulsion zwischen 15 und 5 bzw. 1 μ g/ml EphA3-Fc beobachten. Es erscheint zunächst trivial, dass eine hohe Konzentration des Proteins stärker repulsiv als eine niedrige Konzentration wirkt und könnte aus diesem Grund als eine binäre, statt gradiert topographische Lenkungsentscheidung interpretiert werden. Trägt man jedoch den prozentualen Anteil von Axonen auf den EphA3-Fc Streifen gegen die eingesetzten Proteinkonzentrationen auf, lässt sich eine schwach geneigte Regressionsgerade ziehen, die erstmals in der vorliegenden Arbeit leicht signifikante Korrelation zwischen der eingesetzten EphA3-Fc Konzentration und der Lenkungsentscheidung nasaler Axone anzeigt ($p= 0.02$, Abbildung 17 B).

Temporale Axone zeigen eine signifikante Repulsion bei hohen Konzentrationen wie 30, 15 und 10 μ g/ml EphA3-Fc (62.7%, 65.2% bzw. 65.6%), nicht aber auf geringe Konzentrationen von 5 und 1 μ g/ml EphA3-Fc (Abbildung 17). Ähnlich wie bei der nasalen Population lässt sich hier eine leicht gradierte Reduktion der Repulsion zwischen 10 μ g/ml und 5 bzw. 1 μ g/ml EphA3-Fc beobachten. Bei Untersuchung der Korrelation zwischen Proteinkonzentration und Lenkungsentscheidung temporaler Axone, ergibt sich ein identisches Bestimmtheitsmaß r^2 für die Regressionsgerade wie für nasale Axone. Auch hier lässt sich eine schwach signifikante Korrelation feststellen ($p= 0.02$, Abbildung 17 B).

Es lässt sich somit bestätigen, dass EphA3-Fc auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC-Beschichtung, nicht aber auf epoxysilanisiertem Glas, biologisch funktional aufgebracht werden kann und in höheren Konzentrationen repulsiv auf nasale und temporale Axone wirkt. Obwohl eine leicht gradierte Repulsion erkennbar ist, lässt sich diese auch nach mehreren unabhängigen Experimenten sowohl bei nasalen als auch temporalen Axonen nicht als topographisch differentiell bestätigen (Abbildung 17 B).

5.5.3. ephrin-A2-mFc vermittelt topographisch differenzielle und gradierte Lenkung

Auf epoxysilanisierten Gläsern mit PLL und DSC-Linker wirkt sauer überschichtetes ephrin-A2-mFc in EphA3/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays nicht repulsiv auf temporale oder nasale Axonpopulationen. Stattdessen reagieren Axone selbst auf geringe Konzentrationen von 5 μ g/ml mit einem deutlichen *reverse-like* Lenkungsverhalten repulsiv auf EphA3-Fc, statt auf die konstante ephrin-A2-mFc Konzentration von 16 μ g/ml. Ephrin-A2-mFc scheint auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC-Linker kein ausreichendes *forward-signaling* und damit keinen ausreichend repulsiven Einfluss in temporalen Axonen auszulösen. Die Ergebnisse könnten demnach durch eine verringerte Aktivität von ephrin-A2-mFc auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC erklärt werden.

Analog zu EphA3-Fc wurden die Lenkungseigenschaften von ephrin-A2-mFc auf epoxysilanisierten Gläsern mit PLL und DSC-Linker genauer untersucht. In Einzelstreifen-Assays wurden Konzentrationen von 16, 12, 8, 4 und 2 μ g/ml ephrin-A2-mFc mit

Retina-Explantaten getestet und untersucht, ob geclustertes ephrin-A2-mFc nach NaAc auf dieser Oberfläche in ausreichendem Maße biologisch aktiv ist. Ebenso wurde untersucht ob sich, wie auf epoxysilanisiertem Glas, eine gradierte Repulsion retinaler Axone durch Verringerung der eingesetzten Konzentration beobachten lässt.

Nasale Axone zeigen in keiner der Konzentrationen eine repulsive Reaktion auf ephrin-A2-mFc, was mit Ergebnissen früherer Studien übereinstimmt (Hornberger et al., 1999; Monschau et al., 1997; von Philipsborn et al., 2006). Ungewöhnlich dagegen war die Verteilung nasaler Axone auf Streifen mit 4 μ g/ml ephrin-A2-mFc. Hier lag der prozentuale Anteil mit 56% leicht signifikant höher als die Verteilung auf den Zwischenstreifen mit Fc-Fragment (Abbildung 18). Dies erweckt den Anschein, dass nasale Axone scheinbar attraktiv statt repulsiv auf 4 μ g/ml ephrin-A2-mFc reagieren.

Michael Hansen untersuchte 2004 den konzentrationsabhängigen Einfluss von ephrin-A5 und ephrin-A2 auf das Wachstum retinaler Axone aus Mäuseembryonen. In seiner Arbeit beobachtete er, dass Axone der nasalen Retina in vermehrter Anzahl und bei gleicher Inkubationszeit über eine längere Distanz aus einem retinalen Streifen-Explantat auswachsen, wenn dieses auf einem Substrat mit gering konzentriertem ephrin-A2 platziert wurde (Hansen et al., 2004). Dieser scheinbar wachstumsfördernde Effekt wurde durch höhere ephrin-A2 Konzentrationen auf dem Substrat aufgehoben und wirkte wachstumsinhibierend. Temporale Axone reagierten auf ähnliche Weise, wurden jedoch bereits durch geringere ephrin-A2 Konzentrationen inhibiert. Hansen schloss aus weiteren Experimenten, dass es sich bei diesem wachstumsfördernden Effekt weniger um eine tatsächlich attraktive Wirkung von ephrin-A2 handelt, sondern um einen adhäsiven Effekt durch die Interaktion von Rezeptor und Ligand auf Substrat und Wachstumskegel. Hansen argumentierte weiter, dass höhere ephrin-A Konzentrationen zu einem intrazellulär verstärkten *signaling* führen, welches den adhäsiven Effekt schließlich dominiert und zu einer inhibierten Elongation bzw. repulsiven Lenkung führt (Hansen et al., 2004).

Ein solch adhäsiver Effekt könnte auch der scheinbar leicht attraktiven Lenkungsentscheidung nasaler Axone in Einzelstreifen-Assays mit einer geringen Menge von 4 μ g/ml ephrin-A2-mFc zugrunde liegen. Ein solcher Effekt war in entsprechenden Konzentrationsreihen auf epoxysilanisierten Gläsern nicht signifikant aber als Trend ebenso zu beobachten. Der Unterschied zu den Experimenten von Hansen et al. ist allerdings, dass dort homogene Substrate mit einer Mischung aus Membranvesikeln ephrin-A2 transfizierter und nicht-transfizierter 293T Zellen angefertigt wurden, welcher eine Suspension tektaler Membranen des anterioren optischen Tektums des Huhns als permissives Substrat zugefügt waren. Anders als in seinen Experimenten, handelt es sich bei den Einzelstreifen-Assays in der hier vorliegenden Arbeit um Streifenassays aus isoliertem ephrin-A2-mFc und Fc-Fragment, mit Laminin-1 und Laminin-2 als alleinigem permissiven Substrat. Es ist daher nicht

auszuschließen, dass Hansen einen eventuell zusätzlich wachstumsfördernden Effekt durch weitere Bestandteile der tektalen Membran beobachtet hat, welcher durch ephrin-A2-mFc Streifenassays nicht wiedergespiegelt werden kann. Des Weiteren analysierten Hansen et al. das Ausmaß des axonalen Wachstums durch die Länge nach konstanter Inkubationszeit, nicht an einem Stopp-Punkt, d.h. die Ergebnisse spiegeln primär die Wachstumsgeschwindigkeit der Axone auf den verschiedenen Substraten dar und keine Lenkungsentscheidung. Dennoch sind sie mit dem Modell kompatibel, dass ephrin-A2 sowohl negative als auch positive Effekt auf das Axonwachstum haben könnte.

In allen bisherigen Lenkungs- bzw. Entscheidungsassays wurde bei allen Konzentrationen nur eine repulsive Lenkungseigenschaft von ephrin-A beobachtet woraus geschlossen wurde, dass ephrin-A ein monofunktionelles Signal darstellt, welches ausschließlich eine Repulsion auslöst. Dies machte die Existenz eines zweiten monofunktionellen Lenkungsmoleküls erforderlich, welches eine entsprechend entgegenwirkende Kraft und damit ein Potentialminimum erzeugen kann. Die hier vorliegenden Daten könnten jedoch andeuten, dass bei genauerer Kontrolle der Versuchsbedingungen doch eine attraktive Wirkung bei bestimmten Proteinkonzentrationen vorliegt und ephrin-A zumindest eine leichte Bifunktionalität aufweisen könnte. Hierzu könnten neuste Erkenntnisse passen, die zeigen, dass Eph-Rezeptoren in Tumorzellen ohne die Bindung eines Liganden promigratorisch, nach Bindung des Liganden jedoch Kollaps-induzierend sind (Shi et al., 2023). Diese bemerkenswerte Möglichkeit müsste jedoch zunächst in weiteren Experimenten genauer untersucht werden.

In Streifenassays mit temporalen Axonen lösen hohe ephrin-A2-mFc Konzentrationen wie 16 bzw. 12 μ g/ml eine signifikant repulsive Lenkungsentscheidung aus (76.6% bzw. 79.9%, Abbildung 18). Eine geringere Konzentration von 8 μ g/ml deutet im Vergleich dazu zwar eine gradiert schwächere Repulsion an, konnte jedoch nicht statistisch als solche bestätigt werden. Daneben lässt sich ein leicht signifikanter Unterschied der beiden hohen Konzentrationen zu den niedrigen Konzentrationen von 4 und 2 μ g/ml beobachten, welche sich wiederum jedoch nicht von der Fc-Kontrolle unterscheiden (Abbildung 18 B). Da bei der leichten Gradierung der axonalen Repulsion die Effektgrößen zwischen den verglichenen Punkten gering sind, ist es durchaus möglich, dass sich durch weitere Experimente und Erweiterung des Datensatzes eine deutlichere Abstufung der Lenkungsentscheidungen herauskristallisieren und eine sicherere Aussage treffen lässt.

Im Gegensatz zu den Experimenten auf epoxysilanisierten Gläsern, beschränkt sich die Repulsivität mit einer zusätzlichen Beschichtung mit PLL und DSC zwar lediglich auf die höchste Konzentration von 16 μ g/ml ephrin-A2-mFc, jedoch bestätigen auch diese Ergebnisse erneut die topographische Differentialität von ephrin-A2-mFc für das Lenkungsverhalten nasaler und temporaler Axone.

Der topographisch differentielle Einfluss auf nasale bzw. temporale Axone konnte ebenso in ephrin-A2-mFc Einzelstreifen-Assays auf epoxysilanisierten Gläsern beobachtet werden, wobei dieser bereits in geringeren Konzentrationen von 12 und 8 μ g/ml statistisch signifikant war.

Dies deutet darauf hin, dass sauer appliziertes ephrin-A2-mFc nach Rückführung in ein neutrales pH-Milieu auf epoxysilanisierten Deckgläsern vermehrt in einer funktional vorteilhafteren Konformation bindet, als auf einer zusätzlichen Schicht aus PLL und DSC-Linker. Diese Beobachtung könnte auch die Ergebnisse der EphA3-/ephrin-A2-mFc Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisierten Gläsern mit PLL und DSC-Linker dadurch erklären, durch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Proteine auf unterschiedlichen Substraten zu einer Verschiebung der Balance zwischen *forward* und *reverse signaling* führt. Sollte ephrin-A2-mFc auf epoxysilanisierten Glas mit PLL und DSC-Linker tatsächlich schwächer, EphA3-Fc aber etwas stärker sein als auf nur epoxysilanisierten Gläsern, könnte das axonale Lenkungsverhalten im Doppelstreifenassay tatsächlich von leicht *forward signaling* dominiert nach leicht *reverse signaling* dominiert umkippen, so wie es hier beobachtet werden konnte.

5.6. Die Bedeutung der *in vitro* Ergebnisse für das Modell der retinotektalen Projektion

Ohne Zweifel ist die Bindung funktionaler Proteine an eine Oberfläche ein Thema von höchster Komplexität und Wichtigkeit für die Interpretation der Ergebnisse von *in vitro* Lenkungsassays auf strukturierten Substraten. In dieser Arbeit wurden aus einer Vielzahl von möglichen Substraten, zwei Oberflächen in Form von epoxysilanisierten Deckgläsern und welchen mit zusätzlicher PLL- und DSC-Beschichtung, zwei Oberflächen ausgewählt, auf welchen EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc kovalent binden, ohne sich durch den niedrigen pH-Wert des Natrium-Aacetat Puffers wieder abzulösen. In Streifenassays mit retinalen Explantatkulturen wirkt ephrin-A2-mFc vor allem auf nur epoxysilanisierten Gläsern aber auch auf epoxysilanisiertem Glas mit zusätzlicher PLL- und DSC-Beschichtung topographisch differentiell auf die Lenkung nasaler und temporaler Axone. Die Stärke der Repulsion korreliert hierbei mit der eingesetzten ephrin-A2-mFc Konzentration und bestätigt damit seine graduierten Lenkungseigenschaften *in vitro*.

Überraschenderweise erweist sich die Lenkung durch EphA3-Fc als kaum graduiert und sowohl auf rein epoxysilanisierten Gläsern, als auch auf einer zusätzlichen Beschichtung mit PLL und DSC-Linker als nicht topographisch differentiell zwischen temporal und nasalen Axonpopulationen.

Unser Modell der retinotektalen Projektion beschreibt die Zielfindung bei der axonalen Lenkung als einen Potentialminimierungsprozess und erzeugt das nötige Potentialminimum durch zwei gegenläufige Gradienten monofunktioneller Lenkungssignale (Abbildung 1 und 2).

Damit simuliert es bei einer graduierten und gegenläufigen Verteilung von Rezeptor und Ligand sowohl auf Retina als auch dem Target (dem optischen Tektum) eine topographisch kontinuierlich graduierte Lenkung nasaler und temporaler Axone entlang der anterior-posterior Achse des Targets *in silico*. Dies ist möglich durch die Annahme des Models, dass ein Wachstumskegel *reverse* und *forward* Signale integriert und seine Terminationszone von seinem individuellen Verhältnis der beiden *signaling* Wege abhängt (Gebhardt et al., 2012). *In silico* Prognosen dieses Modells hinsichtlich einer binär topographischen Lenkungsentscheidung von Axonen sowie der Co-Adaptation von Wachstumskegeln konnten in experimentellen *in vitro* Untersuchungen bestätigt werden und die Validität des Modells untermauern (Fiederling et al., 2017; Fiederling, 2016; Gebhardt et al., 2012; Gebhardt, 2009). Das vollständige Modell von Gebhardt et al. mit sechs Dimensionen von Signalwegen (Axon/Target *forward* und *reverse*, Axon/Axon *forward* und *reverse*, *cis forward* und *reverse*) ist nach heutigem Wissenstand das einzige welches die meisten *in vitro* und *in vivo* Experimente über die Bildung topographischer Karten, wie z.B. Einzelstreifen-Assays, alternierende Doppelstreifen-Assays, die Plastizität der tektalen Karte in Regenerationsexperimenten und EphA3-knock in Experimente der Retina, konsistent erklären kann und aus diesem Grund die aktuell stärkste Grundlage bietet (Gebhardt et al., 2012; Gebhardt, 2009; Weth et al., 2014).

Warum aber lässt sich das durch dieses Modell *in silico* prognostizierte axonale Verhalten hinsichtlich der naso-temporalen Differentialität und der graduierten Repulsion für das *forward signaling* durch ephrin-A2-mFc *in vitro* bestätigen, jedoch nicht für das *reverse signaling* durch EphA3-Fc?

Die Annahme EphA3 vermittelte das zu ephrin-A komplementäre topographisch differentielle und graduierte *reverse signaling* auf nasale bzw. temporale Axon, basiert primär auf gegenläufigen Expressionsmuster von EphA im optischen Tektum. Deshalb wurde eine Rolle als repulsive Gegenkraft für projizierende Axone entlang des optischen Tektums während der Ausbildung einer topographischen Karte angenommen. Erkenntnisse über die Expressionsmuster von EphA's stützen sich hauptsächlich auf Ergebnissen von *in situ* Hybridisierungen, welche allerdings auf der Lokalisation von mRNA und nicht auf der des funktionalen Proteins selbst basieren. So zeigen *in situ* Hybridisierungen eine hohe EphA mRNA-Expression in tiefen Schichten des anterioren optischen Tektums (startum griseum und neuroepitheliale Schicht) an der ventrikulären Seite (Connor et al., 1998), während retinale Axone ihr Zielgebiet eher in apikalen Schichten des Tektums (*Stratum opticum* und *stratum griseum et fibrosum superficiale*; ThanosBonhoeffer (1983)) finden. Da sie hier Kontakte mit Endfüßen radialer Gliazellen eingehen, wird vermutet, dass diese an einer Lenkung bzw. Positionsinformation im Tektum beteiligt sind (Monschau et al., 1997; Vanselow et al., 1989). Damit gibt es über den tatsächlichen Verlauf des EphA3 Proteingradienten in den oberen Schichten des optischen

Tektums keine eindeutigen Informationen und es ist daher durchaus denkbar, dass dieser nicht verläuft wie es das Modell vorsieht. Im extremsten Falle könnte EphA gar nicht auf den Endfüßchen lokalisiert sein und somit trotz seines suggestiven mRNA Expressionsmusters nicht als Lenkungssignal in Frage kommen.

Die dringendste Frage die sich stellt, ist demnach die Frage ob EphA3 wirklich die Quelle des *reverse signalings* für die retinotektale Projektion darstellt. In konditionalen Knockout-Experimenten untersuchten Suetterlin und Drescher den Effekt eines ephrin-A5 Knockouts in der Retina, auf die retino-colliculare Projektion der Maus. Hierbei ergab sich bei einem Knockout von ephrin-A5 in der Retina die überraschende Beobachtung, dass nasale Axone, die am meisten durch *reverse signaling* gesteuert werden sollten noch immer in der Lage waren in ihr topographisch korrektes Zielgebiet im Superioren Colliculus zu projizieren (Suetterlin & Drescher, 2014). Nur temporale Axone wuchsen über ihr Ziel hinaus. In seiner extremsten Interpretation würde dieses Experiment bedeuten, dass das *reverse signaling* durch EphA *in vivo* nicht die Rolle der repulsiven Gegenkraft bei der axonalen Lenkung spielt, wie sie das Modell vorsieht und wäre damit eine mögliche Erklärung für die fehlende Sensitivität bzw. topographische Differentialität nasaler Axone in den *in vitro* Assays meiner Arbeit und auch in den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Bonhoeffer & Huf, 1985; Monschau et al., 1997; Raper & Grunewald, 1990). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Ergebnisse des ephrin-A5 Knockouts von Suetterlin und Drescher durch eine Kompensation des Knockouts durch andere ephrine in der Retina, wie beispielsweise ephrin-A2 und ephrin-A3 erklärbar sind und nasale Axone noch immer fähig sind durch diese ein *reverse signaling* zu erfahren (Pfeiffenberger et al., 2006; Suetterlin & Drescher, 2014). Außerdem konnte in einem Knockout von EphA7 im Superioren Colliculus der Maus tatsächlich eine erwartete frühere Termination von nasalen Axonen beobachtet werden, was die Rolle des *reverse signalings* weiter unterstützt (Rashid et al., 2005).

Die Relevanz des *reverse signalings* durch EphA bei der Ausbildung einer topographischen Karte in Frage zu stellen würde nach dem Modell ein anderes Kandidatensignal als Gegenspieler zum ephrin-A *forward signaling* erfordern. Ein solches ist jedoch bislang nicht bekannt.

Die hier beobachtete mangelnde topographische Differentialität des *reverse signaling* bedeutet hauptsächlich, dass nasale Axone weniger sensitiv sind, als zu erwarten wäre. Im Gegensatz zu temporalen Axonen zeigen nasale Axone oftmals keine erwartete topographisch differentielle Lenkungsentscheidung in *in vitro* Assays und wurden aufgrund dessen häufig als allgemein insensitiver für axonales *signaling* beschrieben.

Eines der ältesten Beispiele dafür sind *in vitro* Entscheidungsassays, in welchen temporale Axone strikt den Kontakt zu nasalen Axonen meiden und stattdessen mit Axonen der gleichen Identität faszikulieren, während nasale Axone keinerlei Präferenz zeigen (Bonhoeffer & Huf,

1985). Ebenso zeigen temporale Axone in Streifenassays aus anterioren (viel EphA) und posterioren Membranen des Tektums (viel ephrin-A), klare repulsive Reaktionen auf posteriore Membranen und entscheiden sich strikt für Streifen aus anterioren Membranen. Nasale Axone wiederum zeigen keine Entscheidungspräferenz und überwachsen alle Streifen (Monschau et al., 1997; Walter, 1987; Walter et al., 1987). Weitere Hinweise auf eine geringere Sensitivität nasaler Axone ergaben sogenannte Kollisions-Assays (Raper & Grunewald, 1990). Trafen Wachstumskegel temporaler Explantat-Kulturen auf nasale Axone, kollabierten diese und zogen sich zurück, während nasale Axone keine Repulsion durch temporale Axone zeigten. Erst Ysander von Boxberg ist es durch eine raffinierte Aufreinigung und hochkonzentrierte Isolierung von Membranvesikeln des anterioren und posterioren Tektums gelungen, Doppelstreifen-Assays herzustellen, in denen sich sowohl temporale als auch nasale Axone topographisch korrekt entschieden (von Boxberg et al., 1993). Möglicherweise wurde dabei ein die Sensitivität nasaler Axone erhöhender Faktor angereichert oder ein de-sensitivierender Faktor abgereichert.

In Streifen- bzw. Kollisions-Assays konnte die fehlende Sensitivität nasaler Axonen durch die Zugabe von Phosphoinositid-Phospholipase C (PI-PLC) beseitigt werden, welches speziell GPI-verankerte Proteine von der Zellmembran abspaltet. Durch das Abspalten von ephrin-A's, bleibt das gleichzeitig exprimierte EphA auf den nasalen Axonen erhalten, welches nun durch alleiniges *forward signaling* eine repulsive Reaktion auf exprimierte ephrin-A's temporaler Axone bzw. tektaler Membranen auslöst und eine *forward-like* Lenkungsentscheidung mit sich bringt (Hornberger et al., 1999; Suetterlin & Drescher, 2014). Die *cis*-Interaktion inhibiert hier also die Sensitivität nasaler Axone für das *forward signaling*. In ähnlicher Weise wäre es denkbar, dass auch das Axon/Target *reverse signaling* nasaler Axone erst ermöglicht wird, wenn der axonale Ligand aus dem *cis*-Komplex mit dem Rezeptor befreit wird. Ein möglicher biologischer Grund für die primär geringere Sensitivität nasaler Axone für das *reverse signaling* könnte die hohe EphA-Konzentration im rostralen bzw. anterioren Bereich des optischen Tektums sein. Diese Proteinschwelle muss von nasalen Axonen während des Einwachsens in das Tektum zunächst überwunden werden, bevor sie sich entlang des gesamten Tektums ausrichten können. Ein ähnlicher Gedanke, noch ohne Kenntnis des *reverse signaling*, wird bereits von v. Boxberg als möglicher Grund der vergleichsweisen geringen Sensitivität nasaler Axone erwähnt (von Boxberg et al., 1993).

Selbst wenn das *reverse signaling* in den *in vitro* Assays erst durch bislang fehlende Faktoren sensitiviert werden müsste und trotz der deutlich graduierten Verteilung der Liganden auf der Retina (Hornberger et al., 1999) könnte es sein, dass das *reverse signaling* durch besondere Eigenschaften seiner Signaltransduktion weniger differentiell ist. In den vorliegenden Experimenten scheint es so, als löse das *forward signaling* eine deutlichere Antwort von Wachstumskegeln aus als das *reverse signaling*, was temporale, im Gegensatz zu nasalen Wachstumskegeln, als besonders sensitiv erscheinen lässt.

Könnte all dies dafürsprechen, dass das *forward* bzw. *reverse signaling* nicht als gleichwertig stark lenkend betrachtet werden könnte?

Unser gegenwärtiges Modell geht davon aus, dass die EphA3/ephrin-A2 Gradienten entlang von Retina und Tektum symmetrisch sind (siehe Abbildung 1). Was würde ein womöglich flacher Gradient von EphA3 für das Modell der retinotektalen Projektion, das naiv von einer symmetrischen Verteilung der Gradienten ausgeht, und darauf aufbauende Hypothesen bedeuten? Lässt man das Modell einen hypothetischen Verlauf der retinotektalen Projektion bei asymmetrischen retinalen Gradienten simulieren, bildet sich erstaunlicherweise eine normale und kontinuierliche Verteilung der Axone entlang des Targets und eine normale topographische Karte aus (siehe Anhang, Abbildung 24). Ein flacher Gegengradient reicht demzufolge als zweite Gegenkraft für retinale Axone aus, um ein Potentialminimum während der axonalen Lenkung zu bilden. Es ist durchaus denkbar, dass der Gradient des *reverse signalings* so flach ist, dass eine topographische Differentialität in den Streifenassays nicht detektiert werden kann. Es wäre darüber hinaus sogar denkbar, dass die nasotemporale Differentialität tatsächlich durch eine schwache Bifunktionalität des *forward signaling* unterstützt wird, die sich in meinen Experimenten teilweise andeutet. Ob eine derartige Erweiterung unseres Modells mit seinen bisherigen Prognosen vereinbar ist, müssen zukünftige Simulationen zeigen.

An dieser Stelle deutet sich mehr denn je eine besondere Limitierung von *in vitro* Streifenassays heraus: Das Modell geht nicht ausschließlich von einer *forward* und *reverse* Axon-Target Interaktion aus, sondern in besonderem Maße von einer *forward* und *reverse* Axon-Axon Interaktion *trans* und *cis* (siehe Abschnitt 1.5.). Während die Summe des Axon-Target sowie des Axon-Axon *cis signaling* während der retinotektalen Projektion eher konstant bleibt, steigt durch die schiere Anzahl einwachsender Axone ins optische Tektum der Einfluss des Axon-Axon *trans signaling*. Das Axon-Axon *signaling* Interaktionen bekommt somit eine übergeordnete Bedeutung gegenüber Axon-Target Interaktionen. Axone scheinen über einen Matching-Mechanismus ihre relative Position der RGCs in der Retina auf die topographische Karte auf dem Tektum zu übertragen. Es liegt nahe, dass ein solcher Matching-Mechanismus in Streifenassays vermutlich nicht in dem nötigen Maße dargestellt wird und *in vitro* Resultate der vorliegenden Arbeiten aus diesem Grund vermutlich ausschließlich auf Axon-Target Interaktionen basieren. Eine topographisch korrekte Entscheidung wäre somit in dem hier gewählten Experimentaufbau nicht zu beobachten, im Modell der Topographie-Ausbildung und *in vivo* dafür schon.

Das *in silico* Modell von Gebhardt et al. bleibt demnach, trotz der scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in seiner Grundform gültig und in der Lage zentrale *in vitro* Experimente korrekt zu simulieren und zu prognostizieren. Komplexere Fragestellungen, wie die topographisch kontinuierliche Projektion entlang zweier Gegengradienten, lassen sich

qualitativ korrekt simulieren und selbst die Annahme eines flachen EphA3-Gradienten im Zielgebiet stört die Ausbildung einer topographischen Karte *in silico* nicht. Allerdings konnte dieser vermeintlich flache Gradient nicht in Doppelstreifen-Assays mit einer binär topographisch korrekten Lenkung *in vitro* reproduziert werden. Es ist durchaus denkbar, dass Streifenassays die Komplexität der Gradientenverteilung nicht vollständig darstellen können. Während das Modell allein die molekularen Zusammenhänge des *forwards* und *reverse signalings* während retinotektalen Projektion erfasst und diese wiedergibt, sind reale *in vitro* oder gar *in vivo* Bedingungen weitaus komplexer. So gibt es Hinweise darauf, dass axonale Lenkung ebenso durch mechanosensorische Einflüsse unterstützt werden, eine weitere Dimension die in meinen *in vitro* Assays nicht betrachtet wird (Abe et al., 2021; Koser et al., 2016; Sipkova & Franze, 2024). Damit stößt man mit diesem Modell erstmals an Grenzen der praktischen Umsetzbarkeit eines prognostizierten Ergebnisses, da weitere kritische Faktoren wie die Zusammensetzung und mechanosensorischen Eigenschaften des Substrats sowie vor allem die Axon-Axon Interaktion mit wachsender Komplexität der Fragestellung an Relevanz gewinnen.

5.7. Expression von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 zur Visualisierung ihrer Dynamik während der axonalen Lenkung

In dem zweiten Projekt meiner Dissertation, widmete ich mich der Klonierung und Expression von HaloTag gekoppeltem EphA3 sowie der Co-Expression von HaloTag-EphA3 und SNAP-Tag ephrin-A5 in retinalen Explantat-Kulturen. Ziel dieses Projekts war es, die Expression und Detektion von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in retinalen Wachstumskegeln zu etablieren und damit die Untersuchung der subzellulären Dynamiken während der axonalen Lenkung zu ermöglichen. Zusammen mit der Rekonstitution eines kontinuierlichen Gegengradienten wäre hiermit ein weiteres Werkzeug für die Untersuchung der molekularen Prozesse während der topographischen Lenkung geschaffen.

In meiner vorangegangenen Masterarbeit ist es mir gelungen, die Expression von HaloTag gekoppeltem EphA3 in transfizierten RGCs in der explantierten Retina zu etablieren (Ruisi, 2019). Trotz effizient transfiziertem retinalem Gewebe, wurden kaum transfizierte Axone gefunden. Da das Auswachsen nicht-transfizierter RGCs im selben Retina-Explantat allerdings unbeeinträchtigt blieb, wurde angenommen, dass die inhibierte Projektion transfizierter RGCs auf ein verstärktes *forward signaling* in der Zelle selbst zurückzuführen sein könnte, welches durch das artifizielle Einbringen von zusätzlichem EphA3 in die RGCs und nicht durch die Elektroporation oder Kulturbedingungen selbst ausgelöst wurde.

Eine Reduktion der Plasmid-Konzentration während der Elektroporation führte nicht zu einem vermehrten Auswachsen transfizierter Axone. Da während einer Transfektion die Menge übertragener Plasmide und damit auch die Menge von exprimiertem EphA3 nicht kontrolliert werden kann, wurde versucht die generelle Expressionsstärke des Plasmids zu reduzieren.

Hierfür sollte der Strategie von Vullhorst et al. (2017) gefolgt werden, in welcher Sequenzteile des CMV-Enhancers des Expressionsvektors entfernt und somit die Expressionsstärke des Plasmids in der Zelle reduziert wurde. Durch Analysen in einem Luciferase-Assay gibt Vullhorst in seiner Arbeit an, dass auf diese Weise die Expression des Plasmids in Neuronen des Maus-Hippocampus um ca. 60% reduziert werden konnte (Vullhorst et al., 2017). Die zu Beginn dieses Projekts verfolgte Strategie, den gewünschten Sequenzbereich des CMV-Enhancers mittels Restriktionsverdau zu entfernen und den Vektor zu re-ligieren, führte in mehr als 60 negativen Klonen nicht zu dem gewünschten Produkt (Ruisi, 2019). Da dieser molekularbiologische Ansatz technisch nicht umsetzbar war, wurde die entsprechend gekürzte Sequenz synthetisiert (GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher; siehe Abschnitt 3.1.) und statt des vollständigen Enhancers im Expressionsvektor verwendet.

Bevor die Detektion von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrinA5 diskutiert werden, wird im nächsten Abschnitt genauer auf die Besonderheiten der Transfektion und Kultivierung transfizierter retinaler Ganglienzellen mit diesen Konstrukten eingegangen.

5.7.1. Transfizierte RGCs benötigen angepasste Kulturbedingungen *in vitro*

Die *ex ovo* Elektroporation von retinalem Gewebe ist die wohl die geeignete Methode um große DNA-Konstrukte in ihre post-mitotischen Neuronen einzubringen (Shintani et al., 2009; Yuasa-Kawada et al., 2003). Das Einbringen des *atten*. HaloTag-EphA3 Plasmids erwies sich aufgrund der deutlich erhöhten Anzahl transfizierter Axone schon nach der ersten Elektroporation als erfolgreich und unterstützte die Vermutung eines erhöhten *forward signalings* durch überexprimierte HaloTag-EphA3 in den RGCs bei der vorherigen Verwendung des vollständigen Enhancers. Die Transfektion und Kultivierung von retinalen Ganglienzellen mit HaloTag-EphA3 im Explantat stellte dennoch besondere Herausforderungen hinsichtlich der Neuritenbildung und Elongation von Axonen dar. Während Markus Weschenfelder bereits umfassend die Optimierung der Transfektionseffizienz der *ex ovo* Elektroporation etabliert hatte (Weschenfelder, 2014) wurde in dieser Arbeit die Optimierung der *in vitro* Kulturbedingungen weiter erarbeitet.

Zu einer der wesentlichen Optimierungen zählt hierbei die Ergänzung des Wachstumssubstrates (bisher reines Laminin-111) mit Laminin-211 (Merosin). Diese Laminin-Isoform fördert, ähnlich wie Laminin-111, die Zelladhäsion und damit die Axonelongation über Integrin-Rezeptoren und wird insbesondere für die Kultivierung dissoziierter Neuronen eingesetzt, in welchen besonders die Ausbildung von Neuriten und interstitiellen Verzweigungen betrachtet werden (Adnan et al., 2020; Goldberg et al., 2002; Marler et al., 2014). Dass die zusätzliche Verwendung von Merosin als weitere Laminin-Isoform zu einem vermehrten Auswuchs von Axonen führt, könnte an der Bereitstellung eines Wachstumssubstrates aus unterschiedlichen ECM-Molekülen liegen, welche eher einer *in vivo* Situation von Basallaminae entspricht (Balasubramani et al., 2010). Es gibt zudem Hinweise,

dass retinale Ganglienzellen aus Hühnerembryonen in frühen Embryonaltagen (E6) jeweils auf Laminin und gleichermaßen Merosin Axone ausbilden können, wobei sie in älteren Stadien (getestet ab E9) zunehmend die Fähigkeit des Wachstums auf Laminin verlieren und diese jedoch bis zum Schlupftag (E21) auf Merosin beibehalten (Cohen & Johnson, 1991). Vermutlich unterstützt der Wechsel der Präferenz auf diese Laminin-Isoform hierbei sowohl das Einwachsen in das optische Tektum, die axonale Lenkung als auch die Ausbildung interstitieller Verzweigungen im Zielgebiet, welche etwa ab E10 stattfinden (Thanos & Bonhoeffer, 1987).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Explantatkulturen der Retina an E6.5-7 transfiziert. Angesichts einer *in vitro* Kultivierungsdauer von insgesamt 72 Stunden (entsprechend *in vivo* E9.5 -10) könnte die bis dahin allmählich reduzierte Fähigkeit der Axone Laminin-111 über Laminin-Rezeptoren zu binden, zumindest in Betracht gezogen werden und eine inhibierte Projektion erklären. Da in meinen Experimenten Axone nach der Elektroporation mindestens 35-40h *in vitro* benötigten, um aus dem Retinagewebe auszuwachsen, kann zudem von einer generellen Strapazierung bzw. Stress des transfizierten Gewebes durch die Elektroporation ausgegangen werden. Die eventuell durch Stress induzierte, verzögerte Projektion von Axonen könnte demnach zusätzlich durch eine möglicherweise reduzierte Fähigkeit der axonalen Adhäsion zu einer weitaus stärkeren Inhibition der Neuritenbildung bzw. Elongation geführt haben. Dieser Effekt könnte hier durch den Zusatz von Merosin kompensiert worden sein.

Eine weitere wesentliche Verbesserung der *in vitro* Kultivierung transfizierter Axone konnte durch eine Anpassung des verwendeten Zellkulturmediums erreicht werden (siehe Tabelle 1). Hierfür wurde dem routinemäßig verwendeten F12-Medium zusätzlich B-27 Supplement und Forskolin zugegeben. Während B-27 insbesondere mit seinen Bestandteilen wie Insulin und Thyroxin die Zellviabilität, Axoninitiation sowie -elongation fördert (Goldberg et al., 2002; Meyer-Franke et al., 1995), erhöht die Zugabe von Forskolin den cAMP Spiegel in RGCs (Shen et al., 1999), der wiederum Einfluss auf verschiedene Prozesse wie Zellviabilität, Zellwachstum und Neuritenbildung, u.a. durch die Rekrutierung von TrkB in die Zellmembran hat (Meyer-Franke et al., 1998). Untersuchungen haben gezeigt, dass die gesteigerte Zellviabilität und vermehrte Ausbildung von Axonen durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren zwar begünstigt werden kann, diese Effekte jedoch erst in Kombination mit Forskolin bzw. einem erhöhten cAMP Spiegel um ein vielfaches gesteigert werden (Goldberg et al., 2002; Meyer-Franke et al., 1995).

5.7.2. Visulisierung von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 durch fluoreszente Liganden

Die erfolgreiche Klonierung und Transfektion des Plasmids konnte in NIH 3T3 Zellen durch das bicistronisch exprimierte IRES eGFP-Signal bestätigt werden (Abbildung 20). Durch fluoreszente Markierung mit dem zellpermeablen Halo-Liganden Janelia Fluor 549, konnte die Lokalisation des HaloTag-EphA3 durch Akkumulation entlang der Zellmembran und intrazellulär um den Zellkern herum beobachtet werden, welche vorherigen Beobachtungen in meiner Masterarbeit entsprachen (Ruisi, 2019). Nach erfolgreicher Expression des attenuierten Fusionsproteins, wurde das Plasmid in einem nächsten Schritt direkt via *ex ovo* Elektroporation in Explantatkulturen der embryonalen Hühnerretina eingebracht.

Die im obigen Abschnitt beschriebenen Optimierungen der Kulturbedingungen in Kombination mit der reduzierten Expression von *atten*. HaloTag-EphA3 führten in der Tat zu einer massiv erhöhten Anzahl transfizierter Axone pro Retina. In früheren Transfektionen mit der vollständigen CMV-Sequenz konnten in 14 unabhängigen Retinae auf homogenen Laminin-Substraten nur 8 positiv transfizierte Axone identifiziert werden (Ruisi, 2019). Im Gegensatz dazu führte die Verwendung des attenuierten HaloTag-EphA3 Plasmids in lediglich 3 unabhängig elektroporierten Retinae auf Laminin-Merosin Substraten und angepassten Kulturbedingungen zu über 400 positiv transfizierten Axonen (siehe Tabelle 1). Das bicistronisch exprimierte eGFP war für die direkte Identifikation transfizierter Axone allerdings ungeeignet, da das eGFP-Signal, vermutlich aufgrund der nun reduzierten Expression, kaum von dem Hintergrund der Probe unterschieden werden konnte.

Aufgrund seiner Spezifität und Brillanz war eine eindeutige Detektion transfizierter Axone erst mit dem zellgängigen Halo-Liganden Janelia Fluor 549 möglich. Das bicistronisch exprimierte eGFP-Signal, und damit die erfolgreiche Expression des Plasmids, konnte anschließend mit angepassten Belichtungszeiten der CCD-Kamera bestätigt werden. Oftmals waren Wachstumskegel transfizierter Axone zum Zeitpunkt der Fixierung kollabiert, wiesen andernfalls jedoch eine physiologische und typisch pinsel förmige Morphologie auf. Die eGFP-Markierung beschränkt sich auf die zentrale Domäne des Wachstumskegels und den Axonschaft, während das HaloTag-EphA3 zusätzlich bis in die periphere Domäne hineinreicht und sich auf der gesamten Zellmembran verteilt. Neben dieser gleichmäßigen Verteilung des Proteins sind ebenso größere Cluster in der peripheren sowie markante Akkumulationen von HaloTag-EphA3 in der zentralen Domäne der Wachstumskegel sichtbar. Eine solche Akkumulation ähnelt jener im perinukleären Bereich transfizierter NIH 3T3 Zellen und wurde in diesem Zusammenhang bereits in früheren Arbeiten mit exprimiertem SNAP-ephrin-A5 beschrieben (Weschenfelder, 2014). Ein von Weschenfelder vermutetes intrazelluläres Reservoir von ephrin-A5, welches vermutlich über den Rab4/5 Recyclingweg reguliert wird, könnte hier ebenso denkbar für HaloTag-EphA3 sein.

5.7.3. HaloTag-EphA3 und SNAP-Tag ephrin-A5 lassen sich in RGCs co-exprimieren

In Untersuchungen zur Co-Expression beider Plasmide in NIH 3T3 Zellen, sind sowohl SNAP-ephrin-A5 als auch HaloTag-EphA3 stark co-lokalisiert. Das durch den nicht-zellpermeablen SNAP-Liganden Janelia Fluor 646 angefärbte SNAP-Tag ephrin-A5 ist hierbei sowohl entlang der Zellmembran, als auch im perinukleären Bereich im Zytosol detektierbar. Da dieser Ligand ausschließlich extrazelluläres SNAP-ephrin-A5 markieren soll, spräche dies für eine Endozytose des Proteins während des 15-30-minütigen Färbeschritts. Eine spannende Beobachtung ist hierbei, dass die Gesamtheit des simultan exprimierten HaloTag-EphA3 in scheinbar denselben Kompartimenten lokalisiert ist, was für eine Co-Lokalisation der rekombinanten Proteine in der Zelle sprechen würde. Ob es sich hierbei allerdings auch um eine korrelierte Überlagerung beider Fluoreszenzsignale durch eine tatsächliche Interaktion von ephrin-A5 und EphA3 (etwa durch Bildung von signalisierenden Clustern) oder durch eine sterische Nähe (in endozytierten Vesikeln oder benachbarten Mikrodomänen der Plasmamembran) handelt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gänzlich geklärt. Ebenso muss in Erwägung gezogen werden, dass der hier verwendete SNAP-Ligand Janelia Fluor 646 möglicherweise doch zellpermeabel ist, da endozytierte Proteine lediglich in den Golgi-Apparat, nicht aber zurück ins Endoplasmatisches Retikulum gelangen. Aufgrund dessen sollte zumindest hier keine Co-Lokalisation von Fluorophoren beobachtet werden, wenn ein Ligand zellpermeabel und ein Ligand nicht-zellpermeabel ist.

In *Live Cell* Aufnahmen von NIH 3T3 Zellen sind hochdynamische Prozesse der fluoreszent überlagerten Vesikel zu beobachten (Daten nicht gezeigt), welche umso mehr die Frage nach eben jenen subzellulären Dynamiken in Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen während der retinotektaen Projektion aufwerfen. Es gibt Hinweise, dass sich ephrin-A und EphA zwar in definierten Membrandomänen bzw. in sogenannten *lipid rafts* befinden und somit lateral voneinander getrennt sind (Kao & Kania, 2011; Marquardt et al., 2005), während des axonalen *signalings* allerdings aus diesen Domänen entfernt und durch Clathrin-vermittelte Endozytose in gemeinsamen Endosomen aufgenommen werden. Fiederling et al. (2017) vermuten, dass dieser Mechanismus relevant für die von ihnen beobachtete, sogenannte „Co-Adaptation“ von ephrin-A Liganden bzw. EphA-Rezeptoren während der retinotektaen Projektion sein könnte (siehe auch Abschnitt 1.5.). Die Hypothese von Fiederling et al. ist, dass das adaptierende *cis*-Signal letztendlich von endozytierten *signaling endosomes* ausgeht. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste die Co-Lokalisation von SNAP-Tag ephrin-A5 und HaloTag-EphA3 in Endosomen während der Adaptation gezeigt werden. Zu diesem zukünftigen Zweck wurden die hier diskutierten Konstrukte erzeugt.

5.7.4. Die Untersuchung der axonalen Lenkungsmaschinerie benötigt spezielle Methoden

Wachstumskegel co-transfizierter RGCs kollabieren *in vitro* in verstärktem Maße als Reaktion auf Störungen wie z.B. Temperaturschwankungen und Erschütterungen während des Handlings und zu intensiven Flüssigkeitsströmungen während des Mediumwechsels bzw. Färbe- und Waschschritten. Unklar ist hierbei, ob der durch die Transfektion induzierte Stress des Gewebes oder die erhöhte Expression von Lenkungsmolekülen zu einer erhöhten Sensibilität der Wachstumskegel führt. Ein vor der Fixierung der Explantate durchgeföhrter „Regenerationsschritt“ von mindestens 30-60min im Brutschrank reduzierte die Anzahl kollabierter Wachstumskegel transfizierter RGCs für die spätere Mikroskopie (Daten nicht gezeigt). Von besonderem Interesse ist selbstverständlich die Beobachtung der Dynamiken von getaggten Lenkungsmolekülen in lebenden Explantat-Kulturen, was sich allerdings aufgrund der Sensibilität der Wachstumskegel gegenüber selbst gewebeschonenden Licht-Impulsen zum jetzigen Zeitpunkt als kaum umsetzbar erwiesen hat (Daten nicht gezeigt). Ebenso würden sich zelluläre Strukturen, wie unterschiedliche Membran-Domänen von SNAP-ephrin-A5 bzw. HaloTag-EphA3 oder kleinste Vesikel, wie frühe Endosomen, nicht mehr konventionell mikroskopisch auflösen lassen.

Einen Lösungsansatz könnte hierbei die sogenannte *Expansion Microscopy* (ExM) bieten. Diese Methode ermöglicht es, biologische Präparate physisch zu vergrößern und somit nanometergroße Strukturen aufzulösen (Chen et al., 2015; Wassie et al., 2019; Wen et al., 2023). Kurz zusammengefasst werden bei dieser Methode die Zielstrukturen nach der Fixierung mithilfe geeigneter fluoreszenter Antikörper oder Marker gelabelt und die Marker werden chemisch kovalent an ein infundiertes, quellbares Polymernetz gebunden. Nach einem proteolytischen Verdau der zellulären Bestandteile, bleiben die kovalent gebundenen Fluorophore bzw. Marker in dem Polymernetz zurück. Dieses quillt durch Inkubation in Wasser idealerweise isotrop auf, wodurch sich auch die Positionen der Fluorophore isotrop voneinander entfernen. Auf diese Weise wird eine verbesserte Auflösung bzw. Trennung der Fluoreszenzsignale durch physische Expansion des Präparats erreicht, ohne dass dabei relative Positionsinformationen der kovalent gebundenen Fluorophore verloren gehen. Einer der entschiedensten Faktoren des Erfolgs dieser Methode ist dabei die Wahl ExM-kompatibler Fluorophore. Durch die Expansion vergrößert sich das Volumen des Präparats um ein Vielfaches und führt durch die physische Trennung der Fluorophore zu einer Verdünnung der Signalintensität und einer Reduzierung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Zusätzlich verlieren bestimmte Fluorophore (wie z.B. Cyano-Farbstoffe oder Alexa Fluore im dunkelroten Wellenlängenbereich) nach der Expansionsprozedur ihre Fluoreszenzintensität beinahe vollständig, während andere Fluorophore (z.B. Atto-Farbstoffe oder Alexa Fluore im grünen Wellenlängenbereich) ihre Fluoreszenzintensität weitestgehend beibehalten (Tillberg et al., 2016; Wassie et al., 2019). Eine detaillierte Zusammenfassung über die heutigen Erkenntnisse

zur *Expansion Microscopy* verschiedener biologischer Präparate, eine Übersicht zu Fluorophoren sowie Methoden zur Verbesserung des Erhalts der Fluoreszenzsignale sind in einem Review von Wen et al. zu finden (Wen et al., 2023).

In ersten Versuchen mit Wachstumskegeln retinaler Ganglienzellen erwies sich die *Expansion Microscopy* bereits als erfolgreich. Die Expansion in einem Hydrogel mit 5% Acrylamid ermöglichte eine Expansion um das etwa 3.5-fache (siehe Abbildung 23). Bisher konnte noch keine vollständig isotrope Expansion der Wachstumskegel etabliert werden, was vermutlich durch einen nicht vollständigen Verdau durch Proteinase K zu erklären ist und durch eine Optimierung des Verdauschriffts erreicht eingestellt werden kann. Ebenso könnte zukünftig eine verstärkte Expansion des Hydrogels durch eine weitere Anpassung des Vernetzungsgrades durch das Acrylamid erreicht werden.

Durch die in dieser Arbeit etablierte simultane Expression von Halo-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in RGCs und eine gezielte Auswahl an Fluorophoren von Halo- und SNAP-Liganden bzw. Antikörpern könnten intra- und extrazelluläre Populationen von EphA3 und ephrin-A5 sowie deren Lokalisation in der Plasmamembran und Endosomen erfolgreich in ein *Expansion Microscopy* Protokoll integriert werden. Auf diese Weise ließen sich neue Erkenntnisse über subzelluläre Dynamiken und deren Zusammenspiel innerhalb retinaler Wachstumskegel während der axonalen Lenkung gewinnen.

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse geben überraschende aber nicht minder hilfreiche Einblicke in die Komplexität der Rekonstitution einer topographischen Karte *in vitro* und damit der retinotektaLEN Projektion selbst. Experimente in Dreiecksgradienten-Assays zeigten, dass das grundlegende Design der Dreiecksgradienten sinnvoll gewählt ist. Jedoch wäre eine Anpassung der Geometrie erforderlich, um zu gewährleisten, dass ein Wachstumskegeln zu möglichst jedem Zeitpunkt seiner Projektion sowohl Rezeptor als auch Ligand wahrnehmen und ein entsprechendes *forward* und *reverse signaling* integrieren kann. Ebenso deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Verbreiterung des Stempelfeldes auf die Länge der gesamten naso-temporalen Achse eines Explantat-Streifens dafür sorgen könnte, dass die Dimension der Axon-Axon *trans* Interaktionen im Zusammenhang eines Matching-Mechanismus' dargestellt werden könnte. Durch die erfolgreiche Separation von EphA3-Fc und ephrin-A2-mFc durch einen niedrigen pH-Wert sowie der Wiederherstellung der axonalen Projektion auf einem Substrat aus sauer überschichtetem ephrin-A2-mFc, wären damit die technischen Voraussetzungen zur Herstellung kontinuierlicher Gegengradienten aus EphA und ephrin-A gegeben.

Anders als ephrin-A2-mFc wirkt EphA3-Fc in der vorliegenden Arbeit nicht topographisch differentiell und löst nur in einem kleinen Parameterraum ein repulsives *reverse signaling* aus, welches jedoch nur schwach mit der Höhe der Proteinkonzentration korreliert. Die Frage ob es sich hierbei um ein technisches Artefakt oder einen tatsächlichen molekularen Effekt von EphA3 handelt, könnte in zukünftigen Experimenten durch den Einsatz weiterer alternativer Oberflächen-Funktionalisierungsmethoden überprüft werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von mechanosensorischen Faktoren, durch die Integration weiterer ECM-Moleküle oder dreidimensionaler Substrate, weiter diskutiert werden. Diese Maßnahmen könnten die möglichst naturgetreue Rekonstitution eines Gegengradienten *in vitro* gewährleisten ohne die Kernidee unseres aufgestellten Modells zu beschneiden.

Gemeinsam mit der erfolgreichen Co-Expression von HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in retinalen Ganglienzellen, deren optimierten *in vitro* Kulturbedingungen und ersten Versuchen nicht-transfizierte Wachstumskegel zu expandieren (hier nicht gezeigt), stehen die geeigneten Werkzeuge für die Untersuchung der subzellulären Lenkungsmaschinerie und die Überprüfung unserer Hypothesen bezüglich der molekularen Mechanismen topographischer Axonlenkung am Beispiel der retinotektaLEN Projektion in zukünftigen Experimenten bereit.

7 Anhang

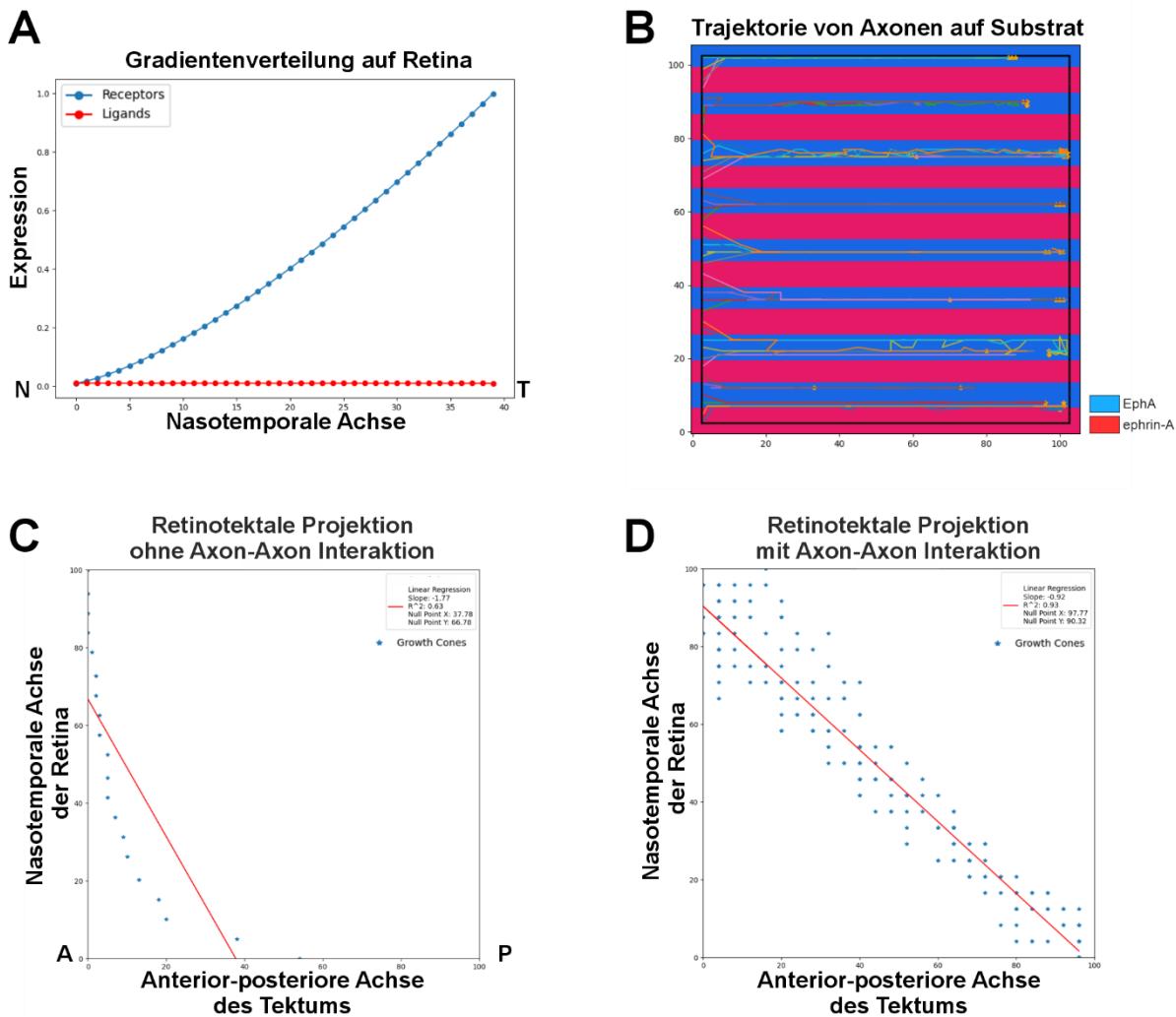


Abbildung 24: Simulation der axonalen Lenkung bei Asymmetrie von *forward* und *reverse signaling*.

Die hier dargestellten Simulationen wurde das Modell von Gebhardt et al. (2012) zugrunde gelegt. In diesem wurden die Stärke des reverse signalings im Gegensatz zum ursprünglichen Modell stark reduziert. Der Gradient des Liganden auf der Retina wurde stark verflacht, während die Gradienten auf dem Tektum unverändert blieben. (A) Gradientenverteilung entlang der nasotemporalen Achse der Retina. EphA-Rezeptoren (blau) behalten ihre Expressionsstärke bei, während der Gradient der ephrin-A Liganden (rot) stark abgeflacht ist. (B) Resultierende Lenkungsentscheidungen retinaler Axone in einem Doppelstreifen-Assay; nasale (<50) und temporale Axone (>50) entscheiden sich gegen ephrin-A (rot) und wachsen auf EphA (blau). Es ergibt sich eine topographisch nicht-differentielle Entscheidung. (C) Bei wenigen Wachstumskegeln und damit geringer Axon-Axon Interaktion, führt der Mismatch der retinalen und taktalen Gradientensysteme zu einer starken Verzerrung der Retinotektalen Projektion. (D) Bei verstärkter Axon-Axon Interaktion durch viele Wachstumskegel wird die Verzerrung fast vollständig ausgeglichen und es bildet sich trotz Mismatch der Gradientensysteme eine nahezu normale topographische Karte aus. Simulation durchgeführt von B.Sc. cand. Fynn Burger-Fesser

8 Verzeichnisse

8.1. Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DSC	Disuccinimidylcarbonat
ECM	Extracellular matrix
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
EphA	EphA-Rezeptor (erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma receptor tyrosine kinase)
Ephrin-A	Eph-interacting exchange protein
FCS	Fetal Calf Serum
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
IgG	Immunglobulin G
IRES	Internal ribosomal entry site
min	Minute
NaAc	Natrium-Aacetat Puffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLL	Poly-L-Lysin
RGC	Retinal Ganglion Cells
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die retinotektale Projektion vermittelt durch EphA und ephrin-A.....	3
Abbildung 2: Darstellung des mathematischen Modells der retinotektalen Projektion nach Gebhardt et al.....	9
Abbildung 3: Strategie für die Verkürzung des CMV-Enhancer/Promoter nach Vullhorst (2017).....	23
Abbildung 4: Einfluss des pH-Wertes auf die Bindungskinetik von ephrin-A2-Fc und EphA3-Fc.....	37
Abbildung 5: Darstellung der Dreiecksgradienten-Struktur für kontinuierliche Gegengradienten <i>in vitro</i>	38
Abbildung 6: Nasale Axone in Dreiecksgradienten-Assay aus EphA3-Fc in PBS.....	40
Abbildung 7: Temporale Axone in Dreiecksgradienten-Assay aus EphA3-Fc in PBS	41
Abbildung 8: Retinale Axone stoppen nicht in Abhängigkeit der Breite von EphA3-Fc Dreiecken	42
Abbildung 9: EphA3-/ephrin-A2-mFc (pH4) Gegengradienten-Assay	43
Abbildung 10: Einfluss von ephrin-A2-mFc in Phosphat-Citrat Puffer auf axonales Wachstum	44
Abbildung 11: Temporale Axone auf ephrin-A2-Fc Streifenassays in PBS auf epoxysilanisiertem Glas.....	47
Abbildung 12: Retinale Axone auf ephrin-A2-mFc Streifenassays nach pH4 auf epoxysilanisiertem Glas.....	49
Abbildung 13: Retina-Explantate auf EphA3-/ephrin-A2-mFc (pH4) Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas.....	51
Abbildung 14: Retinale Axone auf EphA3-Fc Streifenassays in PBS auf epoxysilanisiertem Glas.....	52
Abbildung 15: Fehlende repulsive Reaktion retinaler Axone auf EphA3-Fc nach Denaturierung.....	55
Abbildung 16: Axonales Lenkungsverhalten in EphA3-/ephrin-A2-mFc (pH4) Doppelstreifen-Assays auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC	57
Abbildung 17: Retinale Axone auf EphA3-Fc Streifenassays in PBS auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC.....	59

Abbildung 18: Retinale Axone auf ephrin-A2-mFc Streifenassays nach pH4 auf epoxysilanisiertem Glas mit PLL und DSC- Linker.....	62
Abbildung 19: Plasmidkarten von pCIG2 HaloTag-EphA3 mit unterschiedlichen Enhancern	64
Abbildung 20: Expression von attenuiertem HaloTag-EphA3 in NIH 3T3 Zellen.....	65
Abbildung 21: Expression von attenuiertem HaloTag-EphA3 in retinalen Ganglienzellen ...	66
Abbildung 22: Co-Expression von atten. HaloTag-EphA3 und SNAP-ephrin-A5 in NIH 3T3 und RGCs	68
Abbildung 23: Expansionsmikroskopie (ExM)	70
Abbildung 24: Simulation der axonalen Lenkung bei Asymmetrie von forward und reverse signaling.....	103
Tabelle 1: Vergleich der Anzahl identifizierter, transfizierter Axone aus elektroporierter Retina des Huhns mit zwei Varianten des HaloTag-EphA3 Plasmids in verschiedenen Nährmedienkompositionen	63

8.3. Literaturverzeichnis

- Abe, K., K. Baba, L. Huang, K. T. Wei, K. Okano, Y. Hosokawa, et al. (2021). Mechanosensitive axon outgrowth mediated by L1-laminin clutch interface. *Biophys J*, 120(17), 3566-3576. doi:10.1016/j.bpj.2021.08.009
- Adnan, G., A. Rubikaite, M. Khan, M. Reber, P. Suetterlin, R. Hindges, et al. (2020). The GTPase Arl8B Plays a Principle Role in the Positioning of Interstitial Axon Branches by Spatially Controlling Autophagosome and Lysosome Location. *J Neurosci*, 40(42), 8103-8118. doi:10.1523/JNEUROSCI.1759-19.2020
- Akter, L., H. Flechsig, A. Marchesi & C. M. Franz. (2024). Observing Dynamic Conformational Changes within the Coiled-Coil Domain of Different Laminin Isoforms Using High-Speed Atomic Force Microscopy. *Int J Mol Sci*, 25(4). doi:10.3390/ijms25041951
- Asano, S. M., R. Gao, A. T. Wassie, P. W. Tillberg, F. Chen & E. S. Boyden. (2018). Expansion Microscopy: Protocols for Imaging Proteins and RNA in Cells and Tissues. *Curr Protoc Cell Biol*, 80(1), e56. doi:10.1002/cpcb.56
- Averaimo, S., A. Assali, O. Ros, S. Couvet, Y. Zagar, I. Genescu, et al. (2016). A plasma membrane microdomain compartmentalizes ephrin-generated cAMP signals to prune developing retinal axon arbors. *Nat Commun*, 7, 12896. doi:10.1038/ncomms12896
- Baier, H. & F. Bonhoeffer. (1992). Axon guidance by gradients of a target-derived component. *Science*, 255(5043), 472-475.
- Balasubramani, M., E. M. Schreiber, J. Candiello, G. K. Balasubramani, J. Kurtz & W. Halfter. (2010). Molecular interactions in the retinal basement membrane system: a proteomic approach. *Matrix Biol*, 29(6), 471-483. doi:10.1016/j.matbio.2010.04.002
- Benink, H. A. & M. Urh. (2015). HaloTag technology for specific and covalent labeling of fusion proteins. *Methods Mol Biol*, 1266, 119-128. doi:10.1007/978-1-4939-2272-7_8
- Benjumeda, I., A. Escalante, C. Law, D. Morales, G. Chauvin, G. Muça, et al. (2013). Uncoupling of EphA/ephrinA signaling and spontaneous activity in neural circuit wiring. *J Neurosci*, 33(46), 18208-18218. doi:10.1523/JNEUROSCI.1931-13.2013
- Boissier, P., J. Chen & U. Huynh-Do. (2013). EphA2 signaling following endocytosis: role of Tiam1. *Traffic*, 14(12), 1255-1271. doi:10.1111/tra.12123
- Bonhoeffer, F. & J. Huf. (1985). Position-dependent properties of retinal axons and their growth cones. *Nature*, 315(6018), 409-410. doi:10.1038/315409a0

- Boyken, S. E., M. A. Benhaim, F. Busch, M. Jia, M. J. Bick, H. Choi, et al. (2019). De novo design of tunable, pH-driven conformational changes. *Science*, 364(6441), 658-664. doi:10.1126/science.aav7897
- Brown, A., P. A. Yates, P. Burrola, D. Ortuno, A. Vaidya, T. M. Jessell, et al. (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.
- Butler, J. E. (2000). Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods Mol Med*, 94, 333-372.
- Carvalho, R. F., M. Beutler, K. J. Marler, B. Knöll, E. Becker-Barroso, R. Heintzmann, et al. (2006). Silencing of EphA3 through a cis interaction with ephrinA5. *Nat Neurosci*, 9(3), 322-330. doi:10.1038/nn1655
- Chen, F., P. W. Tillberg & E. S. Boyden. (2015). Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*, 347(6221), 543-548. doi:10.1126/science.1260088
- Cheng, H. J. & J. G. Flanagan. (1994). Identification and cloning of ELF-1, a developmentally expressed ligand for the Mek4 and Sek receptor tyrosine kinases. *Cell*, 79(1), 157-168. doi:10.1016/0092-8674(94)90408-1
- Cheng, H. J., M. Nakamoto, A. D. Bergemann & J. G. Flanagan. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell*, 82(3), 371-381.
- Cohen, J. & A. R. Johnson. (1991). Differential effects of laminin and merosin on neurite outgrowth by developing retinal ganglion cells. *J Cell Sci Suppl*, 15, 1-7. doi:10.1242/jcs.1991.supplement_15.1
- Connor, R. J., P. Menzel & E. B. Pasquale. (1998). Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Dev Biol*, 193(1), 21-35. doi:10.1006/dbio.1997.8786
- Davy, A., N. W. Gale, E. W. Murray, R. A. Klinghoffer, P. Soriano, C. Feuerstein, et al. (1999). Compartmentalized signaling by GPI-anchored ephrin-A5 requires the Fyn tyrosine kinase to regulate cellular adhesion. *Genes Dev*, 13(23), 3125-3135.
- Drescher, U., C. Kremoser, C. Handwerker, J. Loschinger, M. Noda & F. Bonhoeffer. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell*, 82(3), 359-370.
- Feldheim, D. A. & D. D. O'Leary. (2010). Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules, and competition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(11), a001768. doi:10.1101/cshperspect.a001768

- Fiederling, M. Weschenfelder, M. Fritz, A. von Philipsborn, M. Bastmeyer & F. Weth. (2017). Ephrin-A/EphA specific co-adaptation as a novel mechanism in topographic axon guidance. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.25533
- Fiederling, Felix. (2012). *Modellierung und experimentelle Untersuchung der Adaptation des Reverse Signaling in retinalen Wachstumskegeln*. (Master Thesis), Karlsruher Institut für Technologie,
- Fiederling, Felix. (2016). *Experimental Investigation and Modeling of Growth Cone Adaptation in the Development of Topographic Projections*. (PhD Thesis), Karlsruher Institut für Technologie,
- Fritz, Martin. (2012). *Mechanismen der Adaptation retinaler Wachstumskegel an das axonale Lenkungssignal Ephrin-A5*. (PhD Thesis), Karlsruher Institut für Technologie,
- Gale, N. W., S. J. Holland, D. M. Valenzuela, A. Flenniken, L. Pan, T. E. Ryan, et al. (1996). Eph receptors and ligands comprise two major specificity subclasses and are reciprocally compartmentalized during embryogenesis. *Neuron*, 17(1), 9-19. doi:10.1016/s0896-6273(00)80276-7
- Gautier, A., A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Corrêa, M. Kindermann, F. Beaufils, et al. (2008). An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol*, 15(2), 128-136. doi:10.1016/j.chembiol.2008.01.007
- Gebhardt, C., M. Bastmeyer & F. Weth. (2012). Balancing of ephrin/Eph forward and reverse signaling as the driving force of adaptive topographic mapping. *Development*, 139(2), 335-345. doi:10.1242/dev.070474
- Gebhardt, Christoph. (2009). *Development & Experimental Validation Development & Experimental Validation of a Novel Computational Model of Retinotopic Mapping Retinotopic Mapping*. (PhD), Technische Universität Karlsruhe,
- Gierer, A. (1981). Development of projections between areas of the nervous system. *Biol Cybern*, 42(1), 69-78. doi:10.1007/BF00335161
- Goldberg, J. L., J. S. Espinosa, Y. Xu, N. Davidson, G. T. Kovacs & B. A. Barres. (2002). Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signaling and electrical activity. *Neuron*, 33(5), 689-702. doi:10.1016/s0896-6273(02)00602-5
- Gomez, T. M. & P. C. Letourneau. (2014). Actin dynamics in growth cone motility and navigation. *J Neurochem*, 129(2), 221-234. doi:10.1111/jnc.12506
- Goodhill, G. J. (2007). Contributions of theoretical modeling to the understanding of neural map development. *Neuron*, 56(2), 301-311. doi:10.1016/j.neuron.2007.09.027

- Gosse, N. J., L. M. Nevin & H. Baier. (2008). Retinotopic order in the absence of axon competition. *Nature*, 452(7189), 892-895. doi:10.1038/nature06816
- Green, M. & J. Sambrook. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Vol. 1): Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans*, 40(6), 1378-1382. doi:10.1042/BST20120103
- Hamburger, V. & H. L. Hamilton. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn*, 195(4), 231-272. doi:10.1002/aja.1001950404
- Hansen, M. J., G. E. Dallal & J. G. Flanagan. (2004). Retinal axon response to ephrin-as shows a graded, concentration-dependent transition from growth promotion to inhibition. *Neuron*, 42(5), 717-730. doi:10.1016/j.neuron.2004.05.009
- Himanen, J. P., M. J. Chumley, M. Lackmann, C. Li, W. A. Barton, P. D. Jeffrey, et al. (2004). Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci*, 7(5), 501-509. doi:10.1038/nn1237
- Himanen, J. P., L. Yermekbayeva, P. W. Janes, J. R. Walker, K. Xu, L. Atapattu, et al. (2010). Architecture of Eph receptor clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(24), 10860-10865. doi:10.1073/pnas.1004148107
- Hindges, R., T. McLaughlin, N. Genoud, M. Henkemeyer & D. O'Leary. (2002). EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron*, 35(3), 475-487.
- Holt, C. E. & W. A. Harris. (1983). Order in the initial retinotectal map in *Xenopus*: a new technique for labelling growing nerve fibres. *Nature*, 301(5896), 150-152. doi:10.1038/301150a0
- Hornberger, M. R., D. Dutting, T. Ciossek, T. Yamada, C. Handwerker, S. Lang, et al. (1999). Modulation of EphA receptor function by coexpressed ephrinA ligands on retinal ganglion cell axons. *Neuron*, 22(4), 731-742.
- Kania, A. & R. Klein. (2016). Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(4), 240-256. doi:10.1038/nrm.2015.16
- Kao, T. J. & A. Kania. (2011). Ephrin-mediated cis-attenuation of Eph receptor signaling is essential for spinal motor axon guidance. *Neuron*, 71(1), 76-91. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.031

- Keppler, A., H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel & K. Johnsson. (2004). Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(27), 9955-9959. doi:10.1073/pnas.0401923101
- Knoll, B., C. Weinl, A. Nordheim & F. Bonhoeffer. (2007). Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. *Nat Protoc*, 2(5), 1216-1224. doi:10.1038/nprot.2007.157
- Kornstädt, Lisa. (2017). *Etablierung HaloTag-markierter Lenkungs moleküle zur Untersuchung der Mechanismen der retinotectalen Projektion*. (Master), Karlsruher Institut für Technologie,
- Koser, D. E., A. J. Thompson, S. K. Foster, A. Dwivedy, E. K. Pillai, G. K. Sheridan, et al. (2016). Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci*, 19(12), 1592-1598. doi:10.1038/nn.4394
- Kullander, K. & R. Klein. (2002). Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(7), 475-486. doi:10.1038/nrm856
- Latour, R. A. (2020). Fundamental Principles of the Thermodynamics and Kinetics of Protein Adsorption to Material Surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 191, 110992. doi:10.1016/j.colsurfb.2020.110992
- Lemke, G. & M. Reber. (2005). Retinotectal mapping: new insights from molecular genetics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 551-580. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.022403.093702
- Lim, Y. S., T. McLaughlin, T. C. Sung, A. Santiago, K. F. Lee & D. D. O'Leary. (2008). p75(NTR) mediates ephrin-A reverse signaling required for axon repulsion and mapping. *Neuron*, 59(5), 746-758. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.032
- Lisabeth, E. M., G. Falivelli & E. B. Pasquale. (2013). Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(9). doi:10.1101/cshperspect.a009159
- Luckenbill-Edds, L. (1997). Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth. *Brain Res Brain Res Rev*, 23(1-2), 1-27.
- Mann, F., S. Ray, W. Harris & C. Holt. (2002). Topographic mapping in dorsoventral axis of the Xenopus retinotectal system depends on signaling through ephrin-B ligands. *Neuron*, 35(3), 461-473. doi:10.1016/s0896-6273(02)00786-9
- Marler, K. J., E. Becker-Barroso, A. Martínez, M. Llovera, C. Wentzel, S. Poopalasundaram, et al. (2008). A TrkB/EphrinA interaction controls retinal axon branching and synaptogenesis. *J Neurosci*, 28(48), 12700-12712. doi:10.1523/JNEUROSCI.1915-08.2008

- Marler, K. J., S. Poopalasundaram, E. R. Broom, C. Wentzel & U. Drescher. (2010). Pro-neurotrophins secreted from retinal ganglion cell axons are necessary for ephrinA-p75NTR-mediated axon guidance. *Neural Dev*, 5, 30. doi:10.1186/1749-8104-5-30
- Marler, K. J., P. Sutterlin, A. Doplapudi, A. Rubikaite, J. Adnan, N. A. Maiorano, et al. (2014). BDNF promotes axon branching of retinal ganglion cells via miRNA-132 and p250GAP. *J Neurosci*, 34(3), 969-979. doi:10.1523/JNEUROSCI.1910-13.2014
- Marquardt, T., R. Shirasaki, S. Ghosh, S. E. Andrews, N. Carter, T. Hunter, et al. (2005). Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. *Cell*, 121(1), 127-139. doi:10.1016/j.cell.2005.01.020
- McIlvaine, T. C. (1921). A Buffer Solution For Colorimetric Comparison. *J. Biol. Chem.*, 49, 183-186.
- McKee, K. K., E. Hohenester, M. Aleksandrova & P. D. Yurchenco. (2021). Organization of the laminin polymer node. *Matrix Biol*, 98, 49-63. doi:10.1016/j.matbio.2021.05.004
- Menzel, P., F. Valencia, P. Godement, V. C. Dodelet & E. B. Pasquale. (2001). Ephrin-A6, a new ligand for EphA receptors in the developing visual system. *Dev Biol*, 230(1), 74-88. doi:10.1006/dbio.2000.0109
- Mey, J. & S. Thanos. (2000). Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res Brain Res Rev*, 32(2-3), 343-379. doi:10.1016/s0016-0173(99)00022-3
- Meyer-Franke, A., M. R. Kaplan, F. W. Pfrieger & B. A. Barres. (1995). Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron*, 15(4), 805-819. doi:10.1016/0896-6273(95)90172-8
- Meyer-Franke, A., G. A. Wilkinson, A. Kruttgen, M. Hu, E. Munro, M. G. Hanson, et al. (1998). Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron*, 21(4), 681-693. doi:10.1016/s0896-6273(00)80586-3
- Monschau, B., C. Kremoser, K. Ohta, H. Tanaka, T. Kaneko, T. Yamada, et al. (1997). Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *EMBO J*, 16(6), 1258-1267. doi:10.1093/emboj/16.6.1258
- Mortimer, D., T. Fothergill, Z. Pujic, L. J. Richards & G. J. Goodhill. (2008). Growth cone chemotaxis. *Trends Neurosci*, 31(2), 90-98. doi:10.1016/j.tins.2007.11.008
- Mueller, B. K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci*, 22, 351-388. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.351

- Nakamura, H. & D. D. O'Leary. (1989). Inaccuracies in initial growth and arborization of chick retinotectal axons followed by course corrections and axon remodeling to develop topographic order. *J Neurosci*, 9(11), 3776-3795. doi:10.1523/JNEUROSCI.09-11-03776.1989
- Nichol, R. H., K. M. Hagen, D. C. Lumbard, E. W. Dent & T. M. Gómez. (2016). Guidance of Axons by Local Coupling of Retrograde Flow to Point Contact Adhesions. *J Neurosci*, 36(7), 2267-2282. doi:10.1523/JNEUROSCI.2645-15.2016
- Nikolov, D. B., K. Xu & J. P. Himanen. (2013). Eph/ephrin recognition and the role of Eph/ephrin clusters in signaling initiation. *Biochim Biophys Acta*, 1834(10), 2160-2165. doi:10.1016/j.bbapap.2013.04.020
- Noberini, R., I. Lamberto & E. B. Pasquale. (2012). Targeting Eph receptors with peptides and small molecules: progress and challenges. *Semin Cell Dev Biol*, 23(1), 51-57. doi:10.1016/j.semcdcb.2011.10.023
- Noberini, R., E. Rubio de la Torre & E. B. Pasquale. (2012). Profiling Eph receptor expression in cells and tissues: a targeted mass spectrometry approach. *Cell Adh Migr*, 6(2), 102-112. doi:10.4161/cam.19620
- Pasquale, E. B. (2004). Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nat Neurosci*, 7(5), 417-418. doi:10.1038/nn0504-417
- Pfeiffenberger, C., J. Yamada & D. A. Feldheim. (2006). Ephrin-As and patterned retinal activity act together in the development of topographic maps in the primary visual system. *J Neurosci*, 26(50), 12873-12884. doi:10.1523/JNEUROSCI.3595-06.2006
- Raper, J. A. & E. B. Grunewald. (1990). Temporal retinal growth cones collapse on contact with nasal retinal axons. *Exp Neurol*, 109(1), 70-74. doi:10.1016/s0014-4886(05)80009-3
- Rashid, T., A. L. Upton, A. Blentic, T. Ciossek, B. Knoll, I. D. Thompson, et al. (2005). Opposing gradients of ephrin-As and EphA7 in the superior colliculus are essential for topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*, 47(1), 57-69. doi:10.1016/j.neuron.2005.05.030
- Rosentreter, S. M., R. W. Davenport, J. Loschinger, J. Huf, J. Jung & F. Bonhoeffer. (1998). Response of retinal ganglion cell axons to striped linear gradients of repellent guidance molecules. *J Neurobiol*, 37(4), 541-562.
- Ruisi, Sebastiana. (2019). *Etablierung von Methoden zur Rekonstitution und mechanistischen Untersuchung topographisch richtiger Lenkung retinaler Axone in vitro*. (Master Thesis), Karlsruher Institut für Technologie,

- Sharma, S. C. (1972). Reformation of retinotectal projections after various tectal ablations in adult goldfish. *Exp Neurol*, 34(1), 171-182.
- Shen, S., A. P. Wiemelt, F. A. McMorris & B. A. Barres. (1999). Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron*, 23(2), 285-295. doi:10.1016/s0896-6273(00)80780-1
- Shi, X., R. Lingerak, C. J. Herting, Y. Ge, S. Kim, P. Toth, et al. (2023). Time-resolved live-cell spectroscopy reveals EphA2 multimeric assembly. *Science*, 382(6674), 1042-1050. doi:10.1126/science.adg5314
- Shintani, T., M. Ihara, S. Tani, J. Sakuraba, H. Sakuta & M. Noda. (2009). APC2 plays an essential role in axonal projections through the regulation of microtubule stability. *J Neurosci*, 29(37), 11628-11640. doi:10.1523/JNEUROSCI.2394-09.2009
- Sipkova, Jana & Kristian Franze. (2024). Eph/ephrin signalling in the developing brain is regulated by tissue stiffness. *bioRxiv*, 2024.2002.2015.580461. doi:10.1101/2024.02.15.580461
- Sperry, R.W. (1963). Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 50(4), 703-710. doi:10.1073/pnas.50.4.703
- Suettlerlin, P. & U. Drescher. (2014). Target-independent ephrina/EphA-mediated axon-axon repulsion as a novel element in retinocollicular mapping. *Neuron*, 84(4), 740-752. doi:10.1016/j.neuron.2014.09.023
- Sultana, A. & J. E. Lee. (2015). Measuring protein-protein and protein-nucleic Acid interactions by biolayer interferometry. *Curr Protoc Protein Sci*, 79, 19.25.11-19.25.26. doi:10.1002/0471140864.ps1925s79
- Thanos, S. & F. Bonhoeffer. (1983). Investigations on the development and topographic order of retinotectal axons: anterograde and retrograde staining of axons and perikarya with rhodamine in vivo. *J Comp Neurol*, 219(4), 420-430. doi:10.1002/cne.902190404
- Thanos, S. & F. Bonhoeffer. (1987). Axonal arborization in the developing chick retinotectal system. *J Comp Neurol*, 261(1), 155-164. doi:10.1002/cne.902610114
- Thanos, S. & J. Mey. (2001). Development of the visual system of the chick. II. Mechanisms of axonal guidance. *Brain Res Brain Res Rev*, 35(3), 205-245. doi:10.1016/s0165-0173(01)00049-2
- Tillberg, P. W., F. Chen, K. D. Piatkevich, Y. Zhao, C. C. Yu, B. P. English, et al. (2016). Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nat Biotechnol*, 34(9), 987-992. doi:10.1038/nbt.3625

- Vanselow, J., S. Thanos, P. Godement, S. Henke-Fahle & F. Bonhoeffer. (1989). Spatial arrangement of radial glia and ingrowing retinal axons in the chick optic tectum during development. *Brain Res Dev Brain Res*, 45(1), 15-27. doi:10.1016/0165-3806(89)90003-5
- Vergara, M. N. & M. V. Canto-Soler. (2012). Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. *Neural Dev*, 7, 22. doi:10.1186/1749-8104-7-22
- Vielmetter, J., B. Stolze, F. Bonhoeffer & C. A. Stuermer. (1990). In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp Brain Res*, 81(2), 283-287.
- Vitriol, E. A. & J. Q. Zheng. (2012). Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron*, 73(6), 1068-1081. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.005
- von Boxberg, Y., S. Deiss & U. Schwarz. (1993). Guidance and topographic stabilization of nasal chick retinal axons on target-derived components in vitro. *Neuron*, 10(3), 345-357. doi:10.1016/0896-6273(93)90325-I
- von Philipsborn, A. C., S. Lang, J. Loeschinger, A. Bernard, C. David, D. Lehnert, et al. (2006). Growth cone navigation in substrate-bound ephrin gradients. *Development*, 133(13), 2487-2495. doi:10.1242/dev.02412
- Vullhorst, D., T. Ahmad, I. Karavanova, C. Keating & A. Buonanno. (2017). Structural Similarities between Neuregulin 1-3 Isoforms Determine Their Subcellular Distribution and Signaling Mode in Central Neurons. *J Neurosci*, 37(21), 5232-5249. doi:10.1523/JNEUROSCI.2630-16.2017
- Walter, J. (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development*, 101(4), 685-696.
- Walter, J., S. Henke-Fahle & F. Bonhoeffer. (1987). Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development*, 101(4), 909-913. doi:10.1242/dev.101.4.909
- Wassie, A. T., Y. Zhao & E. S. Boyden. (2019). Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nat Methods*, 16(1), 33-41. doi:10.1038/s41592-018-0219-4
- Wen, G., V. Leen, T. Rohand, M. Sauer & J. Hofkens. (2023). Current Progress in Expansion Microscopy: Chemical Strategies and Applications. *Chem Rev*, 123(6), 3299-3323. doi:10.1021/acs.chemrev.2c00711
- Weschenfelder, M., F. Weth, B. Knoll & M. Bastmeyer. (2013). The stripe assay: studying growth preference and axon guidance on binary choice substrates in vitro. *Methods Mol Biol*, 1018, 229-246. doi:10.1007/978-1-62703-444-9_22

- Weschenfelder, Markus. (2014). *Expression rekombinanter Sensoren zur Visualisierung der Oberflächendynamik des Eph/ephrin-Systems in retinalen Wachstumskegeln des Huhns*. (PhD Thesis), Karlsruher Institut für Technologie,
- Weth, F., F. Fiederling, C. Gebhardt & M. Bastmeyer. (2014). Chemoaffinity in topographic mapping revisited--is it more about fiber-fiber than fiber-target interactions? *Semin Cell Dev Biol*, 35, 126-135. doi:10.1016/j.semcd.2014.07.010
- Wimmer-Kleikamp, S. H., P. W. Janes, A. Squire, P. I. Bastiaens & M. Lackmann. (2004). Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *J Cell Biol*, 164(5), 661-666. doi:10.1083/jcb.200312001
- Yates, P.A. , A. L. Roskies, T. McLaughlin & D. D. O'Leary. (2001). Topographic-specific axon branching controlled by ephrin-As is the critical event in retinotectal map development. *J Neurosci*, 21(21), 8548-8563. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-21-08548.2001
- Yates, P.A., A.D. Holub, T. McLaughlin, T.J. Sejnowski & D.D. O'Leary. (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. doi:10.1002/neu.10341
- 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., R. Suzuki, F. Kano, T. Ohkawara, M. Murata & M. Noda. (2003). Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *Eur J Neurosci*, 17(11), 2329-2343. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02664.x
- Zhang, C., J. S. Kang, S. M. Asano, R. Gao & E. S. Boyden. (2020). Expansion Microscopy for Beginners: Visualizing Microtubules in Expanded Cultured HeLa Cells. *Curr Protoc Neurosci*, 92(1), e96. doi:10.1002/cpns.96

Publikationsliste

Keine Publikationen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Einen besonderen Dank an Prof. Dr. Martin Bastmeyer und Dr. Franco Weth für die Möglichkeit, mich diesem besonders spannendem Thema widmen zu dürfen. Für die konstruktiven und inspirierenden Diskussionen, sowie die fachliche Unterstützung durch die ich sehr viel lernen durfte.

Dankeschön auch an Prof. Dr. Sylvia Erhardt für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Magdalena Fladung danke ich für die Herstellung der Dreiecksgradienten am *Nanoscribe*.

Bei Gabriele Gerdon, Lena Parzer, Lea Kälber, Julia Müller und Lena Schäfer bedanke ich mich für die engagierte Mitarbeit an meinem Projekt, insbesondere bei Fynn Burger-Fesser für die Simulation der axonalen Lenkung in asymmetrischen Gradienten.

All meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen sowie für die gegenseitige Unterstützung und die tolle Atmosphäre.

Meiner Familie und meinen Großeltern, die mir den Weg zum Studium und damit hier her gegeben haben.

Und zuletzt ein großes Dankeschön an Sascha. Ohne deine unermüdliche Unterstützung, deinen Zuspruch und deinen Rückhalt in jeder Hinsicht wäre all dies wohl nicht möglich gewesen.