

**Funktion und Expression des synapseninduzierenden
Proteoglykans Agrin in Ganglienzellen der embryonalen
Hühnerretina**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von
Maik Annies
aus Hattingen

Frankfurt am Main (2001)

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. J. Engels
Gutachter: Prof. Dr. E. Bamberg
Priv. Doz. Dr. S. Kröger
Datum der Disputation: 16.8.2001

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Neumann,F.R., Bittcher,G., Annies,M., Schumacher,B., Kröger,S. & Ruegg,M.A. (2001) An
alternative amino-terminus expressed in the central nervous system converts agrin to a type II
transmembrane protein. *Mol.Cell Neurosci.*, **17**, 208-225.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der neuroanatomischen Abteilung von Prof. Dr. Heinz Wässle am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt am Main unter direkter Anleitung von Priv. Doz. Dr. Stephan Kröger in der Zeit von November 1997 bis Mai 2001 durchgeführt.

Mein wissenschaftlicher und persönlicher Dank gilt:

Dr. Stephan Kröger für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit sowie zahlreiche hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Prof. Dr. Heinz Wässle für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Prof. Dr. E. Bamberg für die Vertretung dieser Arbeit an der Universität Frankfurt.

Dr. Dario Protti und Christopher Habermann für die Unterstützung und zahlreiche Diskussionen bei der Durchführung der elektrophysiologischen Experimente.

Prof. Dr. Friedrich Bonhoeffer und Dr. Jürgen Löschinger vom MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen für die Unterstützung bei der Durchführung der Zeitraffer-Videomikroskopie.

Dr. Frank Pfrieder vom MDC in Berlin für die Einführung in die Immunopanning-Technik.

Prof. Dr. Alfredo Rodriguez-Tebar vom Instituto Cajal de Neurobiologia in Madrid für die Überlassung des anti-Thy-1-Antikörpers.

Christa Ziegler für die unermüdliche technische Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der neuroanatomischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung, insbesondere meinen Kollegen Dr. Martina Blank, Dr. Heike Hering und Jörn Schröder für zahlreiche hilfreiche Diskussionen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung und Hilfe danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Domänenstruktur von Agrin	2
1.2 Mechanismus der Agrin-induzierten Acetylcholinrezeptor-Aggregation	5
1.3 Agrin im Zentralnervensystem	6
1.4 Axonales Wachstum von retinalen Ganglienzellen zum optischen Tectum im Hühnerembryo.....	9
2. Zielsetzung	11
3. Material	12
3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	12
3.2 Substanzen für die Histologie.....	12
3.3 Substanzen für die Molekularbiologie.....	12
3.4 Substanzen für die Proteinchemie	13
3.5 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Substanzen für die Zellkultur.....	13
3.6 Kits.....	14
3.7 Bakterienstamm (<i>E.coli</i>).....	14
3.8 Plasmid	14
3.9 Antikörper zur Induktion von Mikrodornen.....	15
3.10 Primäre Antikörper für Immunfärbungen.....	16
3.11 Sekundärantikörper.....	16
3.12 Synthetische Oligonucleotide (Primer).....	17
4. Methoden	18
4.1 Tiere.....	18
4.2 Zellbiologische Methoden	18
4.2.1 Aufreinigung von retinalen Ganglienzellen durch Immunopanning.....	18
4.2.2 Kultur von Rückenmarksneuronen.....	21
4.2.3 Kultur und Transfektion von HEK-293-Zellen	21
4.2.4 Videomikroskopie	22

4.3	Quantitative Auswertungen	22
4.3.1	Quantitative Auswertung von Änderungen der Wachstumskegelmorphologie	22
4.3.2	Quantitative Auswertung der Anzahl induzierter Acetylcholinrezeptor-Aggregate auf kultivierten Muskelfasern	23
4.3.3	Quantitative Auswertung der Bildung von Mikrodornen.....	23
4.4	Neuroanatomische Methoden	25
4.4.1	Histologie.....	25
4.4.2	Immunhistochemie	25
4.4.3	Retrograde Markierung von retinalen Ganglienzellen	26
4.5	Proteinchemische Methoden.....	26
4.5.1	Isolierung von membranassoziierten Proteinen.....	26
4.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	27
4.6	Molekularbiologische Methoden.....	27
4.6.1	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	27
4.6.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	27
4.6.3	Polymerase Kettenreaktion.....	28
4.6.4	Einzelzell-RT-PCR von embryonalen retinalen Ganglienzellen.....	29
4.6.5	Gelelektrophorese von DNA	32
4.6.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
4.6.7	Klonierung von PCR-Fragmenten.....	32
4.6.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> (Minipräp).....	33
4.6.9	Restriktionsverdau von DNA	33

5. Ergebnisse **34**

5.1	Expression von Agrin in Ganglienzellen der embryonalen Hühnerretina.....	34
5.1.1	Retinale Ganglienzellen exprimieren mehrere Agrin-Isoformen	34
5.1.2	Expression von Agrin-Isoformen in einzelnen retinalen Ganglienzellen.....	36
5.1.3	Expression von sekretiertem und Transmembran-Agrin in der Retina und in aufgereinigten retinalen Ganglienzellen	39
5.2	Biologische Aktivität von ganglienzellassoziertem Agrin	40
5.3	Acetylcholinrezeptor-Aggregationsaktivität von Transmembran-Agrin auf kultivierten Muskelfasern	45
5.4	Funktion von Agrin während des axonalen Wachstums von retinalen Ganglienzellen	46
5.4.1	Ausbildung von Mikrodornen auf Axonen von retinalen Ganglienzellen.....	46

5.4.2 Bildung von Mikrodornen durch aktive Reorganisation des axonalen Zytoskeletts	47
5.4.3 Spezifität der Mikrodornenbildung.....	48
5.4.4 Bildung von Mikrodornen ist konzentrations- und zeitabhängig	50
5.4.5 Substratabhängigkeit der Bildung von Mikrodornen	52
5.4.6 Bildung von Mikrodornen auf Axonen anderer Neuronentypen.....	53
5.4.7 Zeitraffer-Videomikroskopie der Mikrodornenbildung	54
5.4.8 Molekulare Zusammensetzung der Mikrodornen.....	56
5.4.9 Abhängigkeit der Mikrodornenbildung von intrazellulärem Kalzium	58
5.4.10 Rolle von Proteinkinase C, Tyrosin-Phosphatasen und Heparin bei der Bildung von Mikrodornen	60
5.4.11 Induktion von Mikrodornen durch einen potentiellen Liganden von Transmembran-Agrin	62
5.4.12 Größenvergleich der Mikrodornen	64
5.5 Untersuchung eines wachstumskegelstabilisierenden Effektes der anti-Agrin-Antiseren	65
6. Diskussion	68
6.1 Expression von Agrin in retinalen Ganglienzellen.....	68
6.2 Biologische Aktivität von ganglienzellassoziertem Agrin	71
6.3 Transmembran-Agrin vermittelt die Bildung von Mikrodornen auf wachsenden Axonen	72
6.4 Mechanismus und Funktion der Mikrodornenbildung	76
7. Zusammenfassung.....	83
8. Literatur.....	85
9. Abkürzungen	95
10. Lebenslauf.....	97

1. Einleitung

Das extrazelluläre Matrixprotein Agrin ist einer der Hauptregulatoren der Synapsenbildung an einer speziellen Synapse des peripheren Nervensystems (PNS), der neuromuskulären Endplatte (NMJ) (Sanes und Lichtman, 1999). Die NMJ stellt die Kommunikationsstelle zwischen der Axonendigung eines Motoneurons und der Skelettmuskelfaser dar. Sowohl die Axonendigung des Motoneurons als auch die Skelettmuskelfaser sind im Bereich der NMJ biochemisch als auch morphologisch hochspezialisiert. Diese Spezialisierungen sind notwendig für die synaptische Übertragung. Im Bereich der Axonendigung des Motoneurons findet sich eine hohe Konzentration synaptischer Vesikel, die den Neurotransmitter Acetylcholin enthalten. Diese Vesikel befinden sich insbesondere im Bereich einer Verdickung der präsynaptischen Membran, der aktiven Zone, an der die Fusion der Vesikel mit der Membran und die nachfolgende Freisetzung des Neurotransmitters in den synaptischen Spalt stattfindet. Der aktiven Zone der Axonendigung gegenüberliegend befindet sich der postsynaptische Apparat der Skelettmuskelfaser, der eine hohe Konzentration verschiedener postsynaptischer Proteine aufweist, die an der synaptischen Signalübertragung an der NMJ beteiligt sind oder zu deren Stabilität beitragen. Das wohl wichtigste dieser postsynaptischen Proteine ist der Acetylcholinrezeptor (AChR). Etwa 95 % aller AChR der Skelettmuskelfaser befinden sich im Bereich der NMJ, die lediglich 0,1 % der Gesamtoberfläche der Muskelfaser ausmacht (Froehner, 1991). Die AChR-Dichte erhöht sich dabei auf ca. $10.000/\mu\text{m}^2$ an der NMJ (Fertuck und Salpeter, 1974). Neben dem AChR sind eine ganze Reihe weiterer Proteine an der NMJ konzentriert wie z.B. das Enzym Acetylcholinesterase, das für die chemische Spaltung des Neurotransmitters und damit die schnelle Beendigung der synaptischen Übertragung verantwortlich ist (McMahan et al., 1978).

Jede Skelettmuskelfaser ist von einer kondensierten Form extrazellulärer Matrix, der sogenannten Basallamina, umhüllt, die eine Reihe von Extrazellulärmatrix- und Adhäsionsmolekülen wie z.B. Laminin und Kollagen enthält (Halfter et al., 2000). Sie füllt den synaptischen Spalt zwischen Axonendigung und Muskelfaser und umschließt die umgebenden Schwannschen Zellen. Der Basallamina im synaptischen Spalt kommt eine entscheidende Funktion bei der Bildung der prä- und postsynaptischen Spezialisierungen an der NMJ zu. Basallaminagebundene Faktoren sind für die Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der NMJ verantwortlich (Sanes et al., 1978; Burden et al., 1979). Einer dieser Faktoren, genannt Agrin (von ageirein, griech.: zusammenbringen), bewirkt die Ausbildung

der postsynaptischen Spezialisierungen. Er konnte aufgrund seiner Fähigkeit isoliert werden, auf kultivierten Muskelfasern Aggregate auszubilden, die denen an der NMJ ähneln und Moleküle enthalten, die auch an der NMJ konzentriert sind (Godfrey et al., 1984; Nitkin et al., 1987). Agrin ist in der Basallamina des synaptischen Spaltes konzentriert (Reist et al., 1987) und befindet sich außerdem in Zellkörpern von Motoneuronen im ventralen Horn des Rückenmarks sowie in Blutgefäßen und Nierenglomeruli (Magill-Solc und McMahan, 1988; Godfrey, 1991).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde von McMahan die sogenannte Agrin-Hypothese formuliert, die sich bis heute weitgehend bestätigt hat (McMahan, 1990). Danach wird Agrin in den Zellkörpern von Motoneuronen im ventralen Horn des Rückenmarks synthetisiert und zur Axonendigung des Motoneurons transportiert, wo es lokal freigesetzt wird und stabil an die Basallamina im synaptischen Spalt bindet. Auf der Oberfläche der Muskelfaser induziert Agrin schließlich die Aggregation der AChR und anderer postsynaptischer Komponenten.

Die synaptogene Aktivität Agrins an der NMJ konnte durch die Erzeugung und Charakterisierung einer Agrin-defizienten Maus, die eine Deletion im Agrin-Gen trägt, bestätigt werden (Gautam et al., 1996). Diese transgenen Mäuse sterben bei der Geburt aufgrund fehlender Synapsen u.a. der Atemmuskulatur. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen außerdem ein Fehlen jeglicher synaptischer Spezialisierungen in der Skelettmuskulatur. AChR-Aggregate auf der Oberfläche der Muskelfasern sind allgemein kleiner als bei Wildtypmäusen und gleichmäßig über die gesamte Oberfläche der Muskelfasern verteilt. Daneben werden Störungen der präsynaptischen Differenzierung der Motoneurone sowie der AChR-Transkription im Muskel beobachtet.

1.1 Domänenstruktur von Agrin

Weitgehend homologe Agrin-cDNAs konnten aus den verschiedensten Spezies isoliert werden wie z.B. dem Zitterrochen *Discopyge ommata* (Smith et al., 1992), der Ratte (Rupp et al., 1991), dem Huhn (Tsim et al., 1992; Denzer et al., 1995) und dem Menschen (Groffen et al., 1998). Diese cDNA-Sequenzen sagen verschiedene strukturelle Domänen voraus, beispielsweise vier Domänen mit Ähnlichkeit zum epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), drei Domänen mit Ähnlichkeit zur globulären Domäne der Laminin- α -Kette (G-Domänen), eine Domäne mit Ähnlichkeit zur Laminin Domäne III sowie neun Domänen mit Ähnlichkeit zu Follistatin (s. Abb. 1). Die dritte C-terminale Domäne mit Homologie zur Laminin- α -Kette (G3-Domäne) ist für die Ausbildung von AChR-Aggregaten auf Muskelfasern notwendig und

hinreichend (Gesemann et al., 1995, 1996; Hopf und Hoch, 1996). Außerdem ist im Bereich der G2-Domäne eine Bindungsstelle für das Polyanion Heparin lokalisiert (Gesemann et al., 1996). Heparin ist in der Lage, die AChR-Aggregationsaktivität von Agrin auf kultivierten Muskelfasern zu inhibieren (Wallace, 1990). Ferner zeigt sich auf der G1- und G2-Domäne mit den flankierenden EGF-Domänen eine Bindungsstelle für das membranassoziierte Protein α -Dystroglykan (Gesemann et al., 1996; Hopf und Hoch, 1996).

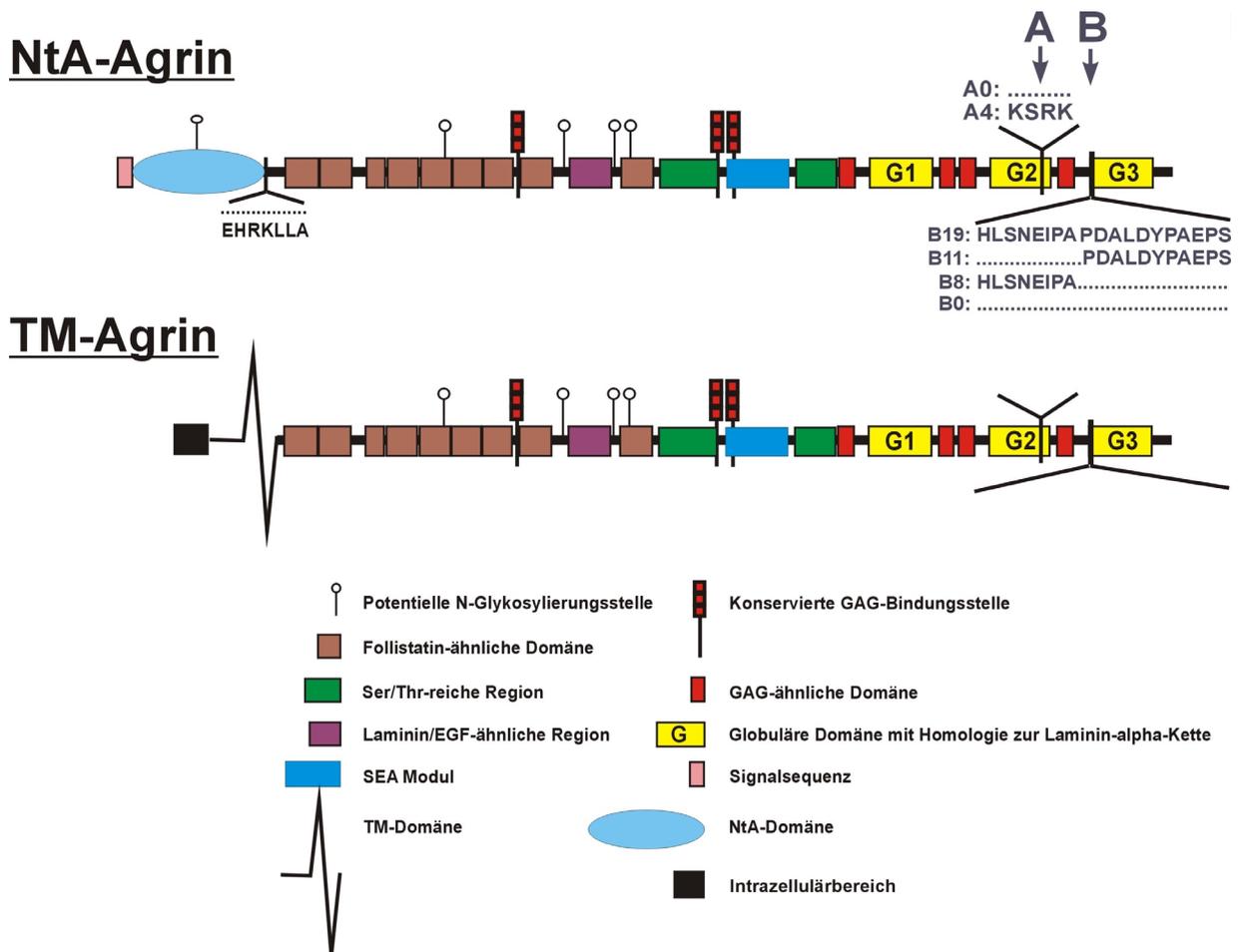


Abb. 1 Domänenstruktur der beiden N-terminalen Isoformen des Agrin-Proteins. Lösliches Agrin (NtA-Agrin) besitzt einen im Vergleich zur Transmembranform (TM-Agrin) längeren N-Terminus. TM-Agrin ist ein Transmembranprotein mit N_{zyto}/C_{exo} -Orientierung. Beide Isoformen unterscheiden sich lediglich in ihrem N-Terminus. Im C-terminalen Bereich befinden sich die Spleißstellen A und B. Eine weitere Spleißstelle findet sich im N-Terminus von NtA-Agrin.

Die Agrin-cDNA des Huhns kodiert ein Protein mit einem berechneten Molekulargewicht von 220 kDa. Im Western Blot läßt sich jedoch eine breite Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 500 kDa nachweisen, was auf eine starke Glykosylierung des Proteins *in vivo* zurückzuführen ist (Gesemann et al., 1995; Tsen et al., 1995a; Kröger und Mann, 1996). Tatsächlich weist die Aminosäuresequenz von Agrin eine Reihe von Konsensussequenzen für N-Glykosylierungsstellen sowie Verknüpfungsstellen für GAG-Seitenketten auf. Da der Verdau mit Heparitinasen eine Reduktion des Molekulargewichts bewirkt (Tsen et al., 1995a), gehört Agrin somit zur Klasse der Heparansulfatproteoglykane.

Agrin existiert in verschiedenen N- und C-terminalen Isoformen, die durch alternatives Spleißen einer gemeinsamen Vorläufer mRNA gebildet werden (s. Abb. 1). Der N-terminale Bereich tritt in zwei verschiedenen Isoformen auf. Neben einer längeren Variante mit der sogenannten NtA-Domäne kann in verschiedenen Spezies eine kürzere Variante identifiziert werden (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001). In dieser kurzen N-terminalen Isoform ist die NtA-Domäne durch eine kürzere Transmembrandomäne (TM-Domäne) ersetzt, wodurch Agrin in ein Typ II-Transmembranprotein mit einem zytoplasmatischen N-Terminus und einem in den Extrazellulärraum gerichteten C-Terminus ($N_{\text{zyto}}/C_{\text{exo}}$ -Orientierung) konvertiert wird. Wie die NtA-Isoform ist auch die TM-Isoform hochglykosyliert und gehört zur Klasse der Heparansulfatproteoglykane. Die Transmembrandomäne von Agrin wird durch ein einzelnes Exon kodiert (Neumann et al., 2001). Da die Verteilung der TM- und NtA-Form von Agrin in verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich ist, wird die Expression beider N-terminaler Isoformen wahrscheinlich durch unterschiedliche Promotoren reguliert. Der zytoplasmatische Anteil der TM-Domäne ist ausgesprochen kurz und weist keine Bindungsstellen für bekannte Signalmoleküle oder etwa Phosphorylierungsstellen auf. Während NtA-Agrin sowohl in verschiedenen neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben exprimiert wird, findet sich TM-Agrin fast ausschließlich im ZNS (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001). Die Funktion von TM-Agrin ist bisher unbekannt.

Die NtA-Form von Agrin wird voraussichtlich durch zwei verschiedene Exons kodiert und enthält neben der NtA-Domäne am äußersten N-terminalen Ende eine kurze Signalsequenz. Daneben befindet sich innerhalb des N-Terminus von NtA-Agrin eine weitere Spleißstelle mit unbekannter Funktion (Tsen et al., 1995b). Die NtA-Domäne ist für die Bindung von Agrin an die Basallamina speziell über Laminin-1 verantwortlich (Denzer et al., 1995). Bei dieser N-terminalen Isoform handelt es sich um die von Motoneuronen sekretierte Isoform, die für die synaptogene Aktivität von Agrin an der NMJ verantwortlich ist.

Im C-terminalen Bereich besitzt Agrin zwei weitere Spleißstellen, die im Huhn mit A und B (Ruegg et al., 1992; Tsim et al., 1992), in der Maus mit Y und Z (Ferns et al., 1993; Hoch et al., 1993) bezeichnet werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die Nomenklatur für die Spleißstellen im Huhn, also A und B, verwendet. Spleißstelle A enthält entweder ein Exon aus 4 Aminosäuren oder kein Exon. Spleißstelle B kann ein Exon aus 8, 11 oder 19 (8+11) Aminosäuren oder aber kein Exon enthalten. Von den somit theoretisch möglichen 8 Variationen im A- und B-Bereich existieren jedoch *in vivo* lediglich 5, nämlich A0B0, A4B0, A4B8, A4B11 und A4B19. Die verschiedenen Spleißvarianten unterscheiden sich dramatisch in ihrer Gewebeverteilung sowie in ihrer Fähigkeit AChR auf kultivierten Muskelfasern zu aggregieren (AChR-Aggregationsaktivität). Lediglich Isoformen mit einem Exon sowohl an Position A als auch an Position B sind in der Lage AChR zu aggregieren, wohingegen alle anderen Isoformen keine Aggregationsaktivität aufweisen (Ruegg et al., 1992; Ma et al., 1994; Gesemann et al., 1995). Agrin-Isoformen mit AChR-Aggregationsaktivität auf kultivierten Muskelfasern werden im folgenden als „aktive“ Agrin-Isoformen bezeichnet, Isoformen ohne AChR-Aggregationsaktivität als „inaktive“ Agrin-Isoformen. Die aktiven Agrin-Isoformen werden ausschließlich in neuronalen Geweben exprimiert, wohingegen die inaktiven Isoformen auch in nicht-neuronalen Geweben wie Niere, Blutgefäßen, Haut, Herz und Muskel nachgewiesen werden können (Godfrey et al., 1988a; Magill-Solc und McMahan, 1988; Godfrey, 1991; Halfter, 1993). Die Funktion dieser inaktiven Isoformen ist in diesen Geweben unbekannt.

1.2 Mechanismus der Agrin-induzierten Acetylcholinrezeptor-Aggregation

Agrin induziert die Aggregation von AChR durch die Bindung und nachfolgende Aktivierung eines noch nicht identifizierten Rezeptors auf der Oberfläche der Muskelfasern. Dies führt zur Aktivierung der muskelspezifischen Tyrosinkinase MuSK (Valenzuela et al., 1995). Die Beteiligung von MuSK an der Agrin-induzierten AChR-Aggregation an der NMJ stützt sich auf die Beobachtung, daß Mäuse mit einer Deletion des MuSK-Gens einen ähnlichen Phänotyp aufweisen wie Agrin-defiziente Mäuse (DeChiara et al., 1996). Daneben ist Agrin nicht in der Lage, auf Muskelfasern der MuSK-knockout-Maus AChR-Aggregate zu induzieren. Eine direkte Bindung von Agrin an MuSK kann jedoch ausgeschlossen werden (Glass et al., 1996). MuSK ist somit nicht der direkte Agrin-Rezeptor, sondern vermutlich der signaltransduzierende Teil in einem multimeren Rezeptorkomplex.

Die Zugabe von aktivem Agrin zu kultivierten Muskelfasern führt zu einer Autophosphorylierung von MuSK (Glass et al., 1996). Daneben kommt es im Verlauf der

Signaltransduktionskaskade zu einer Phosphorylierung der β -Untereinheit des AChR an Tyrosinresten (Wallace, 1992). Allerdings hat die Mutation dieser Tyrosin-Phosphorylierungsstellen der β -Untereinheit keinen Einfluß auf die AChR-Aggregation (Meyer und Wallace, 1998). Trotzdem sind Tyrosinphosphorylierungen bei der Agrin-induzierten AChR-Aggregation prinzipiell notwendig, da sich in Anwesenheit von Tyrosinkinase-Inhibitoren keine AChR-Aggregate auf Muskelfasern ausbilden (Wallace, 1994). Die genaue intrazelluläre Signaltransduktionskaskade zwischen der Aktivierung von MuSK und der Aggregation der AChR ist noch nicht geklärt.

Die Verankerung der AChR in der Membran der Muskelfaser wird wahrscheinlich durch das Protein rapsyn vermittelt. Es handelt sich hierbei um ein intrazelluläres Protein, das direkt an die β -Untereinheit des AChR (Burden et al., 1983) und außerdem über β -Spektrin und andere Proteine an Aktin-Filamente des Zytoskeletts binden kann (Bloch und Morrow, 1989). Auf diese Weise wird eine Verbindung der AChR mit dem Zytoskelett hergestellt. Die Beteiligung von rapsyn an der Agrin-induzierten AChR-Aggregation wird ferner durch die Beobachtung bestätigt, daß rapsyn-defiziente Mäuse ebenfalls Störungen in der Bildung der NMJ, insbesondere durch das Fehlen von AChR-Aggregaten, aufweisen (Gautam et al., 1995). Allerdings findet nach Zugabe von Agrin zu kultivierten Muskelfasern von rapsyn-defizienten Mäusen nach wie vor eine Phosphorylierung von MuSK statt, auch wenn keine AChR-Aggregate gebildet werden (Apel et al., 1997). Dies spricht für eine Aktivierung von rapsyn „downstream“ der Agrin-induzierten Phosphorylierung von MuSK innerhalb der Signaltransduktionskaskade.

1.3 Agrin im Zentralnervensystem

Agrin wird nicht nur im PNS exprimiert, sondern in einer ganzen Reihe weiterer Gewebetypen, u.a. auch im ZNS (Godfrey et al., 1988a; Magill-Solc und McMahan, 1988; Godfrey, 1991; Halfter, 1993). Während kein Zweifel an Agrins Funktion als Hauptregulator der Synaptogenese an der NMJ besteht, ist seine Funktion im ZNS weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Funktion von Agrin in einer speziellen Subpopulation von ZNS-Neuronen, nämlich Ganglienzellen der embryonalen Hühnerretina (RGCs), untersucht. Deshalb soll dieser spezielle Teil des ZNS an dieser Stelle kurz eingeführt werden.

Die Vertebratenretina stellt ein relativ einfach organisiertes System dar, das sich hervorragend für das Studium molekularer und zellulärer Prozesse bei der Ausbildung synaptischer Verschaltungen während der Embryonalentwicklung und der Signalverarbeitung

im ZNS eignet. Durch ihre exponierte Lage außerhalb des Gehirns ist die Retina experimentell leicht zugänglich. Sie ist ontogenetisch ein Teil des ZNS, da sie sich während der Embryonalentwicklung als Ausstülpung des Diencephalons bildet (Rodieck, 1988). Die Retina besteht aus lediglich 6 Hauptzelltypen, deren Zellkörper und Synapsen sich jeweils in definierten Schichten anordnen (Wässle und Boycott, 1991). Die Zellkörper von Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren finden sich in der sogenannten äußeren Körnerschicht (ONL). Sie sind in der Lage, Licht zu absorbieren und in ein gradiertes elektrisches Signal umzuwandeln, das über Bipolarzellen weitergeleitet und schließlich an RGCs übertragen wird. Die Aktionspotentiale werden über die Axone der RGCs, die im optischen Nerv verlaufen, an entsprechende höhere visuelle Zentren im Gehirn weitergeleitet. Dieser vertikale Signalfluß, der von dem excitatorischen Neurotransmitter Glutamat vermittelt wird, wird von Amakrin- und Horizontalzellen in einem horizontalen Signalweg moduliert. Dabei bilden Horizontalzellen Synapsen mit Photorezeptoren, Amakrinzellen dagegen mit Bipolarzellen und RGCs. Als Neurotransmitter werden hier Glycin, GABA und Acetylcholin verwendet. Die synaptischen Verschaltungen zwischen Photorezeptorzellen und Bipolarzellen sowie Photorezeptorzellen und Horizontalzellen finden sich in der äußeren plexiformen Schicht (OPL). Zellkörper von Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen sind in der inneren Körnerschicht (INL) lokalisiert. Die Dendriten der RGCs bilden Synapsen mit Bipolar- und Amakrinzellen in der inneren plexiformen Schicht (IPL). Im vitrealen Bereich der Retina befinden sich schließlich die Zellkörper der RGCs in der Ganglienzellschicht (GCL). Daneben finden sich in der GCL bis zu einem gewissen Anteil weitere ektopische Amakrinzellen (displaced amacrine cells). In der Hühnerretina beträgt der Anteil dieser ektopischen Amakrinzellen an der Gesamtzahl der Zellen in der GCL beispielsweise 30-35 % (Ehrlich, 1981). Die Axone der RGCs verlaufen in der optischen Faserschicht (OFL), verlassen die Retina und bilden den optischen Nerv. Die innere Grenzmembran (ILM) ist eine Basallamina und stellt die Begrenzung zwischen der Retina und dem Glaskörper dar (Halfter et al., 1987). Zwischen der ILM und den Photorezeptoren befinden sich radiär angeordnet die Müller-Gliazellen. Sie stellen in der nicht-vaskularisierten Hühnerretina den einzigen Gliazelltyp dar.

In-situ-Hybridisierungen zeigen eine Expression von Agrin in allen Hauptzelltypen der Retina. Dabei werden verschiedene aktive und inaktive Isoformen nicht selektiv von einzelnen Zelltypen exprimiert, sondern vielmehr von allen Hauptzelltypen der Retina (Kröger et al., 1996). Agrin-Protein ist bereits früh in der Entwicklung im Bereich der synapsenhaltigen plexiformen Schichten lokalisiert (Kröger, 1997). Dabei zeigt sich vor der

Synapsenbildung eine eher diffuse Verteilung des Agrin-Proteins. Während bzw. nach der Synapsenbildung in der IPL beobachtet man eine zunehmend punktierte Immunreaktivität, was für eine Konzentration von Agrin an Synapsen spricht (Kröger et al., 1996). Dies wird außerdem dadurch bestätigt, daß diese punktierte Agrin-Immunreaktivität mit dem synapsenassoziierten Protein Gephyrin (Prior et al., 1992) kolokalisiert ist (Mann und Kröger, 1996). Außerdem kann die Lokalisation von Agrin an Synapsen in der Retina auch ultrastrukturell durch Immunelektronenmikroskopie mit spezifischen anti-Agrin-Antikörpern bestätigt werden (Koulen et al., 1999). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der Hypothese, daß Agrin bei der Bildung oder strukturellen Stabilisierung von Synapsen im ZNS eine Rolle spielt. Immunhistochemische sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen der Synapsenbildung in organotypischen Kulturen des ZNS der Agrin-knockout-Maus zeigen jedoch weder biochemisch noch morphologisch signifikante Veränderungen (Schröder und Kröger, unveröffentlicht). Vergleichbare Ergebnisse werden auch in Hippocampus- (Serpinskaya et al., 1999) und Cortexkulturen (Li et al., 1999) von Agrin-defizienten Mäusen beobachtet. Dagegen führt die akute Inhibition der Agrin-Expression durch antisense-Oligonucleotide bzw. Inaktivierung von Agrin durch spezifische anti-Agrin-Antikörper in Hippocampuskulturen von Wildtypmäusen zu Störungen der Synapsenbildung sowie der synaptischen Übertragung (Böse et al., 2000). Eine Rolle von Agrin bei der Synaptogenese im ZNS ist also nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit diese sich widersprechenden Ergebnisse zu erklären ist, daß ein Fehlen von Agrin unter bestimmten Umständen wie in der Agrin-knockout-Maus durch andere Faktoren kompensiert werden kann. Es ist also davon auszugehen, daß Agrin möglicherweise nicht wie an der NMJ den alleinigen synaptogenen Faktor darstellt, sondern vielmehr einen von mehreren Faktoren, die die wesentlich komplexere Synapsenbildung im ZNS steuern.

Immunhistochemische Färbungen zeigen neben der bereits angesprochenen Lokalisation von Agrin im Bereich der synapsenhaltigen Schichten in der Retina auch Immunreaktivität in der ILM sowie auf den RGC-Axonen in der OFL bzw. im optischen Nerv (Halfter, 1993; Kröger et al., 1996; Halfter et al., 1997; Koulen et al., 1999). Diese axonale Lokalisation von Agrin ist vor allem früh in der Embryonalentwicklung während der Phase des axonalen Wachstums von RGC-Axonen zu ihrem Zielgebiet, dem kontralateralen optischen Tectum, zu beobachten. Agrin-Immunreaktivität ist auf den Wachstumskegeln sowie auf der Oberfläche der wachsenden Axone zu finden (Kröger et al., 1996). Eine vergleichbare Lokalisation von Agrin-Protein im Bereich von Axonen anderer weitprojizierender Neurone wird für eine

Reihe weiterer Neuronentypen des ZNS und PNS beschrieben (Halfter, 1993; Halfter et al., 1997) und legt eine generelle Funktion von Agrin während des axonalen Wachstums nahe.

Das axonale Wachstum von RGCs stellt einen komplexen Prozeß dar, der durch die verschiedensten zellulären und molekularen Mechanismen gesteuert wird. Da Agrin hier möglicherweise eine wichtige Rolle spielt, soll im Folgenden ein kurzer Überblick über die Mechanismen des axonalen Wachstums gegeben werden.

1.4 Axonales Wachstum von retinalen Ganglienzellen zum optischen Tectum im Hühnerembryo

Die Ausbildung der retino-tectalen Projektion, d.h. der geordneten topographischen Verbindung zwischen Ganglienzellen in der Retina und ihrem Zielgebiet, dem optischen Tectum des Hühnerembryos, stellt eines der am besten charakterisierten Modellsysteme der axonalen Wegfindung während der Embryonalentwicklung dar (Mey und Thanos, 2000). Bereits im Entwicklungsstadium E4, kurz nach der Differenzierung der ersten RGCs, verlassen deren Axone die Retina (Halfter et al., 1985). Diese bilden später den optischen Nerv und erreichen das Chiasma, d.h. den Kreuzungspunkt der Axone beider Retinae. Sie wachsen weiter entlang des optischen Trakts (E5) und erreichen schließlich das anteriore Tectum im Entwicklungsstadium E6 (Thanos und Bonhoeffer, 1983; Kröger und Schwarz, 1990). Die Axone wachsen dabei durch den Extrazellulärraum entlang der Fortsätze radiärer Gliazellen (Rager und v. Oeynhausen, 1979). Die retino-tectale Projektion im Huhn ist streng kontralateral, d.h. Axone von RGCs innervieren ausschließlich ihr Zielgebiet in der der entsprechenden Retina entgegengesetzten Tectumhälfte. Erste Synapsen zwischen RGC-Axonon und dem optischen Tectum bilden sich bereits im Entwicklungsstadium E8 (McGraw and McLaughlin, 1980). Dagegen lassen sich erste Synapsen in der IPL der Retina erst im Entwicklungsstadium E12 nachweisen (Hering und Kröger, 1996). Die Verschaltung von RGC-Axonon mit Neuronen des Tectums zeigt eine hohe topographische Ordnung, d.h. die Information über die räumliche Anordnung der RGCs in der Retina bleibt erhalten. Benachbarte RGCs in der Retina bilden Synapsen mit benachbarten Neuronen im optischen Tectum aus. Dabei projizieren Axone von RGCs der ventralen Retina auf den dorsalen Teil des Tectums, während Axone von RGCs der dorsalen Retina auf den ventralen Teil des Tectums projizieren (DeLong und Coulombre, 1965). Zwei zentrale weitgehend unbeantwortete Fragen bezüglich des axonalen Wachstums und der Ausbildung der retino-tectalen Projektion sind, auf welche Weise die Axone von RGCs zu ihrem Zielgebiet, dem

kontralateralen optischen Tectum, geleitet werden und auf welche Weise sich die topographische Ordnung der auf das Tectum projizierenden RGC-Axone ausbildet.

Die Wegfindung wachsender Axone wird durch eine spezielle Struktur am distalen Ende, dem Wachstumskegel, vermittelt. Auf seiner Oberfläche befinden sich Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle und andere Faktoren, die das axonale Wachstum beeinflussen (Goodman, 1996). Auf diese Weise können Informationen über die nähere Umgebung des Wachstumskegels gewonnen werden. Wachstumskegel zeigen im peripheren Bereich zwei morphologisch unterscheidbare Strukturen, die als Lamellipodien und Filopodien bezeichnet werden. Sie vermitteln die Adhesion des Wachstumskegels mit dem Substrat und spielen somit eine wichtige Rolle beim Wachstum des Axons (Argiro et al, 1984). Strukturell setzt sich der Wachstumskegel u.a. aus den beiden Zytoskelettbestandteilen Aktin und Tubulin zusammen. Mikrotubuli befinden sich dabei eher im zentralen Bereich des Wachstumskegels, wohingegen sich die Aktin-Filamente bis in die Lamellipodien und Filopodien im peripheren Bereich erstrecken. Die Polymerisation der Aktin-Filamente ist dabei für die Bewegung des Wachstumskegels, der eine Zugkraft auf das Axon ausübt, von entscheidender Bedeutung (Smith, 1988). Die Morphologie des Wachstumskegels ändert sich während verschiedener Stadien des axonalen Wachstums, wobei die Umgebung bzw. das Substrat von entscheidender Bedeutung sind (Thanos und Bonhoeffer, 1983; Bovolenta und Mason, 1987; Harris und Holt, 1990). Dabei wird der Wachstumskegel von lokal dargebotenen Substanzen, die entweder eine Adhäsion oder Repulsion bewirken, zum Zielgebiet geleitet.

Die Ausbildung der topografischen Ordnung der das Tectum innervierenden RGC-Axone ist u.a. von der differentiellen Expression bestimmter Rezeptor/Liganden-Systeme auf RGC-Axonon bzw. im Tectum abhängig. Dabei hat die Bindung von Liganden, die in entsprechenden Bereichen des Tectums lokalisiert sind, an ihre Rezeptoren auf der Oberfläche der Wachstumskegel eine Abstoßung der Axone zur Folge. Auf diese Weise wird verhindert, daß RGC-Axone falsche Bereiche im Tectum innervieren. Entsprechende Mechanismen sind z.B. für die auf RGC-Axonon exprimierten Ephrin-Rezeptoren und ihre Liganden im optischen Tectum eingehend untersucht worden (Drescher, 1997).

Die Expression von Agrin auf Axonen von RGCs und anderen weitprojizierenden Neuronen während der Phase des axonalen Wachstums legt eine Funktion von Agrin während dieser Phase der Embryonalentwicklung nahe. Eine solche Funktion von Agrin sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden.

2. Zielsetzung

Das Heparansulfatproteoglykan Agrin ist der Hauptregulator der Synaptogenese an der neuromuskulären Endplatte (NMJ) im peripheren Nervensystem (PNS). Die frühe Expression von Agrin bereits vor der Synaptogenese und die Lokalisation des Proteins auf Axonen verschiedener weitprojizierender Neurone sprechen dafür, daß Agrin neben dieser eingehend untersuchten Funktion an der NMJ auch eine Rolle im Zentralnervensystem (ZNS) während des axonalen Wachstums spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Funktion von Agrin in einer speziellen Subpopulation von Zellen des ZNS, nämlich Ganglienzellen der embryonalen Hühnerretina (RGCs), genauer zu untersuchen. Dabei sollten im einzelnen folgende Fragen geklärt werden:

- Welche Agrin-Isoformen werden in der Retina und speziell in RGCs exprimiert?
- Exprimieren einzelne RGCs gleichzeitig verschiedene Agrin-Isoformen?
- Besitzt das RGC-assoziierte Agrin wie das von Motoneuronen an der NMJ sezernierte Agrin eine ähnliche Funktionalität?
- Welche Funktion besitzt Agrin in RGCs und anderen weitprojizierenden Neuronen insbesondere während des axonalen Wachstums?
- Welche Signaltransduktionsprozesse liegen der Wirkung von Agrin im ZNS zugrunde?

3. Material

3.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Grundchemikalien wurden von Merck, Riedel de Häen oder Sigma, Verbrauchsmaterialien für zell- und molekularbiologische Arbeiten von Biozym, Falcon, Greiner oder Perkin Elmer bezogen.

3.2. Substanzen für die Histologie

Aqua Polymount	Polysciences Inc.
Deckgläser	Marienfeld
Fast Blue	Sigma
Objektträger	Marienfeld
Paraformaldehyd	Merck

3.3 Substanzen für die Molekularbiologie

Agarose	Bio-Rad
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
DNA-Längenstandard, pUC18 Hae III	Sigma
DNase I, RNase-frei	Life Technologies
Deoxyribonucleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	Boehringer Mannheim
1,4-Dithio-DL-threit (DTT)	Life Technologies
Ethidiumbromid	Sigma
Hefeextrakt	Life Technologies
LB-Agar	Life Technologies
Oligo-dT ₁₀ -Oligonucleotide (Primer)	Boehringer Mannheim
Pepton	Life Technologies
Random-Oligonucleotide (Primer)	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs
RNase Inhibitor	Boehringer Mannheim
Superfect Transfektionsreagenz	Qiagen
Superscript II Reverse Transkriptase	Life Technologies
synthetische Oligonucleotide (Primer) für PCR	MWG Biotech AG
TaqBead Hot Start Polymerase, MgCl ₂ und Puffer	Promega
Ultraspec-Reagenz	Biotech

3.4 Substanzen für die Proteinchemie

Farbstoff-Konzentrat zur Proteinkonzentrationsbestimmung	Bio-Rad
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Boehringer Mannheim
Protein Assay Standard	Bio-Rad
Proteinkonzentratoren (Centricon)	Amicon

3.5 Zellkulturmedien, Medienzusätze und Substanzen für die Zellkultur

Ampicillin	Sigma
1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-tetrakis-(acetoxymethyl)-ester (BAPTA-AM)	Sigma
Cytochalasin D	Sigma
Cytosin-1- β -D-arabinofuranosid (AraC)	Sigma
4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies
Earle's Balanced Salts (EBSS)	Life Technologies
Gelatine	Merck
Hank's Balanced Salts	Sigma
Heparin	Sigma
Hühnerembryonenextrakt (CEE)	Eigenherstellung
Laminin	Sigma
L-Cystein	Sigma
L-Glutamin	Life Technologies
Minimal Eagle Medium (MEM)	Life Technologies
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumpyruvat	Life Technologies
N-Deacetyl-N-methyl-colchicin (Demecolcin)	Molecular Probes
Nitex Gewebe	Büttner GmbH
Nitrozellulosemembran	Sartorius
Ovomucoid (Trypsin-Inhibitor)	Boehringer Mannheim
Papain	Worthington Biochemicals Corporation

PBS	Life Technologies
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies
Pferdeserum (HS)	Life Technologies
Phalloidin	Molecular Probes
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma
Poly-D-Lysin	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Puck's Puffer	Life Technologies
Staurosporin	Sigma
Tetramethylrhodamin- α -bungarotoxin (α -BTX)	Molecular Probes
Triton X-100	Sigma
Trypsin	Sigma
Trypsin/EDTA	Life Technologies

3.6 Kits

GlassMax DNA Isolation Spin Cartridge System	Life Technologies
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen
RNeasy Minikit	Qiagen
Sephaglas BandPrep Kit	Pharmacia
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen

3.7 Bakterienstamm (*E.coli*)

TOP10 (Genotyp: F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG)	Invitrogen
---	------------

3.8 Plasmid

PCR 2.1-TOPO	Invitrogen
--------------	------------

3.9 Antikörper zur Induktion von Mikrodornen

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Charakterisierung
Agrin 45	Kaninchen	1:100	Eigenproduktion	Kröger et al., 1996
Agrin 46	Kaninchen	1:100-1:100.000	Eigenproduktion	Tsen et al, 1995a; Kröger et al., 1996
Agrin 707	Kaninchen	1:100	M. Ruegg, Basel	Denzer et al, 1995
Agrin Stan	Kaninchen	1:100	U. J. McMahan, Stanford	Tsen et al, 1995a
Agrin NtA	Kaninchen	1:100	Eigenproduktion	Neumann et al., 2001
Agrin B8	Schaf	1:100	Abimed	Kröger, 1997
Agrin B19	Schaf	1:100	Abimed	Kröger, 1997
Agrin 5B1	Maus	1:100	U. J. McMahan, Stanford	Reist et al., 1987
Agrin C3	Maus	1:100	K. W. Tsim, Hong Kong	Godfrey et al., 1988b
α -Dystroglykan	Schaf	1:100	Eigenproduktion	Herrmann et al., 2000
β 1-Integrin; Klon JG22	Maus	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank	Hering et al., 2000
Thy-1	Maus	1:100	A. Rodriguez- Tebar, Madrid	French und Jeffrey, 1986

3.10 Primäre Antikörper für Immunfärbungen

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Charakterisierung
Agrin 46	Kaninchen	1:1000	Eigenproduktion	Tsen et al., 1995a; Kröger et al., 1996
GAP-43; Klon 7B10	Maus	1:100-1:500	Sigma	Meiri et al., 1991
Islet-1; Klon 39.4D5	Maus	1:1000-1:2000	Developmental Studies Hybridoma Bank	Ericson et al., 1992
Neurofilament 68; Klon NR4	Maus	1:200	Sigma	Debus et al., 1983 ; Franke et al., 1991
Synaptotagmin ; Klon 1D12	Maus	1:5000	M. Takahashi, Tokio	Takahashi et al., 1991
Thy-1	Maus	1:2000	A. Rodriguez- Tebar, Madrid	French und Jeffrey, 1986
β -Tubulin ; Klon TUB 2.1	Maus	1:200	Sigma	Gozes und Barnstable, 1982; Matthes und Dighiero, 1988

3.11 Sekundärantikörper

Bei Immunfärbungen wurden die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 594 von Molecular Probes in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Bei der Aufreinigung von RGCs durch Immunopanning wurde ein Ziege anti-Maus IgG (Dianova) in einer Konzentration von 24 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

3.12 Synthetische Oligonucleotide (Primer)

Bezeichnung	Sequenz	Orientierung
Bsense	5'-GGT TGG AGA GCT ACG AGT GTG-3'	sense
B0	5'-GAT TGC AAA GCC TTC TCG CTC T-3'	antisense
B8	5'-GAT TGC AAA GCC TTC TCG GCA-3'	antisense
B11	5'-TAG TCC AAT GCG TCG GGA CTC-3'	antisense
B19	5'-TAG TCC AAT GCG TCG GGA GCA G-3'	antisense
P5i	5'-TTT GAT GGT AGG ACG TAC ATG-3'	sense
P6i	5'-CTT CTG TTT TGA TGC TCA GC-3'	antisense
NtAF12	5'-CTG GGT TTG GCG CTG GGA TTG G-3'	sense
NtAB1	5'-GGG TCG GCG GGG TCT GGG TAA A-3'	antisense
NtAB2	5'-CAT GTA CTG AGG GGC TGG GTT GAC-3'	antisense
TMF1	5'-TCT CCT TGG TGG TGC GCT ACT TCA-3'	sense
TMF2	5'-CTG GGA TTT GCT GTG CTG CTC TTC-3'	sense
TMB1	5'-AGG GGT CGC AGG CTC CAT CAA ACT-3'	antisense
TMB2	5'-CTC GCT GCG GTA GTC CTT-3'	antisense

4. Methoden

4.1 Tiere

Die für die beschriebenen Versuche benötigten Hühnereier der Rasse White Leghorn (*Gallus gallus domesticus*) wurden von einer lokalen Hühnerfarm bezogen. Befruchtete Eier wurden bei 12°C gelagert und bei Bedarf in einem Feuchtinkubator bei 38°C bebrütet. Die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Hühnerembryonen wurden als Anzahl der Tage in der Embryonalentwicklung (E) definiert.

4.2. Zellbiologische Methoden

4.2.1. Aufreinigung von retinalen Ganglienzellen durch Immunopanning

Die Aufreinigung von RGCs unterschiedlicher Entwicklungsstadien vor, während und nach der Synaptogenese (E6, E10, E14 und E19) erfolgte modifiziert nach Barres et al. (1988) (s. Abb. 2). Zunächst wurde eine Petrischale (100 x 15 mm) mit einem Ziege anti-Maus IgG-Antikörper (24 µg/ml) in 10 ml Tris-HCl (50 mM, pH 9,5) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Petrischale mit PBS wurde ein anti-Huhn Thy-1-Antikörper (Verdünnung 1:1000) in 0,2 %iger BSA-Lösung in D-PBS (1 mg/ml D-Glukose und 36 µg/ml Natriumpyruvat in PBS) zugegeben und 3 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Sechs Retinae des jeweiligen Entwicklungsstadiums wurden präpariert. Zur Dissoziation wurden 80 Einheiten Papain in 10 ml D-PBS gelöst und mit 1000 Einheiten DNase I versetzt. Die pH-Einstellung und Aktivierung der Dissoziationslösung erfolgte durch Zugabe von 10 µl 1 M NaOH und 2 mg L-Cystein. Nach Inkubation des Retinagewebes mit der Dissoziationslösung für 30 Min. bei 37°C wurde das Gewebe kurz zentrifugiert (120 x g, 4°C, 5 Min.), in 4 ml Ovomuroid-Lösung (0,15 % Ovomuroid und 1,5 mg/ml BSA in D-PBS) aufgenommen und erneut zentrifugiert (120 x g, 4°C, 5 Min.). Anschließend erfolgte die Trituierung des Gewebes mit Hilfe einer Glaspipette in insgesamt 6 ml Ovomuroid-Lösung. Die dissoziierten Zellen wurden zentrifugiert (120 x g, 4°C, 15 Min.) und in Ovomuroid-Lösung (1 % Ovomuroid und 10 mg/ml BSA in D-PBS) aufgenommen. Es wurde erneut zentrifugiert (120 x g, 4°C, 15 Min.), die Zellen in 0,02 % BSA in D-PBS aufgenommen und durch steriles Nitex-Gewebe filtriert. Die zur Bindung der RGCs mit dem anti-Thy-Antikörper beschichtete Petrischale wurde 4 mal mit PBS gewaschen, die Retina-Zellsuspension auf die Platte gegeben und 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde anschließend

mindestens 10 mal mit je 10 ml D-PBS und einmal mit 10 ml kalzium- und magnesiumfreiem EBSS gewaschen, um die nicht anhaftenden Zellen zu entfernen. Diese wurden zentrifugiert (120 x g, 4°C, 15 Min.) und als Kontrolle für die RNA-Isolierung und anschließende cDNA-Synthese verwendet. Anschließend erfolgte eine Trypsinierung der an den anti-Thy-1-Antikörper gebundenen Zellen in 0,125 % Trypsin in 4 ml kalzium- und magnesiumfreiem EBSS (10 Min., 37°C). Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 1 ml FCS beendet und die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren mit insgesamt 12 ml 30 % FCS von der Petrischale abgelöst. Nach abschließender Zentrifugation der Zellen (120 x g, 4°C, 15 Min.) konnte das Sediment für die RNA-Isolierung verwendet werden.

Die Bestimmung des Anreicherungsgrades der RGCs erfolgte durch kurze Kultivierung von ca. 400.000 aufgereinigten Zellen (E6) in Neurobasal-Kulturmedium (Neurobasal; 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Natriumpyruvat; 0,1 mg/ml Penicillin/Streptomycin) für 2 Std. und anschließende Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen Islet-1, einem RGC-spezifischen Protein (Austin et al., 1995; Dorsky et al., 1997; Halfter, 1998), sowie unter gleichzeitiger Färbung aller Zellkerne mit DAPI (Russel et al., 1975). Der Anteil der RGCs (Islet-1-positiv) an der Gesamtzahl der Zellen (DAPI-positiv) wurde in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Dies geschah exemplarisch für aufgereinigte RGCs des Entwicklungsstadiums E6, da nur zu diesem Stadium Islet-1 ausschließlich von RGCs exprimiert wurde. Dieses Experiment ergab einen Anteil von 97 % ± 0,6 (Mittelwert ± S.E.M.) an aufgereinigten RGCs an der Gesamtzahl der Zellen nach der Immunopanning-Aufreinigung.

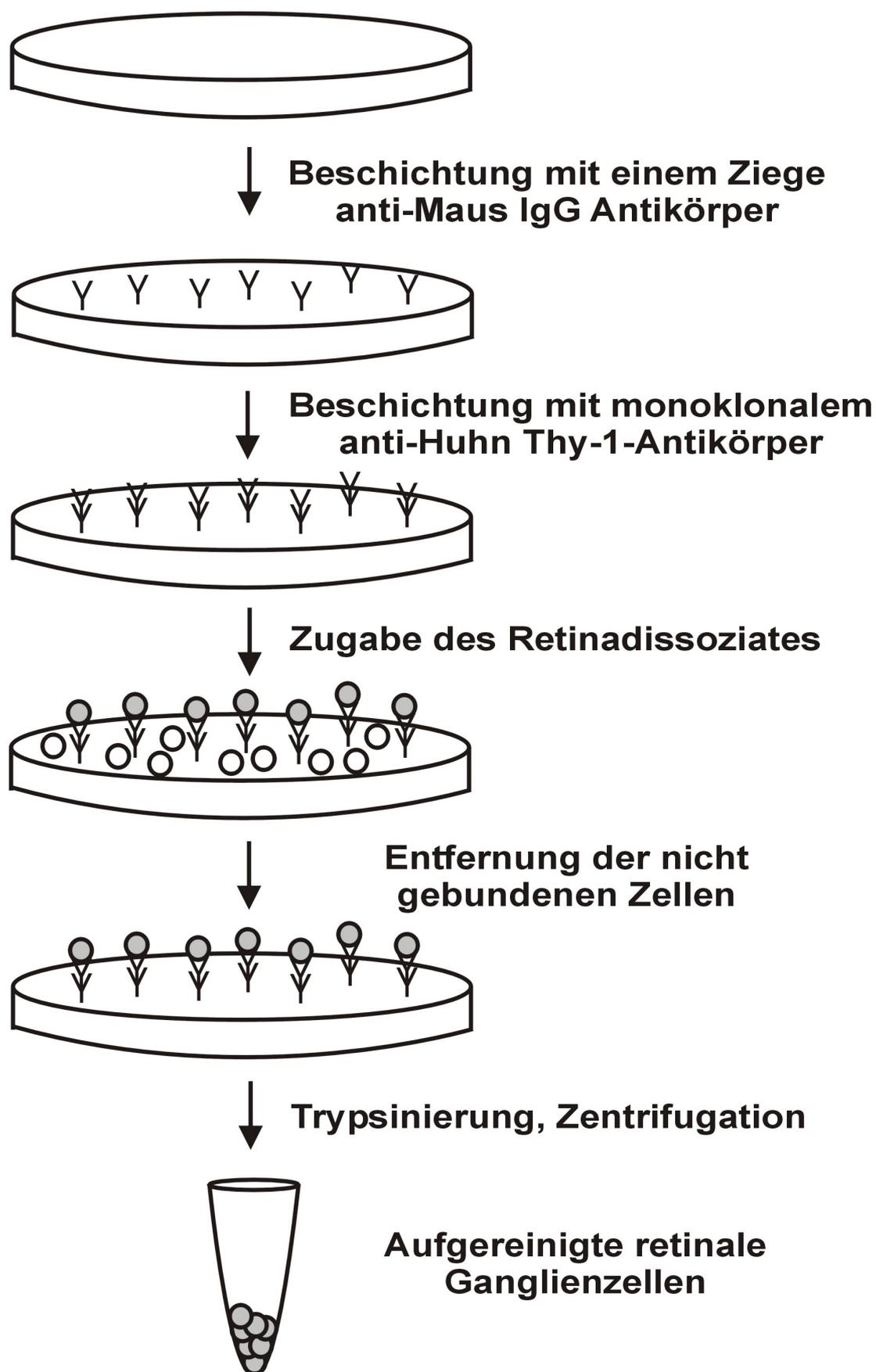


Abb. 2 Aufreinigung von RGCs mit Hilfe der Immunopanning-Technik. Der Reinheitsgrad der aufgereinigten RGCs betrug 97 %.

4.2.2 Kultur von Rückenmarksneuronen

Rückenmark von 4 E6-Hühnerembryonen wurde präpariert und von dem umliegenden Gewebe befreit. Nach Zugabe von 1 ml serumfreiem DMEM-Kulturmedium (DMEM; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Natriumpyruvat; 0,1 mg/ml Penicillin/Streptomycin) wurde das Gewebe zentrifugiert (120 x g, 4°C, 2 Min.) und der Überstand abgesaugt. Das Gewebe wurde dann 5 Min. mit 0,5 ml 0,125% Trypsin bei Raumtemperatur versetzt und anschließend mehrmals mit einer Glaspipette trituiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von serumhaltigem DMEM-Kulturmedium beendet und die vereinzelt Rückenmarksneurone zentrifugiert (120 x g, 4 °C, 5 Min.). Die Zellen wurden zweimal mit DMEM-Kulturmedium gewaschen und ca. 400.000 Zellen in einer Zellkulturschale (35 x 10 mm) in 1,5 ml DMEM-Kulturmedium ausgesät.

4.2.3 Kultur und Transfektion von HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen (human embryonic kidney cells) stellen eine durch Infektion mit Adenoviren immortalisierte Zelllinie dar, die ursprünglich von menschlichen Nierenzellen abstammt und sich ausgezeichnet für Expressionsstudien eignet (Graham et al., 1977). Die Kultivierung der HEK-293-Zellen erfolgte in Zellkulturschalen (100 x 15 mm) in 10 ml DMEM-Kulturmedium bei 37°C. Nach ca. 3 bis 4 Tagen wurden die Zellen geteilt. Dazu wurden diese zunächst 2 mal mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend 10 Min. lang bei Raumtemperatur in 0,5 ml Trypsin/EDTA (0,05 % w/v) inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 5 ml serumhaltigem DMEM-Kulturmedium beendet, 1/3 der Zellsuspension auf eine neue Zellkulturschale gegeben und mit DMEM-Kulturmedium auf ein Volumen von 10 ml gebracht.

Die Transfektion von HEK-293-Zellen erfolgte mit Hilfe des Superfect Transfektionsreagenz (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers. Nach der Transfektion wurden die Zellen mindestens 24 Std. weiter kultiviert und standen anschließend für die Versuche zur Verfügung.

4.2.4 Videomikroskopie

Explantatkulturen von RGCs wurden über Nacht auf Basalmembranen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe des anti-Agrin-Antiserums AS 46 für 3 Std. in einer Verdünnung von 1:1000 in DMEM-Kulturmedium. Mit Hilfe eines inversen Axiovert Mikroskops (Zeiss) wurden dabei vor und nach der Zugabe des Antiserums im Abstand von 30 Sek. Phasenkontrastaufnahmen von wachsenden Axonen mit einem 63 fach vergrößernden Objektiv aufgenommen und digitalisiert (Löschinger et al., 1997). Die Kulturen wurden während der gesamten Aufnahme bei 37°C temperiert und mit 4 % CO₂ begast. Die Bearbeitung der digitalen Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Scion Image- sowie der PolyView-Software (Scion Corporation; Polybytes).

4.3 Quantitative Auswertungen

Die Ergebnisse aller statistischen Auswertungen wurden als Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt. Die Anzahl der unabhängigen Experimente war jeweils 3.

4.3.1 Quantitative Auswertung von Änderungen der Wachstumskegelmorphologie

Kulturen von RGC-Axonen wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ auf Basalmembranen kultiviert und anschließend für 3 Std. bei 37°C mit dem anti-Agrin-Antiserum AS 46 bzw. dem entsprechenden Präimmenserum in 1:1000-Verdünnung in DMEM-Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) in einer Endkonzentration von 2 μ M in das Kulturmedium und eine weitere Inkubation für 1 Std. Die Kulturen wurden schließlich fixiert, mit Alexa Fluor 488 Phalloidin in Waschpuffer (2 % BSA und 0,2 % Triton X-100 in PBS) gefärbt und in Aqua Polymount eingedeckelt.

Um den Einfluß des anti-Agrin-Antiserums und PMA auf die Morphologie des Wachstumskegels zu untersuchen, wurden pro Kulturschale jeweils 20 Wachstumskegel unter Fluoreszenzoptik untersucht und jeweils einer von drei morphologischen Kategorien (Filopodien und Lamellipodien, nur Filopodien, weder Filopodien noch Lamellipodien) zugeordnet. Der statistischen Auswertung lagen jeweils drei Kulturschalen aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten zugrunde.

4.3.2 Quantitative Auswertung der Anzahl induzierter Acetylcholinrezeptor-Aggregate auf kultivierten Muskelfasern

Muskelkulturen wurden nach Wallace (1989) mit der Modifikation von Gesemann et al. (1995) hergestellt. Diese Kulturen wurden nach 5 Tagen entweder über Nacht mit aktivem Agrin (50 μ l Überstand von mit Agrin CBA-1 A4B19 transfizierten HEK-293-Zellen) in 2 ml DMEM-Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert oder mit Retinaexplantaten, dissoziierten Rückenmarksneuronen oder transfizierten HEK-293-Zellen kokultiviert. Nach 5 minütiger Fixierung in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur und anschließendem Waschen erfolgte eine Inkubation mit Rhodamin-gekoppeltem α -Bungarotoxin (α -BTX), das selektiv an AChR bindet, in einer Konzentration von 1 μ g/ml in 1 ml Waschpuffer für 1 Std. bei Raumtemperatur. Axone von kokultivierten Neuronen wurden gegebenenfalls parallel mit einem monoklonalen anti-Neurofilament 68 (NF 68)-Antikörper, transfizierte HEK-293-Zellen mit anti-Agrin-Antiserum AS 46 gefärbt. Nach dem Eindeckeln in Aqua Polymount konnte die Anzahl der durch Agrin oder kokultivierte Neurone bzw. transfizierte HEK-293-Zellen induzierten AChR-Aggregate pro 600 μ m-Segment der Muskelfaser unter Fluoreszenzoptik ausgezählt werden. Dabei wurden jeweils pro Kulturschale zehn Segmente ausgezählt. Der statistischen Auswertung lagen jeweils drei Kulturschalen aus drei unabhängigen Experimenten zugrunde. Bei Kokulturen wurden nur die AChR-Aggregate ausgewählt, die in direkter Nachbarschaft zu den jeweiligen Axonen lagen.

4.3.3 Quantitative Auswertung der Bildung von Mikrodornen

E6 Retinaexplantatkulturen wurden nach Halfter et al. (1983), E5 Tectumexplantate nach Kröger und Schwarz (1990) angefertigt. Sympathische Ganglien und Hinterwurzelganglien wurden wie in Kröger und Niehörster (1990) beschrieben präpariert. Die Primärkulturen mit Axonen dieser verschiedenen Neuronentypen wurden 24 bis 48 Std. bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM-Kulturmedium auf Basalmembranen von E11 Hühnerretinae (Halfter et al., 1997) kultiviert und anschließend mit dem entsprechenden Antikörper bzw. Präimmenserum in DMEM-Kulturmedium inkubiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden Axone mit dem anti-Agrin-Antiserum AS 46 in 1:1000-Verdünnung für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Lediglich bei der Untersuchung der Spezifität der Mikrodornenbildung (s. Abschnitt 5.4.3) und der Bildung von Mikrodornen auf Axonen anderer Neuronentypen (s. Abschnitt 5.4.7) wurde eine 1:100-Verdünnung der Antikörper eingesetzt. Die Kulturen wurden fixiert und nach dem Waschen eine Stunde bei Raumtemperatur mit 66 nM fluoreszenzmarkiertem Phalloidin in Waschpuffer gefärbt. Nach dem Eindeckeln in Aqua Polymount wurde die Anzahl der

induzierten Mikrodornen pro 110 μm -Segment unter Fluoreszenzoptik ausgezählt. Die Auswertung erfolgte „blind“, d.h. dem Auswertenden war nicht bekannt, um welche der jeweiligen Kulturen es sich handelte. Pro Kulturschale wurden jeweils 10 Axonsegmente ausgezählt. Um den Einfluß bestimmter pharmakologischer Substanzen auf die Bildung von Mikrodornen zu untersuchen, wurden die Kulturen entweder vor der Antikörperzugabe mit der entsprechenden Substanz in geeigneter Konzentration präinkubiert oder die Substanzen wurden zusammen mit dem Antikörper appliziert. Näheres ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Substanz	Endkonzentration	Inkubation
BAPTA-AM	bis 200 μM	1 Std. Präinkubation
Kobalt(II)-chlorid	2 mM	zusammen mit AS 46
Cytochalasin D	20 μM	zusammen mit AS 46
Demecolcin	13 μM	zusammen mit AS 46
Heparin	0,5 mg/ml	zusammen mit AS 46
Natriumpervanadat	30 μM	1 Std. Präinkubation
Staurosporin	bis 50 nM	10 Min. Präinkubation

Natriumpervanadat wurde unmittelbar vor dem Experiment aus Natriumorthovanadat und Wasserstoffperoxid synthetisiert (Wallace, 1995). Die kompetitive Hemmung des anti-Agrin-Antiserums AS 46 erfolgte durch eine Inkubation mit Agrin (CBA-1 4/8) aus dem Zellüberstand transfizierter HEK-293-Zellen für 3 Std. bei Raumtemperatur.

Die Längenbestimmung der jeweiligen Mikrodornen erfolgte mit digitalen Aufnahmen der Phalloidin-Fluoreszenzfärbungen mit Hilfe der Metaview-Software. Allen statistischen Auswertungen lagen jeweils die Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Experimenten zugrunde.

4.4 Neuroanatomische Methoden

4.4.1 Histologie

Hühnerembryonen wurden nach der gewünschten Inkubationszeit den Eiern entnommen und dekapitiert. Die Augen wurden nach Entfernung des umliegenden Binde- und Knorpelgewebes und nach Durchtrennung des optischen Nerven aus dem Kopf herausgelöst. Zur Fixierung der Retinae wurden die präparierten Augen entlang der *ora serrata* geöffnet und die Linse sowie der Glaskörper entfernt, um das Eindringen des Fixativs in das Gewebe zu erleichtern. Die Retina verblieb zur Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer und 11 % Saccharose im Augenbecher. Die Fixierungszeit richtete sich dabei nach der Fixierungsempfindlichkeit der Antikörper. Nach der Fixierung erfolgte eine Inkubation der Retinae für jeweils 1 Std. in 10 % und 20 % Saccharose in Phosphatpuffer und anschließend über Nacht in 30 % Saccharose in Phosphatpuffer bei 4°C. Die Anfertigung von Vertikalschnitten mit einer Dicke von 10 bis 12 µm erfolgte nach Auffrieren des gesamten Augenbeckers in Einbettmedium mit Hilfe eines Gefriermikrotoms auf mit 0,05 % Chromalaun und 0,5 % Gelatine beschichteten Objektträgern. Die Gefrierschnitte konnten bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

4.4.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung von Retinagefrierschnitten, kultivierten Zellen und Muskelfasern sowie Axonen von Explantatkulturen und dissoziierten Zellen wurde mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern durchgeführt. Die Fixierung der kultivierten Zellen und Muskelfasern erfolgte dabei in 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer und 11 % Saccharose für 10 Min. bei Raumtemperatur. Axone von Explantatkulturen und dissoziierten Zellen wurden zur optimalen Erhaltung der Wachstumskegelmorphologie durch direkte Zugabe von Formalin in das Kulturmedium für 10 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Die Formalin-Endkonzentration betrug 4 %. Nach Fixierung der jeweiligen Zellen bzw. des Gewebes und zweimaligem Waschen in Waschpuffer für 10 Min. bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Inkubation in Waschpuffer für 30 Min., um unspezifisch bindende Gruppen abzusättigen. Anschließend wurde eine Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper in geeigneter Verdünnung (s. Abschnitt 3.10) in Waschpuffer entweder über Nacht bei 4°C oder mindestens 3 Std. bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Schnitte bzw. Kulturen wurden erneut 3 mal 10 Min. lang mit Waschpuffer versetzt und dann 1 Std. lang bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden

fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen für 10 Min. mit Waschpuffer wurden die Schnitte bzw. Kulturen in Aqua Polymount eingedeckelt. Die Analyse und Dokumentation der immunhistochemischen Färbungen erfolgte mit einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit 40, 63 und 100 fach vergrößernden Objektiven mit digitaler Kamera (Spot, Diagnostic Instruments). Kontrast und Farbtiefe wurden elektronisch mit Adobe Photoshop (Version 5.5) nachbearbeitet.

4.4.3 Retrograde Markierung von retinalen Ganglienzellen

Zur Unterscheidung der RGCs in der Ganglienzellschicht von Hühnerembryonen von ektopischen Amakrinzellen (displaced amacrine cells) wurde eine retrograde Markierung der RGCs mit Hilfe des Vitalfarbstoffes Fast Blue durchgeführt. Dieser Farbstoff wird nach Injektion in das Zielgebiet von RGCs, das kontralaterale optische Tectum, retrograd zu den Zellkörpern der RGCs transportiert, welche unter Fluoreszenzoptik nach etwa 2 Tagen selektiv sichtbar gemacht werden können (Wizenmann und Thanos, 1990). Etwa 1 µl einer ca. 1 %igen Fast Blue-Lösung in sterilem Wasser wurde mit Hilfe einer Glaskapillare *in ovo* in das optische Tectum von E8-Hühnerembryonen injiziert. Das Ei wurde anschließend vorsichtig verschlossen und 2 Tage bei 38°C im Feuchtinkubator weiter bebrütet. Die Retina des E10-Hühnerembryos konnte dann präpariert und die RGCs in der ausgebreiteten Retina unter Fluoreszenzoptik bei 360 nm identifiziert und von Amakrinzellen unterschieden werden.

4.5 Proteinchemische Methoden

4.5.1 Isolierung von membranassoziierten Proteinen

Die Isolierung von membranassoziierten Proteinen erfolgte weitgehend nach Serafini et al. (1994). Zwei Gramm Gewebe aus E6-Hühnerköpfen wurde in 15 ml Homogenisationspuffer (320 mM Saccharose; 10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM PMSF) auf Eis homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert (1000 x g, 4°C, 10 Min.) und der Überstand mit löslichen und membranassoziierten Proteinen erneut sedimentiert (100.000 x g, 4°C, 1 Std.). Das Membransediment wurde in 1 ml 1 M NaCl aufgenommen, homogenisiert und vorsichtig bei 4°C für 1 Std. gemischt. Nach erneuter Zentrifugation (100.000 x g, 4°C, 1 Std.) wurde der Überstand gesammelt und in Centricon 30 Proteinkonzentratoren nach Vorschrift des Herstellers ungefähr 3 fach konzentriert. Zur Induktion von Mikrodornen auf

wachsenden RGCs wurden die Kulturen mit diesem Extrakt in einer Proteinkonzentration von ca. 66 µg/ml in DMEM-Kulturmedium über Nacht inkubiert.

4.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad) nach Vorschrift des Herstellers mit Hilfe eines Photometers (Spectrophotometer LC-55, Perkin Elmer) bei 595 nm. Als Proteinstandards wurden BSA-Lösungen definierter Konzentration verwendet, wobei vor Messung der eigentlichen Probelösung eine BSA-Eichgerade angefertigt wurde mit deren Hilfe die Konzentration der Probelösung bestimmt wurde.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion entsprechend verdünnter DNA- und RNA-Lösungen bei 260 nm Wellenlänge mit Hilfe eines Photometers (Spectrophotometer Lambda 11, Perkin Elmer). Dabei entsprach eine Extinktion A_{260} von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml doppelsträngiger DNA oder RNA.

4.6.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Isolierung von RNA aus aufgereinigten RGCs bzw. retinalem Zelldissoziat erfolgte mit Hilfe des GlassMAX RNA Microisolation Spin Cartridge Systems (Gibco) nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurden jeweils 10^4 bis 10^6 Zellen eingesetzt. RNA aus Gesamtretna verschiedener Entwicklungsstadien wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des Ultraspec-Reagenz (Biotechx) nach Angaben des Herstellers.

Zum Umschreiben von RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurden 5 µg RNA aus Gesamtretna des entsprechenden Entwicklungsstadiums bzw. 1 µg RNA aus aufgereinigten RGCs bzw. Retinazelldissoziat eingesetzt. Zunächst erfolgte zur Entfernung von Resten genomischer DNA ein DNase-Verdau mit 5 Einheiten DNase I für 15 Min. bei Raumtemperatur. Die Inaktivierung der DNase erfolgte anschließend durch Zugabe von 2 mM EDTA bei der cDNA-Synthese aus aufgereinigten RGCs bzw. Retinazelldissoziat oder durch Aufreinigung mit dem RNeasy Minikit (Qiagen) bei der cDNA-Synthese aus

Gesamtretina. Die cDNA-Synthese wurde mit je 0,5 μ M Oligo-dT₁₀- bzw. Random-Primern, 0,5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 100 Einheiten RNase Inhibitor und 1000 Einheiten Superscript II Reverse Transkriptase durchgeführt. Die synthetisierte einzelsträngige cDNA wurde direkt in der entsprechenden PCR eingesetzt.

4.6.3 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) stellt eine effektive Methode dar, auf relativ einfache Weise beliebige DNA-Sequenzen exponentiell zu vervielfältigen. Dabei wird der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt durch die Auswahl geeigneter synthetischer Oligonucleotide (Primer) festgelegt, die die entsprechende DNA-Sequenz flankieren und mit dieser hybridisieren. Die Vervielfältigung des DNA-Abschnitts erfolgt durch zyklisches Denaturieren des DNA-Doppelstranges, Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize und schließlich die Verlängerung der Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase). Die Auswahl geeigneter Primer für die RT-PCR sowie die Analyse und der Vergleich von klonierten mit publizierten DNA-Sequenzen erfolgte mit entsprechenden Programmen des DNASTAR-Softwarepakets (Version 4.03) sowie des HUSAR/GCG-Sequenzanalyse-Softwarepakets des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg. Die Lage der isoformspezifischen Primer sind in Abb. 3 dargestellt. Die Sequenzen aller Primer (s. Abschnitt 3.12.) basieren auf den publizierten Sequenzen von Hühneragrin (Accession No.: M94271).

Zur Expressionsanalyse der verschiedenen Agrin-B-Isoformen wurde zunächst eine PCR mit den Primerpaaren Bsense und P6i (Hybridisierungstemperatur 62°C), gefolgt von 4 getrennten „nested PCR“ mit dem Primer P5i und den 4 isoformspezifischen Primern B0, B8, B11 und B19 (Hybridisierungstemperatur 62°C), durchgeführt (s. Abb. 3). Die Analyse der Expression von NtA-Agrin erfolgte mit den Primerpaaren NtAF12 und NtAB1 (Hybridisierungstemperatur 63°C) in der ersten und NtAF12 und NtAB2 (Hybridisierungstemperatur 61°C) in der „nested PCR“. Die Expression der TM-Form von Agrin wurde schließlich mit den Primerpaaren TMF1 und TMB1 (Hybridisierungstemperatur 62°C) in der ersten und TMF2 und TMB2 (Hybridisierungstemperatur 59°C) in der „nested PCR“ analysiert. Die PCR wurden standardmäßig mit TaqBead Hot Start Polymerase (Promega) in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt. Dabei wurden 1 bis 10 μ l cDNA, 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0,4 pmol/ μ l Primer sowie 10fach PCR-Puffer und 1,25 Einheiten TaqBead Hot Start Polymerase eingesetzt. Der Ansatz der ersten PCR wurde jeweils 1:100 bis 1:1000 fach verdünnt und in der zweiten „nested PCR“ eingesetzt. Alle PCR-Ansätze wurden

zunächst primär 3 Min. bei 94°C denaturiert. Daraufhin erfolgte ein weiterer Denaturierungsschritt für 30 Sek. bei 94°C, gefolgt von der Hybridisierung der Primer für 30 Sek. bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur. Die Verlängerung der DNA-Enden erfolgte für 45 Sek. bei 72°C. Die letzten 3 Reaktionsschritte wurden 30 mal bzw. bei der ersten panspezifischen Einzelzell-PCR 40 mal zyklisch wiederholt. Abschließend erfolgte ein letzter Verlängerungsschritt für 45 Sek. bei 72°C.

B0

```
ACCACAATGCCGTGACAAAGAG CGAGAAGGCTTTGCAATCCAACCACTTT
TGGTGTTACGGCACTGTTTCTC GCTCTTCCGAAACGTTAGGTTGGTGAAA
```



B8

```
ACCACAATGCCGTGACAAAGAG CCACCTGAGCAATGAGATCCCTGC CGAGAAGGCTTTGCAATCCAACCACTTT
TGGTGTTACGGCACTGTTTCTC GGTGGACTCGTTACTCTAGGGACG GCTCTTCCGAAACGTTAGGTTGGTGAAA
```



B11

```
ACCACAATGCCGTGACAAAGAG TCCCGACGCATTGGACTACCCTGCTGAGCCCAG CGAGAAGGCTTTGCAATCCAACCACTTT
TGGTGTTACGGCACTGTTTCTC AGGGCTGCGTAACCTGATGGGACGACTCGGGTA GCTCTTCCGAAACGTTAGGTTGGTGAAA
```



B19

```
ACCACAATGCCGTGACAAAGAG CCACCTGAGCAATGAGATCCCTGC TCCCGACGCATTGGACTACCCTGCTGAGCCCAG CGAGAAGGCTTTGCAATC
TGGTGTTACGGCACTGTTTCTC GGTGGACTCGTTACTCTAGGGACG AGGGCTGCGTAACCTGATGGGACGACTCGGGTC GCTCTTCCGAAACGTTAC
```



Abb. 3 Primer der zweiten isoformspezifischen RT-PCR zur Analyse der Expression verschiedener Agrin-B-Isoformen. Jeder Primer (B0, B8, B11, B19) hybridisierte spezifisch mit einer der 4 Agrin-B-Isoformen. Die Primer wurden sowohl bei der Analyse der Agrin-Expression in aufgereinigten RGCs bzw. Gesamtretnazelldissoziat (s. Abschnitt 5.1.1) als auch in der Einzelzell-RT-PCR von RGCs (s. Abschnitt 5.1.2) eingesetzt.

4.6.4 Einzelzell-RT-PCR von embryonalen retinalen Ganglienzellen

Um einem möglichen Abbau der RNA durch RNasen vorzubeugen, wurde während der Versuche mit Handschuhen gearbeitet. Alle verwendeten Medien und Intrazellulärlösungen wurden autoklaviert. Glaskapillaren zur Anfertigung von Mikroelektroden wurden 4 Std. bei 200°C sterilisiert. Retinae vom Embryonaltag 10, deren RGCs zuvor durch Fast Blue retrograd markiert worden waren, wurden in einer Meßkammer so ausgebreitet, daß die markierten RGCs nach oben orientiert waren. Die ausgebreitete Retina wurde mit einem kleinen Metallbügel beschwert und kontinuierlich mit DMEM perfundiert. Einzelne retrograd markierte RGCs wurden unter Fluoreszenzoptik identifiziert und mit einer 7 µl

Intrazellulärlösung (140 mM KCl; 5 mM EGTA; 3 mM MgCl₂; 5 mM HEPES) enthaltenden Mikroelektrode mit Hilfe der patch-clamp-Technik (Hamill et al., 1981) in der Ganzzellkonfiguration abgeleitet (s. Abb. 4). Bei der elektrophysiologischen Charakterisierung in der Spannungsklemme (voltage clamp) bei Haltepotentialen von -80 bis +60 mV zeigten sich die für RGCs typischen Natriumeinwärts- und Kaliumauswärtsströme (Ishida, 1995; s. Abb. 4).

Zur Expressionsanalyse einzelner Zellen wurde der Zellinhalt in die Mikroelektrode aufgesaugt und in einen cDNA-Synthesemix (5 µM Random-Primer; 0,5 mM dNTPs; 10 mM DTT; 20 Einheiten RNase Inhibitor; 100 Einheiten Superscript II Reverse Transkriptase) pipettiert. Als Kontrolle wurde außerdem die Intrazellulärlösung ohne gesammelten Zellinhalt in einem gesonderten Kontrollansatz in den cDNA-Synthesemix pipettiert, um etwaige Kontaminationen während des Experimentes auszuschließen. Die nachfolgende cDNA-Synthese erfolgte 1 Std. bei 37°C. Die cDNA in einem Volumen von 10 µl wurde direkt in der entsprechenden ersten Agrin-RT-PCR zur Analyse der B-Isoformen eingesetzt. Je 1 µl dieses PCR-Produktes wurde anschließend in den 4 nachfolgenden isoformspezifischen RT-PCR-Ansätzen verwendet. In diesen 4 unabhängigen PCR-Ansätzen wurde durch Auswahl geeigneter isoformspezifischer Primer jeweils eine der 4 Agrin-B-Isoformen amplifiziert. Als Kontrolle wurden alle PCR-Ansätze auch mit dem Intrazellulärlösung enthaltenden Kontrollansatz durchgeführt. Außerdem wurden jeweils in der ersten panspezifischen PCR als auch in den 4 unabhängigen isoformspezifischen PCR Kontrollen mit Wasser statt cDNA durchgeführt, um Kontaminationen auszuschließen. Lediglich PCR in denen alle diese Kontrollen negativ ausfielen, wurden bei der Auswertung berücksichtigt.

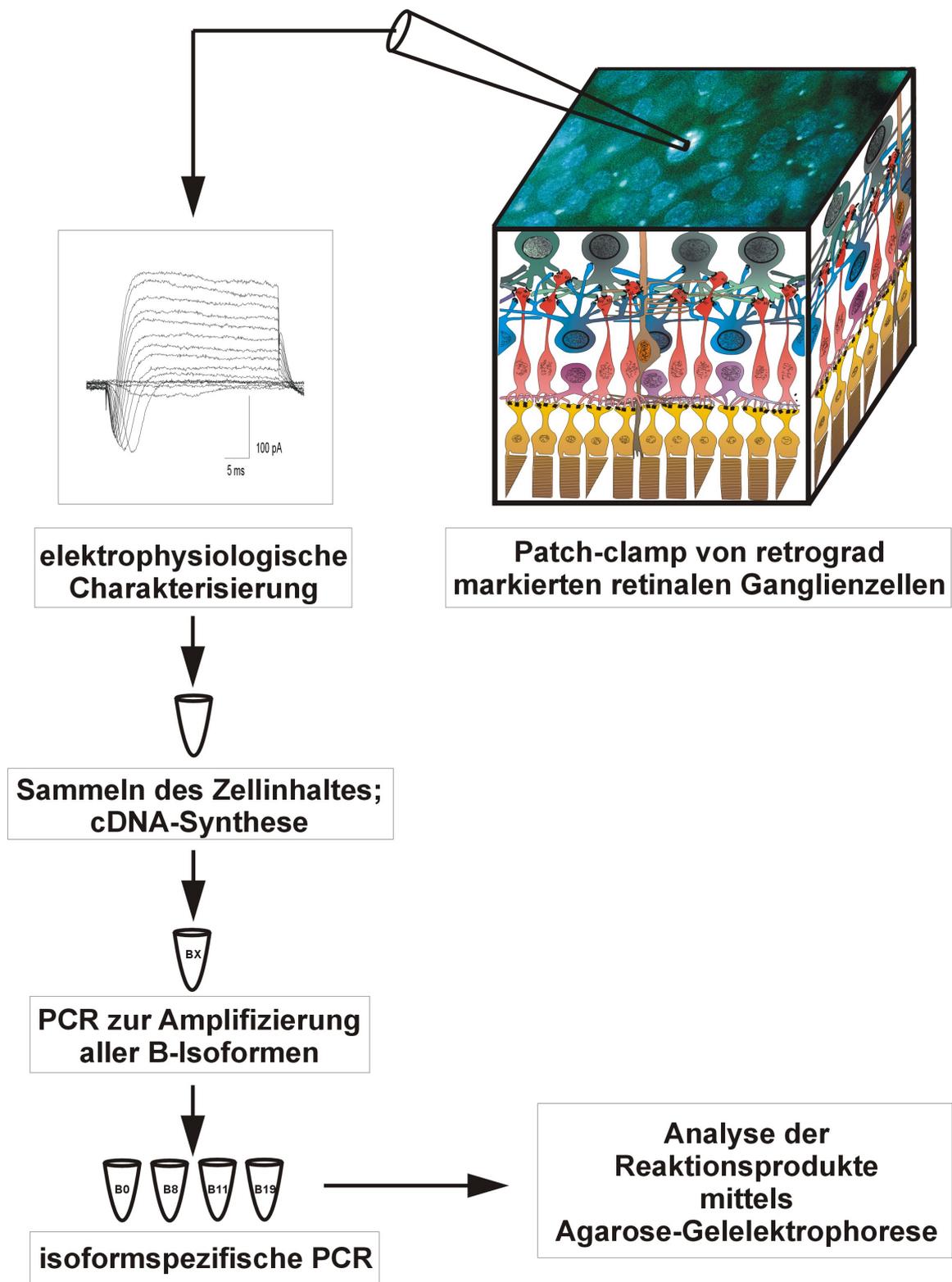


Abb. 4 Analyse der Expression verschiedener Agrin-B-Isoformen in einzelnen RGCs durch Einzelzell-RT-PCR.

4.6.5 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten nach ihrer Größe erfolgte auf 2 bis 4 %igen Agarosegelen nach der Vorschrift von Sambrook et al. (1989). Als Elektrophoresepuffer wurde TAE verwendet, da dieser im Gegensatz zu TBE keine Borsäure enthält, der man eine ligationshemmende Wirkung zuschreibt. Die Agarosegele wurden anschließend in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in Wasser gefärbt. Zur Größenbestimmung der entsprechenden DNA-Fragmente wurden geeignete DNA-Längenstandards verwendet. Die gefärbten Agarosegele wurden schließlich mit Hilfe einer digitalen Kamera (Eagle Eye Mini Darkroom Cabinet, Stratagene) im UV-Durchlicht fotografiert und dokumentiert.

4.6.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden unter langwelligem UV-Licht (302 nm) aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mit Hilfe des Sephaglas BandPrep Kits (Pharmacia) nach Vorschrift des Herstellers. Zur Elution der DNA aus dem Agarosegel wurde deionisiertes Wasser und nicht der mitgelieferte Elutionspuffer verwendet, da dieser EDTA enthielt, welches nachfolgende enzymatische Reaktionen stören konnte.

4.6.7 Klonierung von PCR-Fragmenten

Nach Auftrennung und Aufreinigung aus Agarosegelen wurden PCR-Fragmente über den durch die Taq-Polymerase erzeugten 3'-Adenosin-Überhang an den Enden des PCR-Produktes mit Hilfe des TOPO-Cloning-Kits (Invitrogen) in den PCR 2.1-TOPO-Vektor kloniert. Dieser Klonierungsvektor trägt an den Enden 5'-Thymidin-Überhänge, die mit den 3'-Adenosin-Überhängen des PCR-Produktes hybridisieren können, sowie kovalent gebunden das für die Ligation erforderliche Enzym Topoisomerase. Im Vergleich zu konventionellen Ligationen ist diese Methode deutlich schneller und effizienter. Die in den TOPO-Klonierungsvektor klonierte DNA wurde schließlich nach Vorschrift des Herstellers durch Hitzeschock in die chemisch kompetenten Bakterien (TOP10) eingebracht und diese nach Zugabe von SOC-Medium 30 Min. bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Min. im Schüttler inkubiert. Zehn bis fünfzig µl der Bakteriensuspension wurden dann auf LB-Agarplatten mit 50 bis 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Minipräp)

Drei ml LB-Medium mit 10 µg/ml Ampicillin wurden mit den entsprechenden rekombinanten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 Umdrehungen pro Minute im Schüttler inkubiert. Etwa 1,5 ml der Kulturen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4000 x g, Raumtemperatur, 5 Min.). Die Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA aus den Bakterien erfolgte mit Hilfe des Qiaprep8-Kits (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers. Die abschließende Elution der Plasmid-DNA wurde mit deionisiertem Wasser durchgeführt.

4.6.9 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Puffern des Enzymherstellers (New England Biolabs) bei den vorgeschriebenen Temperaturen durchgeführt. Dabei wurden bis zu 200 ng DNA mit 10 bis 20 Einheiten Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 1 Std. inkubiert. Die Reaktion wurde abschließend durch Zugabe der entsprechenden Menge DNA-Probenpuffer beendet.

5. Ergebnisse

5.1 Expression von Agrin in Ganglienzellen der embryonalen Hühnerretina

5.1.1 Retinale Ganglienzellen exprimieren mehrere Agrin-Isoformen

Um zu analysieren, ob eine homogene Zellpopulation wie gereinigte RGCs mehrere Agrin-Isoformen exprimiert, wurden cDNA Präparationen von durch Immunopanning aufgereinigten RGCs der Stadien E6, E10, E14 und E19 auf die Anwesenheit der verschiedenen B-Isoformen mittels isoformspezifischer RT-PCR analysiert. Daneben wurde für jedes Entwicklungsstadium cDNA aus Gesamtreinazelldissoziat der Immunopanning-Aufreinigung untersucht und die Expression von Agrin-B-Isoformen in Gesamtreinazelldissoziat mit RGCs verglichen.

Die Analyse der jeweiligen isoformspezifischen RT-PCR durch Agarose-Gelelektrophorese zeigte sowohl in cDNA aus Gesamtreinazelle (s. Abb. 5) als auch aufgereinigten RGCs (s. Abb. 6) die gleichzeitige Expression verschiedener Agrin-B-Isoformen, nämlich der B0-, B11- und B19-Isoformen. Es wurde ferner cDNA aus Gesamtreinazelle des Entwicklungsstadiums E3 synthetisiert und auf die Expression von Agrin-B-Isoformen untersucht. Zu diesem frühen Entwicklungsstadium besteht die Hühnerretina noch weitgehend aus undifferenzierten Neuroepithelzellen (Mey und Thanos, 2000), so daß auf diese Weise die Agrin-Expression vor der Differenzierung der ersten RGCs untersucht werden konnte. Im Gegensatz zu späteren Entwicklungsstadien nach Differenzierung von RGCs wurde hier lediglich eine Expression der B0-Isoform beobachtet (s. Abb. 5).

Als Kontrolle wurde jeweils in der ersten panspezifischen PCR Wasser statt Agrin-cDNA eingesetzt. Daraufhin erfolgte in der zweiten isoformspezifischen PCR eine weitere Reaktion mit einem Aliquot aus dieser ersten Kontrolle sowie erneut eine Reaktion mit Wasser statt Agrin-cDNA. Beide Kontrollen zeigten in allen untersuchten Entwicklungsstadien keine Signale, wodurch eine Verunreinigung der jeweiligen PCR ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 5 und Abb. 6). Zur Bestätigung der Spezifität der jeweiligen PCR wurden die jeweiligen Reaktionsprodukte der zweiten isoformspezifischen PCR wie auch in allen weiteren durchgeführten RT-PCR kloniert und sequenziert. Datenbankanalysen der jeweiligen klonierten cDNA-Sequenzen zeigten eine nahezu vollständige Sequenzidentität der Reaktionsprodukte mit den entsprechenden publizierten Agrin-cDNA-Sequenzen.

In allen untersuchten Entwicklungsstadien vor, während und nach der Synaptogenese wurden in der Gesamtretina und in aufgereinigten RGCs sowohl aktive als auch inaktive Agrin-Isoformen exprimiert. Eine homogene Zellpopulation wie RGCs exprimiert also mehr als eine Agrin-Isoform. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen der Agrin-Expression in der Gesamtretina (Kröger et al., 1996) konnte dagegen weder in aufgereinigten RGCs noch in der Retina eine Expression der B8-Isoform nachgewiesen werden.

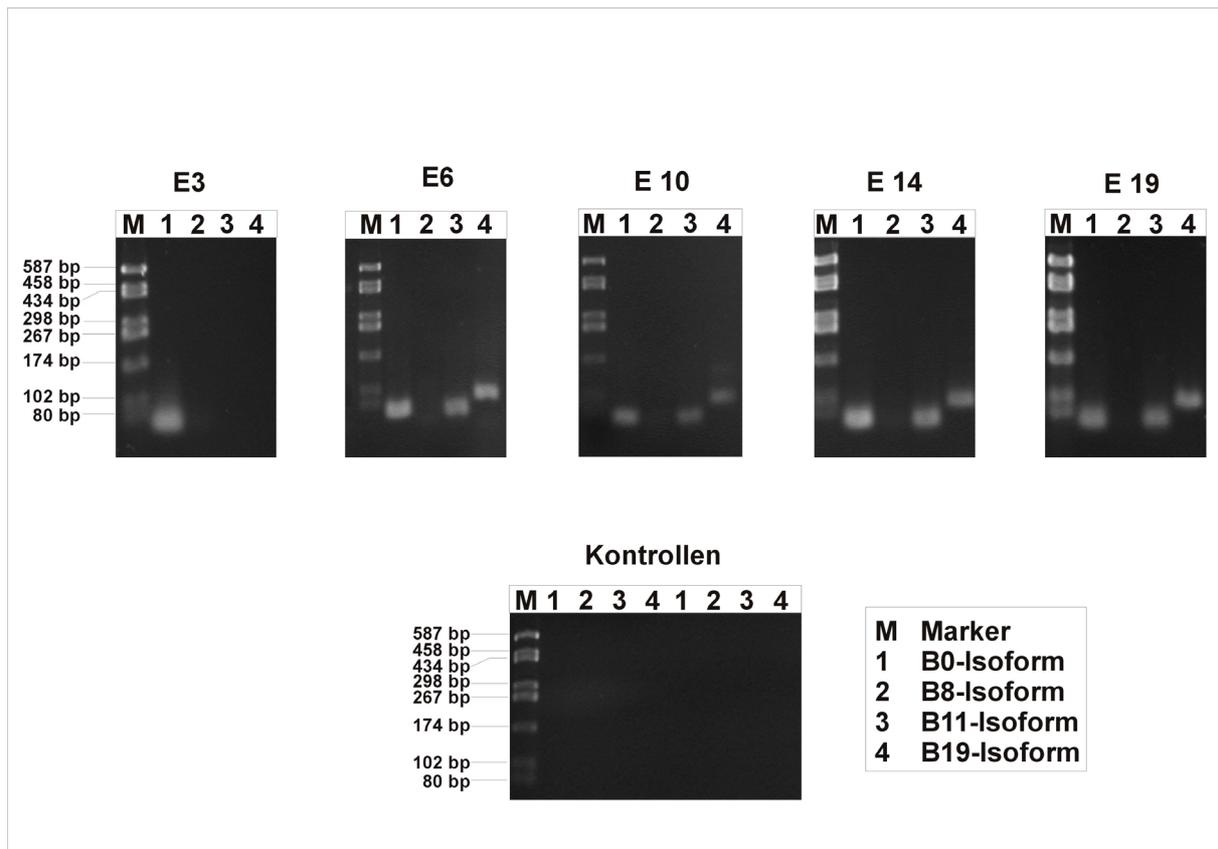


Abb. 5 Isoformspezifische Agrin-RT-PCR zur Analyse der Expression verschiedener B-Isoformen in Gesamretinazelldissoziat. Im Entwicklungsstadium E3 wurde lediglich die B0-Isoform exprimiert, was auf eine Agrin-Expression durch undifferenzierte Neuroepithelzellen zurückzuführen war. In allen anderen untersuchten Entwicklungsstadien vor, während und nach der Synaptogenese (E6, E10, E14, E19) wurden bis auf die B8-Isoform alle anderen B-Isoformen exprimiert (B0, B11, B19). Alle Kontrollen mit Wasser statt cDNA in der ersten und zweiten PCR waren negativ. Marker mit definierter Basenpaarlänge wurden jeweils in Spur M aufgetragen.

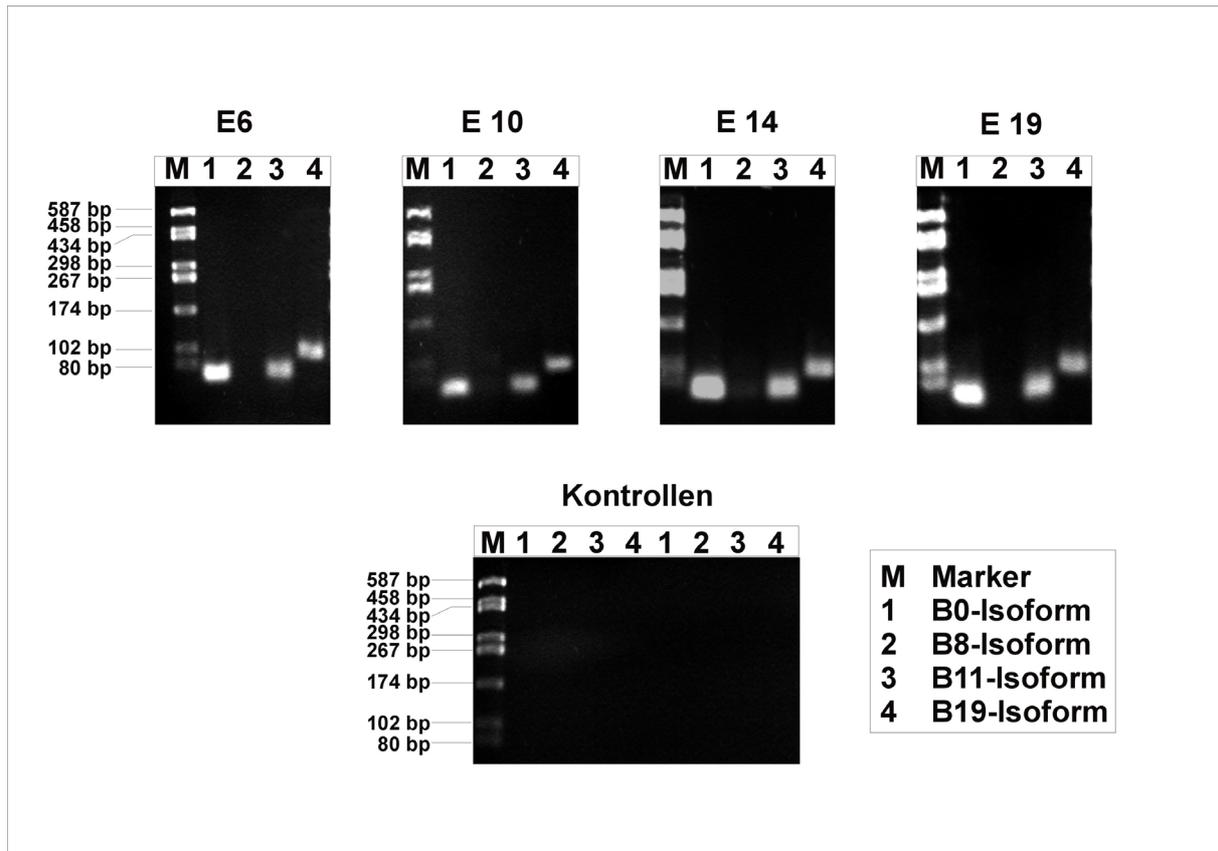


Abb. 6 Isoformspezifische Agrin-RT-PCR zur Analyse der Expression verschiedener B-Isoformen in durch Immunopanning aufgereinigten RGCs. In allen untersuchten Entwicklungsstadien vor, während und nach der Synaptogenese (E6, E10, E14, E19) wurden wie bei der Analyse der Agrin-Expression in Gesamtreinazelldissoziat (s. Abb. 5) bis auf die B8-Isoform alle anderen B-Isoformen exprimiert (B0, B11, B19). Alle Kontrollen mit Wasser statt cDNA in der ersten und zweiten PCR waren negativ. Marker mit definierter Basenpaarlänge wurden jeweils in Spur M aufgetragen.

5.1.2 Expression von Agrin-Isoformen in einzelnen retinalen Ganglienzellen

Die Retina des Huhns besitzt mindestens 4 verschiedene morphologisch unterscheidbare Subtypen von RGCs (Thanos et al., 1992), die alle mittels Immunopanning aufgereinigt werden, da sie alle Thy-1 exprimieren. Die Expression verschiedener Agrin-Isoformen könnte dadurch erklärt werden, daß einzelne dieser RGC-Subtypen jeweils nur eine Agrin-Isoform exprimieren (RGC-Subtypen spezifische Agrin-Isoformen). Alternativ könnten einzelne RGCs gleichzeitig verschiedene Agrin-Isoformen exprimieren. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde in einem zweiten Ansatz eine isoformspezifische RT-PCR auf Einzelzellebene durchgeführt. Nach Identifizierung individueller RGCs durch retrograde Markierung, elektrophysiologische Charakterisierung und Ernten des Zytoplasmas wurden eine cDNA-Synthese und 2 PCR-Runden durchgeführt. Die Analyse der Reaktionsprodukte der zweiten isoformspezifischen PCR zeigte auch auf Einzelzellebene sowohl die Expression der B0- als auch der B11-Isoform (s. Abb.7). In Übereinstimmung mit

den Ergebnissen der isoformspezifischen RT-PCR aus gereinigten RGCs konnte keine Expression der B8-Isoform nachgewiesen werden. Allerdings fand sich im Gegensatz zur RT-PCR aus gereinigten RGCs keine Expression der B19-Isoform. Dies deutet entweder auf eine sehr schwache, auf Einzelzellebene mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbare Expression dieser Agrin-Isoform hin oder auf einen seltenen RGC-Subtyp mit Expression der B19-Isoform, der bei den analysierten Einzelzell-RT-PCR nicht untersucht wurde.

Neben den bereits bei der RT-PCR mit aufgereinigten RGCs durchgeführten Kontrollen mit Wasser statt Agrin-cDNA (K1, K2) wurden in der Einzelzell-RT-PCR außerdem Kontrollen mit der Intrazellulärlösung (I) durchgeführt. In allen Einzelzell-RT-PCR-Experimenten wurden nur Zellen berücksichtigt, in denen alle diese Negativkontrollen keine Signale zeigten.

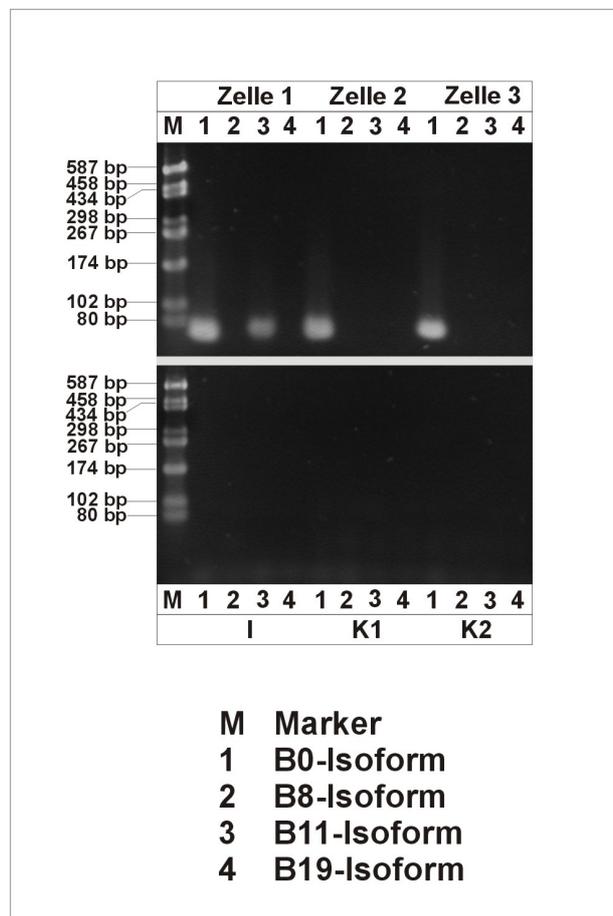


Abb. 7 Einzelzell-RT-PCR von retrograd markierten RGCs des Entwicklungsstadiums E10 zur Analyse der Expression einzelner Agrin-B-Isoformen. Während die meisten Zellen lediglich eine Expression der B0-Isoform zeigten (Zelle 2, Zelle 3), exprimierten zumindest einige Zellen gleichzeitig die B0- und B11-Isoformen (Zelle 1). Kontroll-PCR mit der Intrazellulärlösung, in der die Zellen gesammelt wurden (I), sowie mit Wasser statt cDNA in der ersten und zweiten PCR (K1, K2) waren negativ. Marker mit definierter Basenpaarlänge wurden jeweils in Spur M aufgetragen.

Insgesamt wurden 14 Zellen durch Einzelzell-RT-PCR untersucht. Neun dieser Zellen zeigten lediglich eine Expression der B0-Isoform (47,4 %), wohingegen 5 Zellen eine gleichzeitige Expression der B0- und B11-Isoformen aufwiesen (26,3 %). Bei 5 weiteren Zellen konnte keine Agrin-Expression nachgewiesen werden (26,3 %), was entweder auf eine fehlende oder unter der Nachweisgrenze liegende Expression zurückzuführen war (s. Abb. 8).

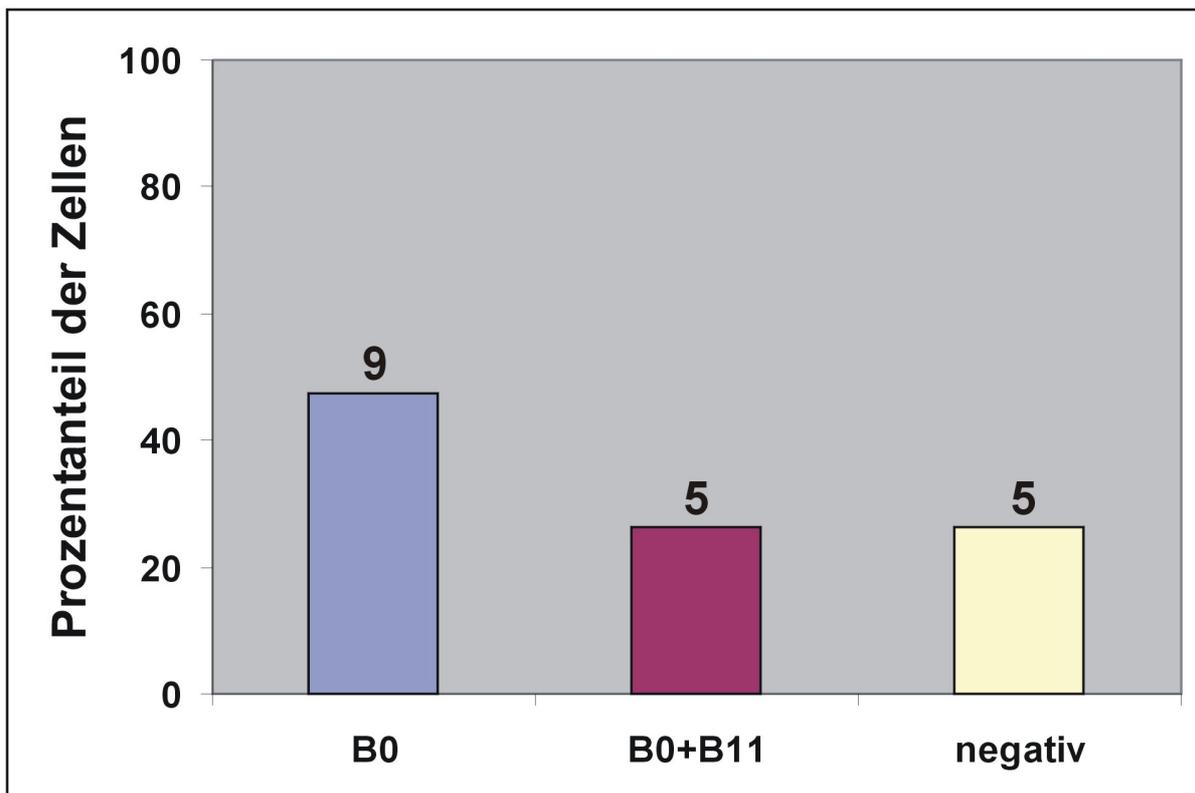


Abb. 8 Quantifizierung der Einzelzell-RT-PCR zur Analyse der Expression einzelner Agrin-B-Isoformen. Während 9 analysierte Zellen (47,4 %) lediglich eine Expression der B0-Isoform zeigten, exprimierten 5 Zellen (26,3 %) gleichzeitig die B0- und B11-Isoformen. Fünf Zellen (26,3 %) zeigten keine Agrin-Expression.

Die beschriebene isoformspezifische Einzelzell-RT-PCR machte deutlich, daß zumindest einige RGCs 2 verschiedene Agrin-B-Isoformen gleichzeitig exprimieren, wobei es sich je um eine aktive und eine inaktive Agrin-B-Isoformen handelt. Die Expression verschiedener Agrin-Isoformen in einer definierten Population von RGCs kann also zumindest zum Teil durch die gleichzeitige Expression verschiedener Isoformen in einzelnen Zellen erklärt werden.

5.1.3 Expression von sekretiertem und Transmembran-Agrin in der Retina und in aufgereinigten retinalen Ganglienzellen

Um zu entscheiden, ob die verschiedenen B-Isoformen als sekretiertes NtA-Agrin oder als TM-Agrin vorliegen, wurde die Expression beider N-terminaler Isoformen durch RT-PCR untersucht. Dazu wurden mit den entsprechenden Primerpaaren 2 Runden PCR zunächst mit cDNA aus Gesamtretina durchgeführt. Bei allen untersuchten Entwicklungsstadien (E8, E12, E16) zeigte sich dabei eine deutliche Expression sowohl von NtA- als auch von TM-Agrin (s. Abb. 9 A-B). Aufgereinigte RGCs des Entwicklungsstadiums E6 exprimierten dagegen ausschließlich TM-Agrin (s. Abb. 9 C-D, Spur RGC). Die als Kontrolle durchgeführte PCR mit cDNA aus E6-Gesamtretina-Zelldissoziat aus dem Überstand der Immunopanning-Aufreinigung zeigte dagegen erneut die Expression beider N-terminaler Agrin-Isoformen (s. Abb. 9 C-D, Spur D). Alle Kontrollen mit Wasser statt cDNA in der ersten und zweiten PCR-Runde (s. Abb. 9 A-D, Spuren K1, K2) waren negativ. Zur Bestätigung der Spezifität der RT-PCR für NtA- und TM-Agrin wurden erneut alle Reaktionsprodukte kloniert und sequenziert. In allen Fällen entsprachen die DNA-Sequenzen der klonierten PCR-Produkte den jeweiligen publizierten Sequenzen.

In einer bestimmten Population von ZNS-Neuronen, nämlich embryonalen RGCs, wird während der Phase der axonalen Wachstums ausschließlich TM-Agrin exprimiert. Dies läßt auf eine Funktion dieser Agrin-Isoform in RGCs während der axonalen Verlängerung schließen. Diese bisher noch nicht beschriebene Funktion von Agrin wurde in den folgenden Experimenten genauer analysiert.

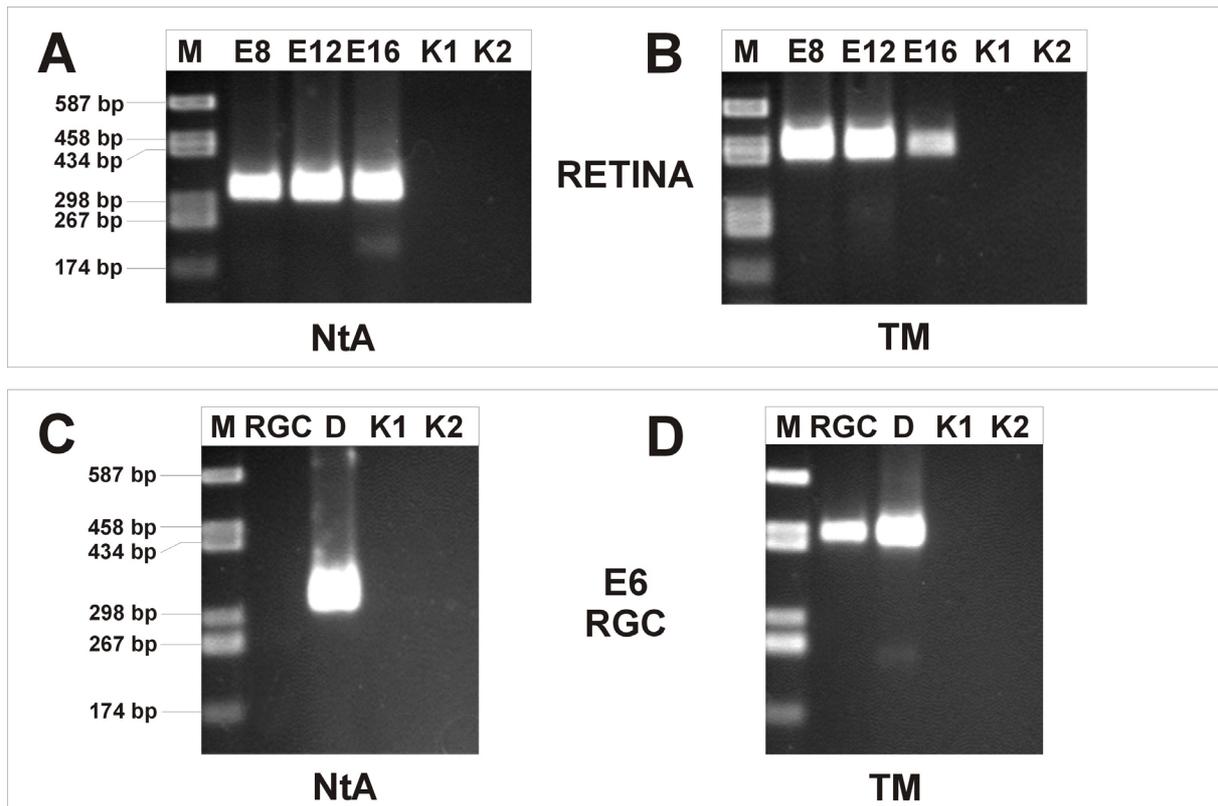


Abb. 9 Agrin-RT-PCR zur Analyse der Expression der beiden N-terminalen Agrin-Isoformen (NtA-Agrin, TM-Agrin) in der Retina (A, B) zu verschiedenen Entwicklungsstadien (E8, E12, E16) sowie in durch Immunopanning aufgereinigten RGCs des Entwicklungsstadiums E6 (C, D). Während in der Retina in allen untersuchten Entwicklungsstadien beide N-terminalen Isoformen exprimiert wurden, zeigte sich in aufgereinigten RGCs (Spur RGC) ausschließlich eine Expression von TM-Agrin. In Gesamtretina-Zelldissoziat (Spur D) desselben Entwicklungsstadiums wurde dagegen erneut sowohl NtA- als auch TM-Agrin exprimiert. Kontrollen mit Wasser statt cDNA in der ersten und zweiten PCR (Spur K1 und K2) waren in allen Fällen negativ. Marker mit definierter Basenpaarlänge wurden jeweils in Spur M aufgetragen.

5.2 Biologische Aktivität von ganglienzellassoziertem Agrin

Motoneurone induzieren auf kultivierten Muskelfasern AChR-Aggregate durch die Sekretion aktiver Agrin-Isoformen (Magill-Solc und McMahan, 1988; Reist et al., 1992). Da RGCs wie Motoneurone aktive Agrin-B-Isoformen exprimieren, stellte sich die Frage, ob Axone von RGCs ebenfalls in der Lage sind, auf kultivierten Muskelfasern AChR-Aggregate zu induzieren. Um dies zu untersuchen, wurden E6 Retinaexplantate zusammen mit 5 Tage alten Huhn-Muskellkulturen kultiviert. Als Positivkontrollen wurden zum einen Huhn-Muskellkulturen mit aktivem Agrin (Agrin CBA-1 A4B19) behandelt, zum anderen Rückenmarksneurone, die ebenfalls aktives Agrin exprimieren und eine Aggregation von AChR induzieren können (Lieth und Fallon, 1993), mit Muskelkulturen kokultiviert. Wie erwartet, zeigten sowohl die mit aktivem Agrin behandelten (s. Pfeile in Abb. 10 B) sowie die mit Rückenmarksneuronen kokultivierten Muskelkulturen (s. Abb. 10 C und Pfeile in D) eine

signifikante Bildung von AChR-Aggregaten im Vergleich zu nicht mit Agrin behandelten Kontrollkulturen, die lediglich wenige sogenannte Spontanaggregate aufwiesen (s. Pfeil in Abb. 10 A). In den Kokulturen von Rückenmarksneuronen mit Muskelfasern beobachtete man diese AChR-Aggregate insbesondere entlang der Kontaktstellen zwischen den Axonen und Muskelfasern. RGC-Axone konnten dagegen keine AChR-Aggregation an den Kontaktstellen zwischen Axon und Muskelfaser induzieren (s. Abb. 10 E-F).

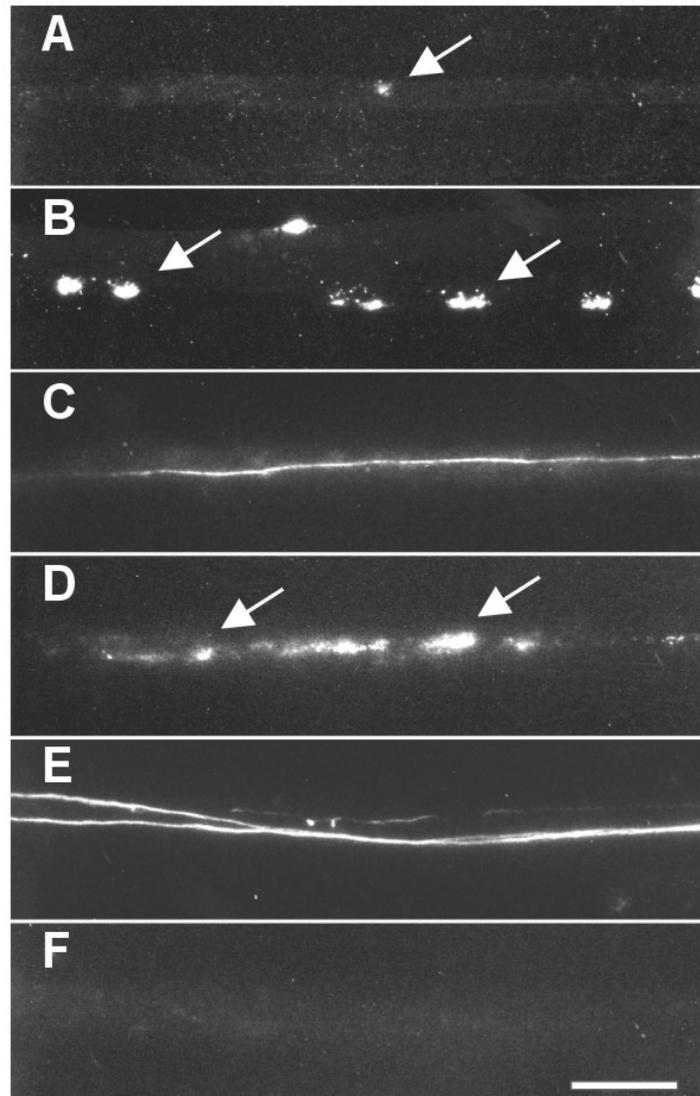


Abb. 10 Muskelfasern vor (A) und nach (B) Zugabe von aktivem Agrin sowie Kokulturen von Muskelfasern mit Axonen von Rückenmarksneuronen (C, D) und RGC-Axonen (E, F). Muskelfasern zeigten vor Zugabe von aktivem Agrin lediglich wenige Spontanaggregate von AChR (Pfeil in A). Die Zugabe von aktivem Agrin führte zur Bildung zahlreicher AChR-Aggregate entlang der Muskelfasern (Pfeile in B). Analog konnten Axone von Rückenmarksneuronen (C) ebenfalls eine AChR-Aggregation induzieren (Pfeile in D). RGC-Axone (E) bewirkten dagegen keine AChR-Aggregation (F). Axone wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Neurofilament 68 (NF 68), AChR-Aggregate mit Rhodamin-gekoppeltem α -Bungarotoxin (α -BTX) gefärbt. Abbildungen C und D sowie E und F Stellen jeweils Doppelbelichtungen desselben Ausschnitts dar. Der Skalierungsbalken entspricht 25 μ m.

Dies war überraschend, da RGCs, wie die oben angeführten Expressionsstudien zeigten, aktive Agrin-Isoformen exprimieren und aktives Agrin auf der Oberfläche ihrer Axone lokalisiert ist (Halfter, 1993; Kröger et al., 1996; Halfter et al., 1997; Koulen et al., 1999). Während mit aktivem Agrin behandelte und mit Rückenmarksneuronen kokultivierte Muskelkulturen eine vergleichbare Anzahl von AChR-Aggregaten pro Segment aufwiesen, war diese Anzahl auf mit RGC-Axonon kokultivierten Muskelkulturen an den Kontaktstellen vergleichbar mit der Anzahl von sogenannten Spontanaggregaten auf unbehandelten Muskelkulturen (s. Abb. 11).

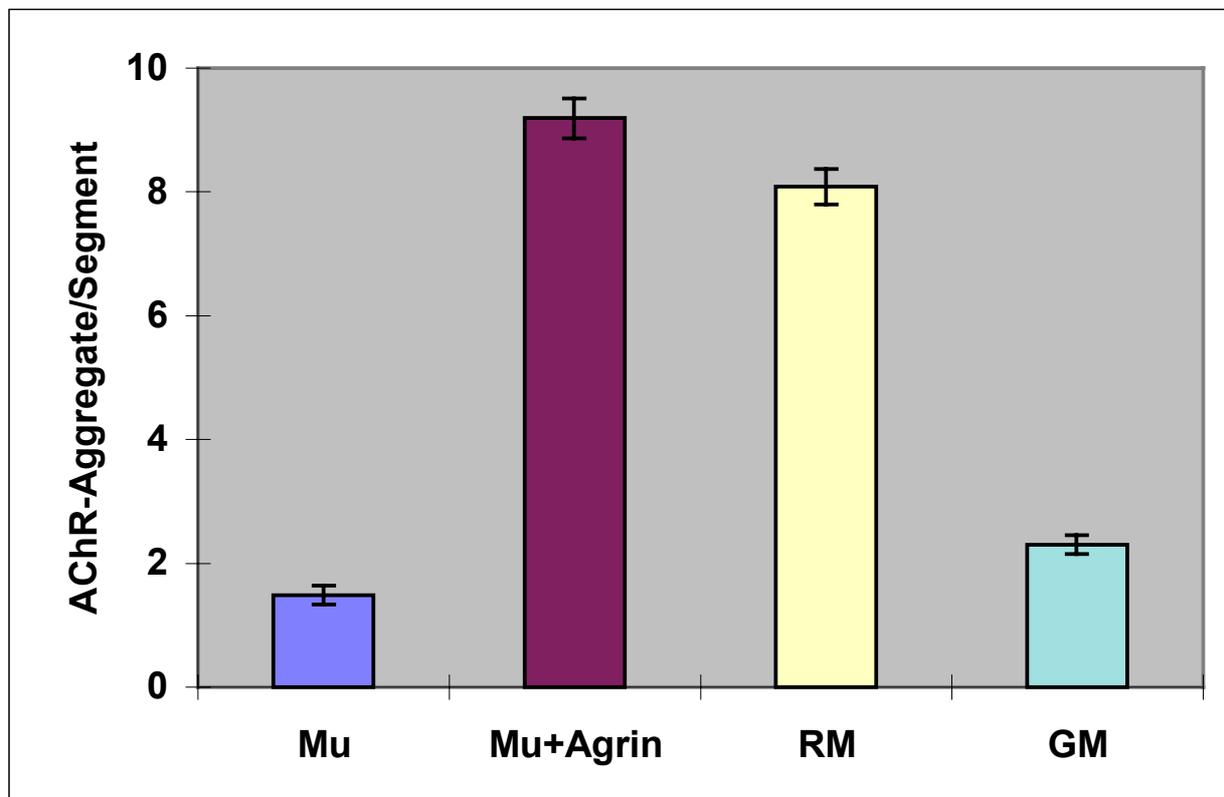


Abb. 11 Quantifizierung der verminderten AChR-Aggregationsaktivität von RGC-Axonon auf kultivierten Muskelfasern. Axone von Rückenmarksneuronen auf Muskelfasern (RM) konnten eine vergleichbare Anzahl von AChR-Aggregaten induzieren wie auf mit aktivem Agrin behandelten Muskelfasern (Mu+Agrin). Dagegen lag die Anzahl der AChR-Aggregate in Kokulturen von RGC-Axonon mit Muskelfasern (GM) im Bereich von Spontanaggregaten auf unbehandelten Muskelfasern (Mu). Die AChR-Aggregate wurden pro 600 μ m-Segment der Muskelfaser ausgezählt.

Um zu untersuchen, ob auf RGC-Axonen lokalisiertes Agrin keine AChR-Aggregationsaktivität besitzt oder ob RGCs möglicherweise die Agrin-induzierte AChR-Aggregation inhibieren können, wurden 5 Tage alte Muskelkulturen erneut mit RGC-Axonen kokultiviert und zusätzlich mit Agrin behandelt. Im Bereich der Kontaktstelle von RGC-Axonen (s. Abb. 12 A) und Muskelfasern war die Anzahl der AChR-Aggregate (s. Pfeile in Abb. 12 B) im Vergleich zu Muskelfasern ohne Kontakt zu RGC-Axonen (s. Abb. 12 C, Pfeile in D) in derselben Kulturschale deutlich reduziert. Die Quantifizierung ergab eine um 44 % verminderte AChR-Aggregation im Bereich der Kontaktstelle zwischen RGC-Axonen und Muskelfasern (s. Abb.13).

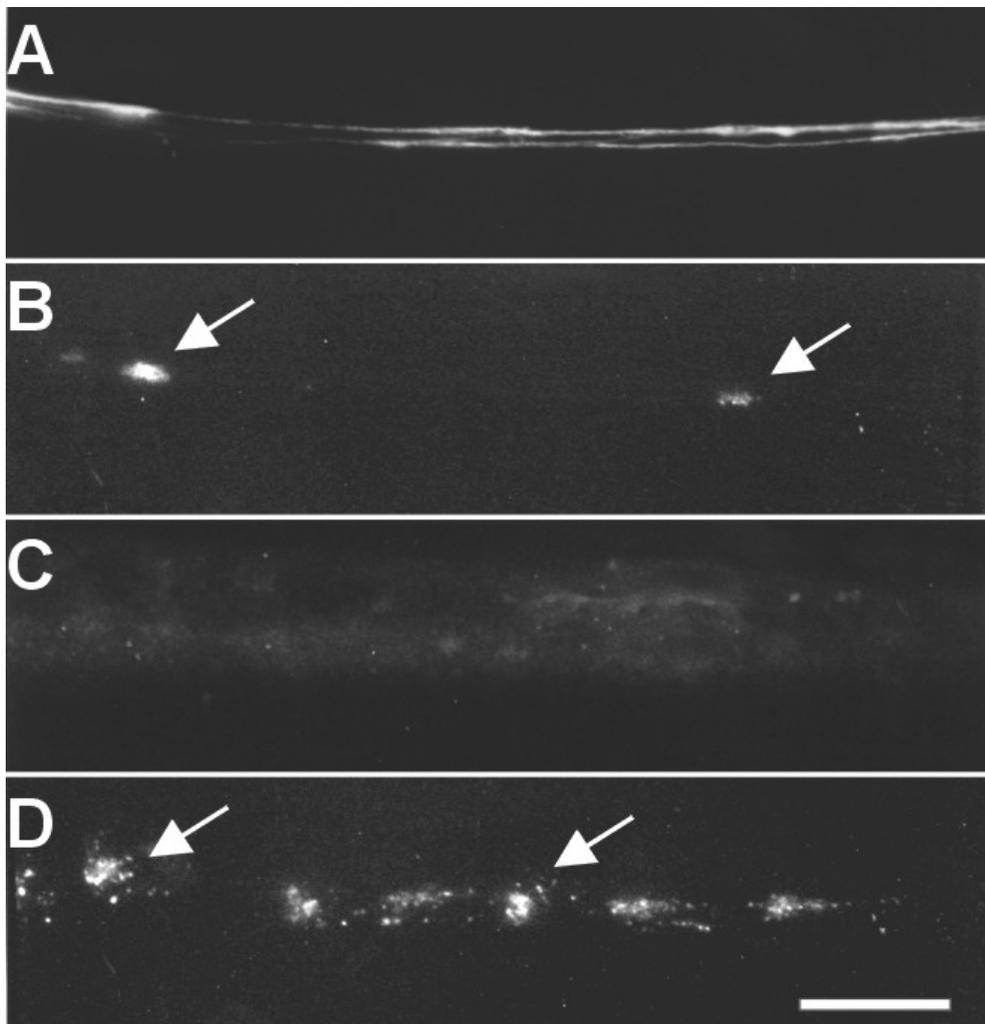


Abb. 12 Kokulturen von Muskelfasern mit RGC-Axonen nach Behandlung mit aktivem Agrin. An den Kontaktstellen von RGC-Axonen (A) mit Muskelfasern (B) induzierte Agrin signifikant weniger AChR-Aggregate (Pfeile in B) als auf Muskelfasern ohne Kontakt mit RGC-Axonen (C, D, Pfeile in D). Axone wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Neurofilament 68 (NF 68), AChR-Aggregate mit Rhodamin-gekoppeltem α -Bungarotoxin (α -BTX) gefärbt. Abbildungen A und B sowie C und D stellen jeweils Doppelbelichtungen desselben Ausschnitts dar. Der Skalierungsbalken entspricht 25 μ m.

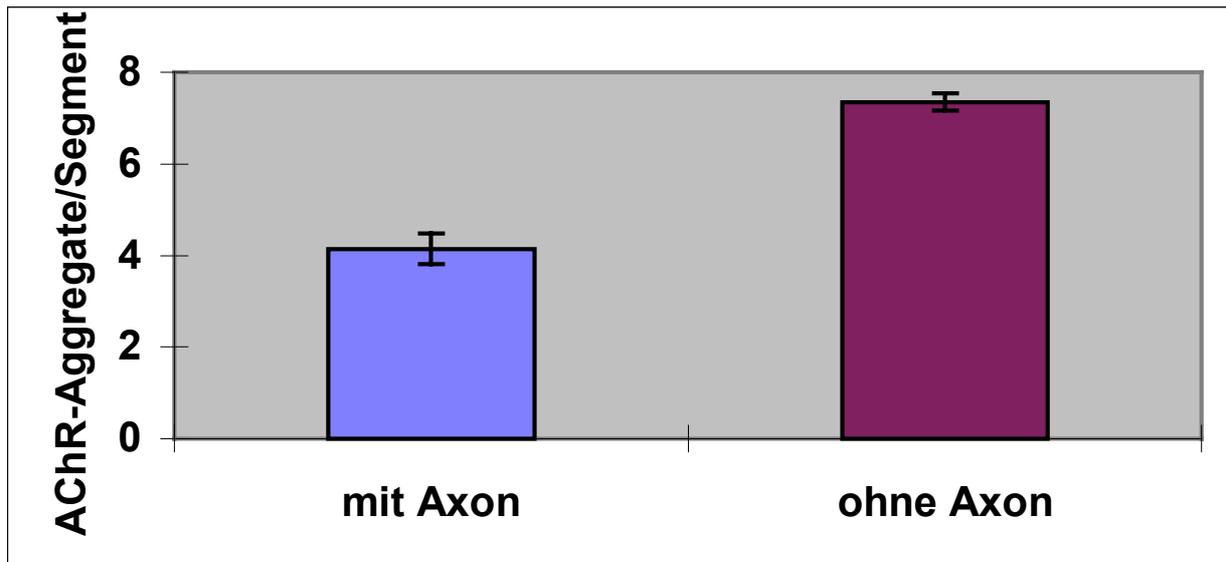


Abb. 13 Quantifizierung des inhibitorischen Effektes von RGC-Axonen auf die Agrin-induzierte AChR-Aggregation auf kultivierten Muskelfasern. Nach Behandlung mit aktivem Agrin bildeten sich in derselben Kulturschale an den Kontakten von RGC-Axonon mit Muskelfasern (mit Axon) signifikant weniger AChR-Aggregate als in Bereichen ohne Kontakt (ohne Axon). Die AChR-Aggregate wurden pro 600 μm -Segment der Muskelfaser ausgezählt.

Die beschriebenen Experimente machten deutlich, daß RGC-Axone, im Gegensatz zu Motoneuronen, nicht in der Lage sind, AChR-Aggregate auf kultivierten Muskelfasern zu induzieren, obwohl sie wie diese aktive Agrin-Isoformen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Exogen zugegebenes Agrin war außerdem kaum in der Lage, an den Kontaktstellen zwischen RGC-Axonon und Muskelfasern AChR-Aggregate zu induzieren. Möglicherweise wird also die Agrin-induzierte AChR-Aggregation auf kultivierten Muskelfasern durch einen noch unbekanntem RGC-assoziierten Faktor inhibiert.

5.3 Acetylcholinrezeptor-Aggregationsaktivität von Transmembran-Agrin auf kultivierten Muskelfasern

RGCs exprimieren ausschließlich die Transmembranform von Agrin. Dabei entspricht zumindest ein Teil dieses Agrins den B11- und B19-Isoformen, die prinzipiell AChR-Aggregationsaktivität auf kultivierten Muskelfasern besitzen (Ruegg et al., 1992; Tsim et al., 1992; Ma et al., 1994). Die beschriebenen Kokulturen machten jedoch deutlich, daß das auf der Oberfläche von RGC-Axonon lokalisierte TM-Agrin unter diesen Bedingungen nicht in der Lage war, AChR-Rezeptoren zu aggregieren. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, daß die Transmembranform von Agrin keine AChR-Aggregationsaktivität besitzt, auch wenn es sich um eine aktive Isoform mit einer Insertion im Bereich der Spleißstelle B handelt. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde heterolog exprimiertes TM-Agrin auf seine AChR-Aggregationsaktivität analysiert. An den Kontaktstellen der transfizierten HEK-Zellen mit Muskelfasern zeigte sich dabei eine deutliche Bildung von AChR-Aggregaten (s. Abb. 14). TM-Agrin besitzt also prinzipiell AChR-Aggregationsaktivität auf kultivierten Muskelfasern. Diese AChR-Aggregationsaktivität des auf RGC-Axonon lokalisierten TM-Agrin scheint allerdings durch einen noch unbekanntem Mechanismus von RGCs aktiv inhibiert zu werden.

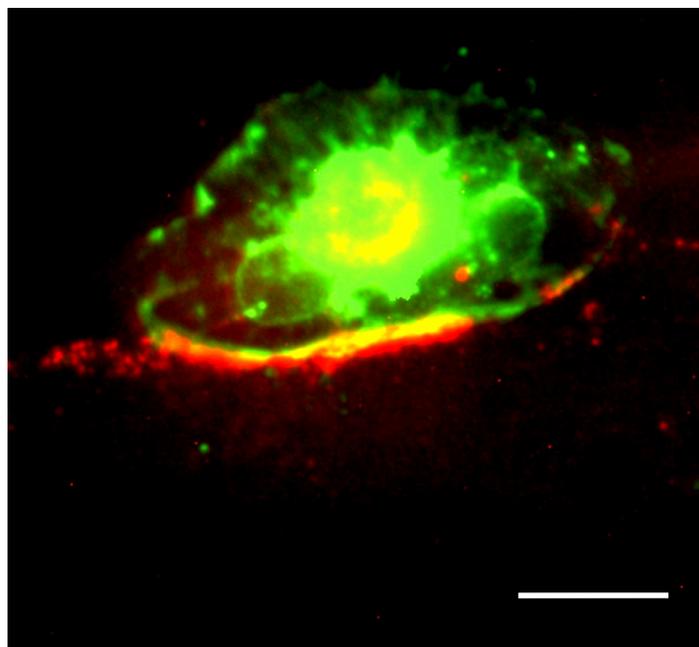


Abb. 14 AChR-Aggregationsaktivität von TM-Agrin. Mit TM-Agrin transfizierte HEK-293-Zellen wurden 24 Std. mit Muskelfasern kokultiviert und mit einem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) gefärbt (grün). Färbungen der AChR mit Rhodamin-gekoppeltem α -Bungarotoxin (α -BTX) (rot) zeigten eine deutliche AChR-Aggregation im Bereich der Kontaktstelle zwischen transfizierten HEK-293-Zellen und Muskelfasern. Der Skalierungsbalken entspricht 10 μ m.

5.4 Funktion von Agrin während des axonalen Wachstums von retinalen Ganglienzellen

5.4.1 Ausbildung von Mikrodornen auf Axonen von retinalen Ganglienzellen

Agrin wird bereits früh in der Embryonalentwicklung während des axonalen Wachstums auf der Oberfläche von RGC-Axonen exprimiert (Halfter, 1993; Kröger et al., 1996; Halfter et al., 1997; Koulen et al., 1999), wobei es sich, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, ausschließlich um die Transmembranform von Agrin handelt.

Um die Funktion von TM-Agrin in RGCs zu untersuchen, wurden RGC-Axone für 3 Stunden in geringer Konzentration in Anwesenheit eines anti-Agrin-Antiserums (AS 46) auf Basalmembranen kultiviert und nach Fixierung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt, das spezifisch an depolymerisiertes Aktin bindet. Während die Axone von Kontrollkulturen eine gerade Struktur aufwiesen (s. Abb. 15 A), waren in Antiserum-behandelten Kulturen entlang der gesamten Länge der Axone zahlreiche filopodienähnliche Fortsätze zu beobachten (s. Abb. 15 B). Diese Fortsätze wurden im Folgenden als Mikrodornen bezeichnet. Die Phalloidin-Färbung zeigte ferner, daß die Mikrodornen Aktin-Filamente enthielten, was auf eine Beteiligung des axonalen Zytoskeletts bei deren Bildung hindeutete.

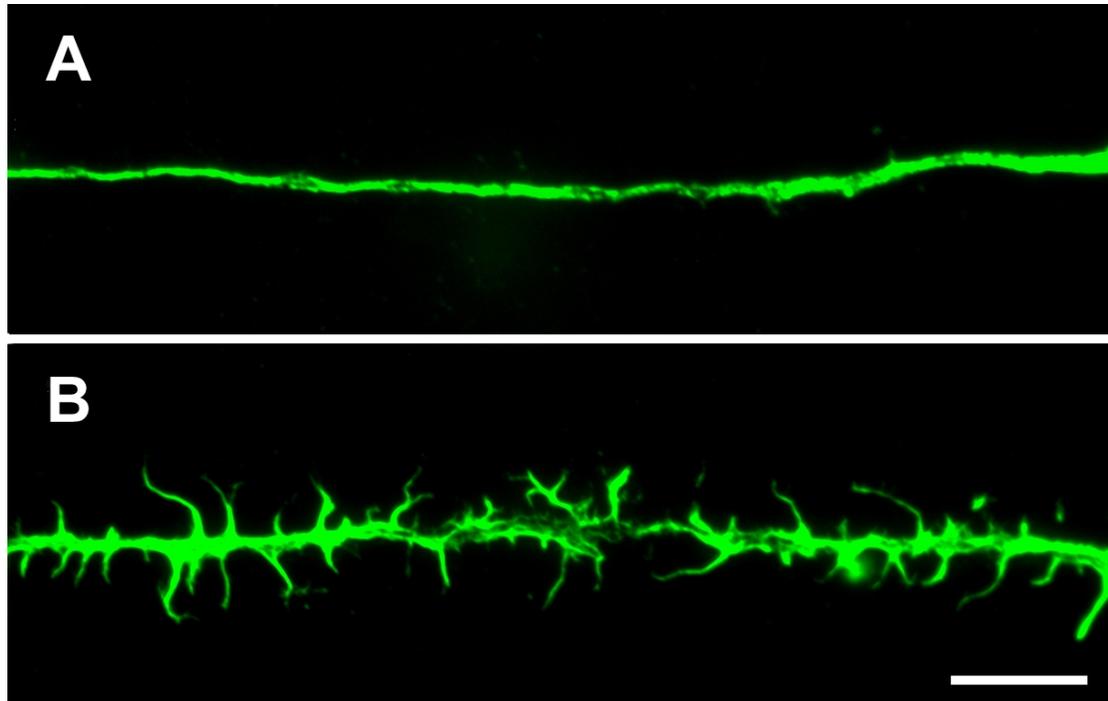


Abb. 15 Bildung von Mikrodornen auf RGC-Axonen durch anti-Agrin-Antiseren. Die Inkubation von RGC-Axonen mit anti-Agrin-Antiserum (AS 46) für 3 Std. in 1:1000-Verdünnung bewirkte im Vergleich zu Kontrollkulturen (A) die Ausbildung zahlreicher filopodienähnlicher Fortsätze (Mikrodornen) entlang der Oberfläche des Axons (B). Färbungen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (grün) zeigten, daß alle Mikrodornen Aktin-Filamente enthielten. Der Skalierungsbalken entspricht 10 μm .

5.4.2 Bildung von Mikrodornen durch aktive Reorganisation des axonalen Zytoskeletts

Um zu analysieren, ob bei der Bildung der Mikrodornen eine aktive Reorganisation des Zytoskeletts notwendig war, wurde der Einfluß von Cytochalasin D und Demecolcin auf die Bildung der Mikrodornen untersucht. Cytochalasin D inhibiert die Aktin-Polymerisation (Urbanik et al., 1989), wohingegen Demecolcin die Polymerisation von Tubulin hemmt (Nishiyama und Fujii, 1992). Sowohl Cytochalasin D als auch Demecolcin bewirkten eine im Vergleich zu Kontrollkulturen signifikante Reduktion der Mikrodornen auf der axonalen Oberfläche der RGCs (s. Abb. 16). Dabei wurde im Falle von Cytochalasin D sogar eine vollständige Hemmung der Mikrodornenbildung beobachtet.

Die Inhibition bzw. Reduktion durch Cytochalasin D bzw. Demecolcin zeigte, daß die Polymerisation von Tubulin- und vor allem Aktinfilamenten und damit die Reorganisation des axonalen Zytoskeletts notwendig für die Ausbildung der Mikrodornen durch anti-Agrin-Antiseren sind.

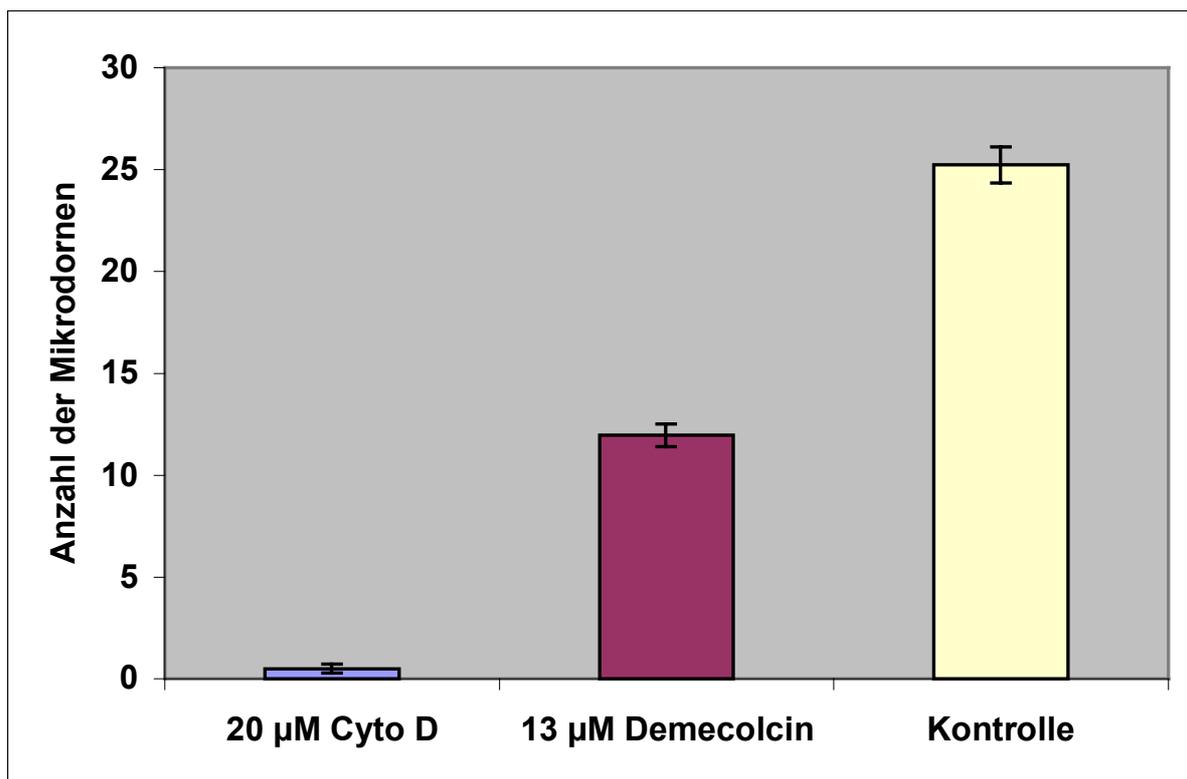


Abb. 16 Bildung von Mikrodornen durch aktive Reorganisation des Zytoskeletts. RGC-Axone wurden mit 20 µM Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation, bzw. 13 µM Demecolcin, welches die Tubulin-Polymerisation hemmt, zusammen mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:1000-Verdünnung für 3 Std. behandelt. Mikrodornen wurden nach Phalloidin-Färbung pro 110 µm-Segment gezählt. In beiden Fällen wurde eine signifikante Inhibition der Bildung von Mikrodornen beobachtet.

5.4.3 Spezifität der Mikrodornenbildung

Um die Spezifität der Mikrodornenbildung zu überprüfen, wurde eine Reihe von Kontrollen durchgeführt (s. Abb. 17). Zunächst wurde untersucht, ob verschiedene anti-Agrin-Antikörper in der Lage waren, die Ausbildung von Mikrodornen zu induzieren. Es zeigte sich, daß alle polyklonalen Antiseren, die gegen größere Teile des Agrin-Proteins gerichtet waren, Mikrodornen induzieren konnten. Die Anzahl der Mikrodornen unterschied sich dabei bei den unterschiedlichen Antiseren nur geringfügig. Antiseren gegen die NtA-Domäne oder gegen das B8- bzw. B19-Peptid der Spleißstelle B zeigten dagegen keinen Effekt. Dies legt nahe, daß Agrin-Isoformen, die diese Teilbereiche bzw. Domänen enthalten, nicht an der Ausbildung der Mikrodornen beteiligt sind. Diese Ergebnisse zeigten weiterhin, daß nicht alle anti-Agrin-Antiseren in der Lage sind, Mikrodornen zu induzieren.

Mehrere monoklonale anti-Agrin-Antikörper waren weder allein noch in Kombination in der Lage Mikrodornen zu induzieren. Fab-Fragmente eines Antiserums, das Mikrodornen induzieren konnte, zeigten ebenfalls keinen Effekt. Da Fab-Fragmente nur eine Bindungsstelle zum jeweiligen Epitop besitzen, deutet dies darauf hin, daß möglicherweise eine Kreuzvernetzung des Agrin-Proteins für die Induktion der Mikrodornen notwendig ist. Abschließend zeigte sich, daß weder Präimmunseren der verschiedenen anti-Agrin-Antiseren noch Antikörper gegen andere zum Teil ebenfalls axonal lokalisierte Proteine wie α -Dystroglykan, β 1-Integrin und Thy-1 in der Lage waren, Mikrodornen zu induzieren. Dies legt nahe, daß der hier beobachtete Effekt direkt durch anti-Agrin-Antikörper im Antiserum vermittelt wird und nicht durch einen Sekundäreffekt anderer Antikörper in den jeweiligen Antiseren.

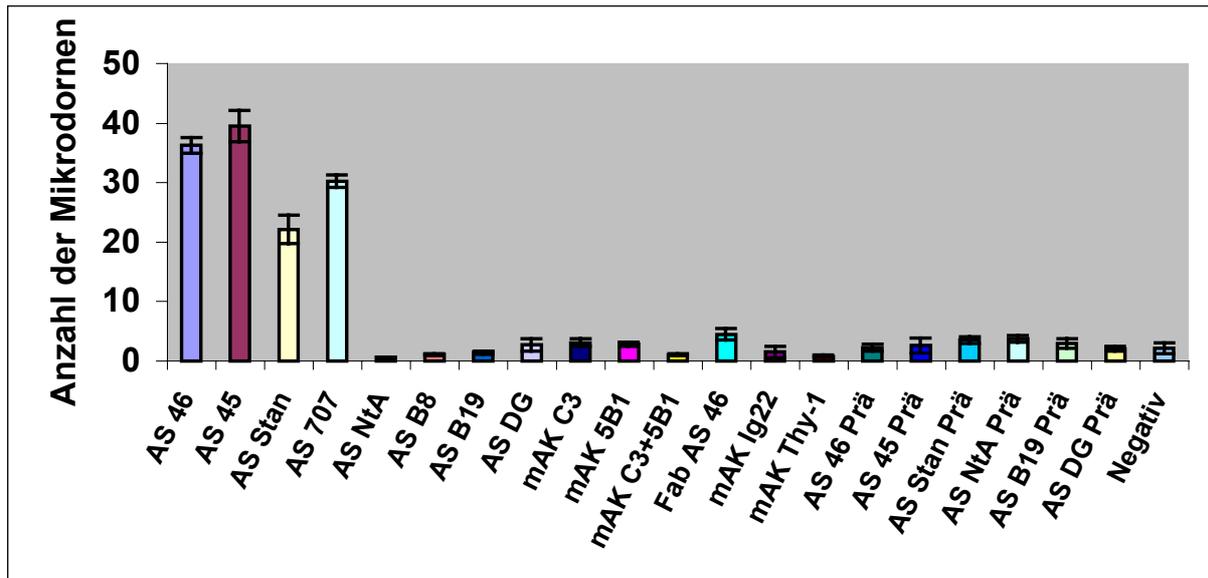


Abb. 17 Induktion von Mikrodoernen durch verschiedene anti-Agrin-Antiseren. RGC-Axone wurden mit verschiedenen Antikörpern bzw. Präimmunsereen für 3 Std. in 1:100-Verdünnung inkubiert und die Anzahl der induzierten Mikrodoernen nach Phalloidin-Färbung pro 110 µm-Segment gezählt. Verschiedene anti-Agrin-Antiseren (AS 46, AS 45, AS Stan, AS 707) waren in der Lage, Mikrodoernen zu induzieren. Lediglich anti-Agrin-Antiseren, die gegen kleinere Bereiche des Moleküls gerichtet waren (AS NtA, AS B8, AS B19), blieben inaktiv. Außerdem zeigten weder monoklonale Antikörper (mAK 5B1, mAK C3) noch Fab-Fragmente (Fab AS 46) einen Effekt. Die Tatsache, daß weder die verschiedenen Präimmunsereen (Prä) noch Antikörper gegen andere teilweise axonal exprimierte Proteine (AS DG, mAK Ig22, mAK Thy-1) Mikrodoernen induzieren konnten, deutete auf einen Primäreffekt der anti-Agrin-Antikörper im Serum und nicht auf einen Sekundäreffekt anderer Antikörper.

Als weiteres Kriterium für die Spezifität wurde die Bildung der Mikrodoernen durch Antikörper mit dem Antigen kompetitiert. Dazu wurde das anti-Agrin-Antiserum mit Agrin-Protein aus transfizierten HEK-293-Zellen (Agrin CBA-1 4/8) präinkubiert, bevor die RGC-Axone mit diesem Gemisch behandelt wurden. Im Vergleich zu Kontrollkulturen, bei denen das Antiserum nicht mit Agrin präinkubiert wurde, zeigte sich eine beinahe vollständige Hemmung (s. Abb. 18). Die Bildung von Mikrodoernen ist daher tatsächlich ein Primäreffekt der anti-Agrin-Antikörper und nicht etwa ein Sekundäreffekt anderer Antikörper im Antiserum.

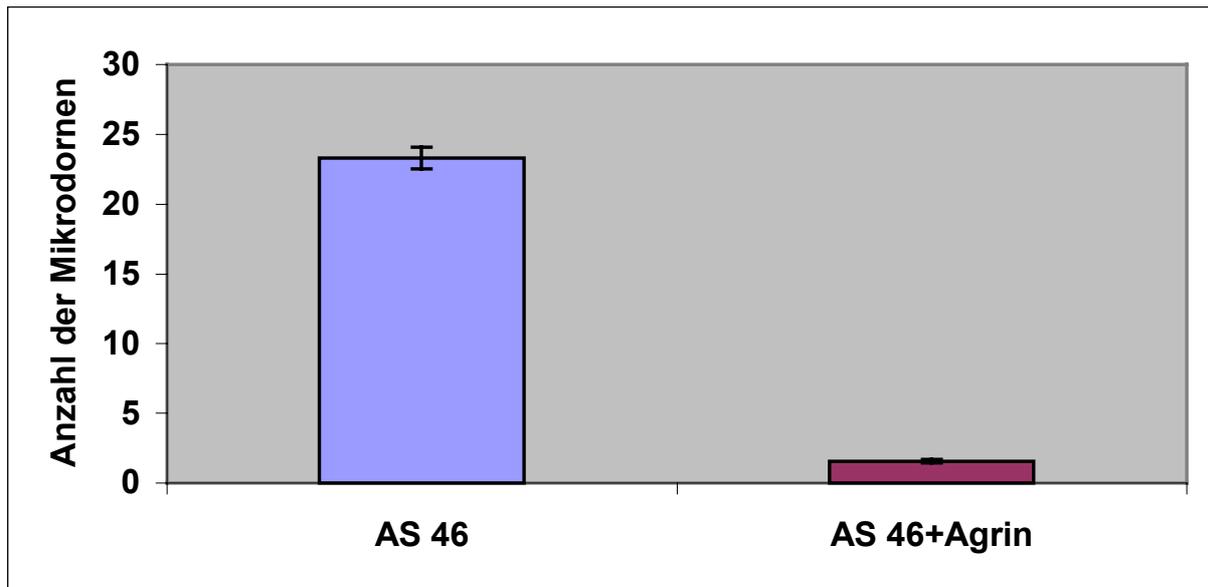


Abb. 18 Spezifität der Ausbildung von Mikrodornen durch anti-Agrin-Antikörper im Antiserum. Anti-Agrin-Antiserum (AS 46) wurde 1 Std. mit Agrin aus transfizierten HEK-293-Zellen präinkubiert und blockiert. Danach wurden RGC-Axone für 3 Std. mit dem blockierten Antiserum in 1:1000-Verdünnung behandelt und die Anzahl der Mikrodornen nach Phalloidin-Färbung pro 110 µm-Segment gezählt (AS 46+Agrin). Das Blockieren von anti-Agrin-Antikörpern im Antiserum führte zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Bildung von Mikrodornen im Vergleich zu Kontrollkulturen (AS 46).

5.4.4 Bildung von Mikrodornen ist konzentrations- und zeitabhängig

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der durch anti-Agrin-Antiseren induzierten Bildung von Mikrodornen wurden Kulturen von RGCs mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antiserums inkubiert. Da die genaue Konzentration der anti-Agrin-Antikörper im Antiserum nicht bekannt war, wurde als Maß für die Konzentration ein Verdünnungsfaktor, der dem inversen Wert der Verdünnung entsprach, eingeführt. So entsprach z.B. eine 1:100-Verdünnung einem Verdünnungsfaktor von $1/100$, also 0,01. Es zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von Mikrodornen und zudem eine Sättigung bei höheren Antiserum-Konzentrationen. Die halbmaximale Aktivität wurde bei einer Verdünnung des Antiserums von ungefähr 1:5000 erreicht, eine Sättigung etwa bei einer Verdünnung von 1:100 (s. Abb. 19).

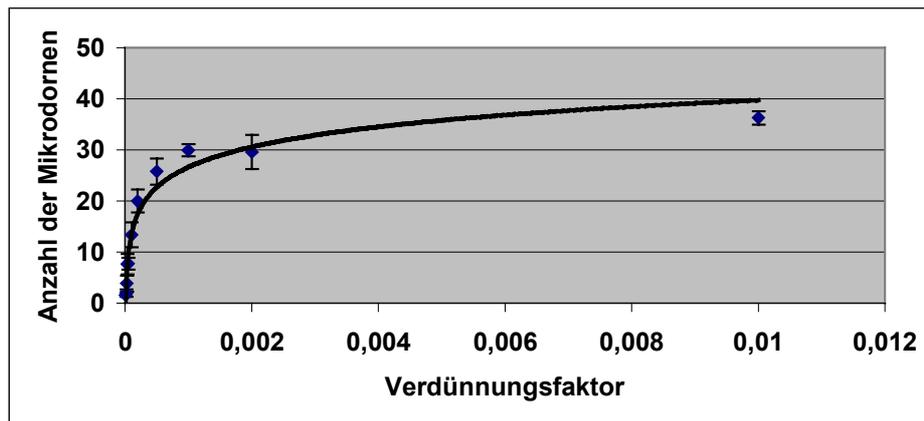


Abb. 19 Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von Mikrodornen durch anti-Agrin-Antiseren. RGC-Axone wurden 3 Std. mit unterschiedlichen Konzentrationen des anti-Agrin-Antiserums (AS 46) inkubiert und nach Phalloidin-Färbung die Anzahl der Mikrodornen pro 110 μm -Segment bestimmt. Die halbmaximale Aktivität lag etwa bei einer Verdünnung von 1:5000. Eine Sättigung wurde etwa bei einer Verdünnung von 1:100 erreicht.

Die Zeitabhängigkeit der Bildung von Mikrodornen wurde bestimmt, indem die Kulturen unterschiedlich lange mit dem anti-Agrin-Antiserum inkubiert und nach Fixierung die Anzahl der Mikrodornen pro Axonsegment bestimmt wurde. Die Inkubationszeit der Kulturen mit dem Antiserum lag dabei zwischen 1 Min. und 6 Std. Die Bildung von Mikrodornen war eindeutig zeitabhängig, wobei sich erste Mikrodornen bereits innerhalb weniger Minuten bildeten. Die maximale Anzahl wurde nach etwa 3 Std. erreicht (s. Abb. 20). Auch bei längeren Inkubationszeiten über Nacht wurde keine Zunahme in der Anzahl der Mikrodornen beobachtet. Die maximale Anzahl von Mikrodornen pro 110 μm -Axonsegment betrug etwa 30.

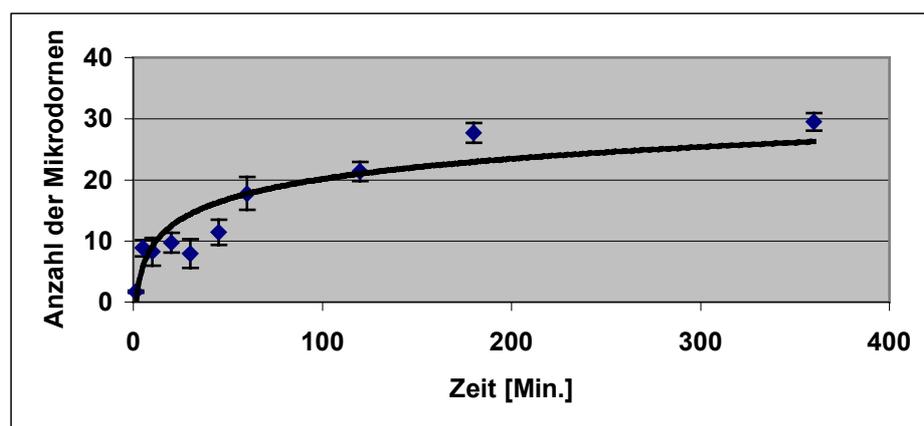


Abb. 20 Zeitabhängigkeit der Bildung von Mikrodornen durch anti-Agrin-Antiseren. RGC-Axone wurden unterschiedlich lange mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:1000-Verdünnung inkubiert und nach Phalloidin-Färbung die Anzahl der Mikrodornen pro 110 μm -Segment bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Zeitabhängigkeit. Eine maximale Anzahl von Mikrodornen wurde nach ca. 3 Std. erreicht.

5.4.5 Substratabhängigkeit der Bildung von Mikrodornen

RGC-Axone wurden in allen bisher beschriebenen Experimenten auf Basalmembranen kultiviert. Die Basalmembran stellt ein komplexes Substrat dar und enthält neben Laminin und Agrin eine Reihe weiterer Extrazellulärmatrixmoleküle. Sie eignet sich daher ausgezeichnet für das Wachstum von Axonen *in vitro* (Halfter et al., 1987). Um zu analysieren, ob die Bildung der Mikrodornen substratabhängig oder ob der Effekt auch auf einem anderen Substrat zu beobachten war, wurden RGC-Axone auf mit poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Oberflächen kultiviert. Wie auf Basalmembranen konnte die Inkubation mit dem anti-Agrin-Antiserum auch auf diesem Substrat eine Bildung von Mikrodornen auf RGC-Axonen induzieren, wenngleich deren Anzahl hier deutlich geringer war (s. Abb. 21). Diese Ergebnisse machten deutlich, daß die Bildung der Mikrodornen unabhängig vom verwendeten Substrat ist. Jedoch induziert das anti-Agrin-Antiserum auf RGC-Axonen, die auf Basalmembranen kultiviert wurden, eine höhere Zahl von Mikrodornen.

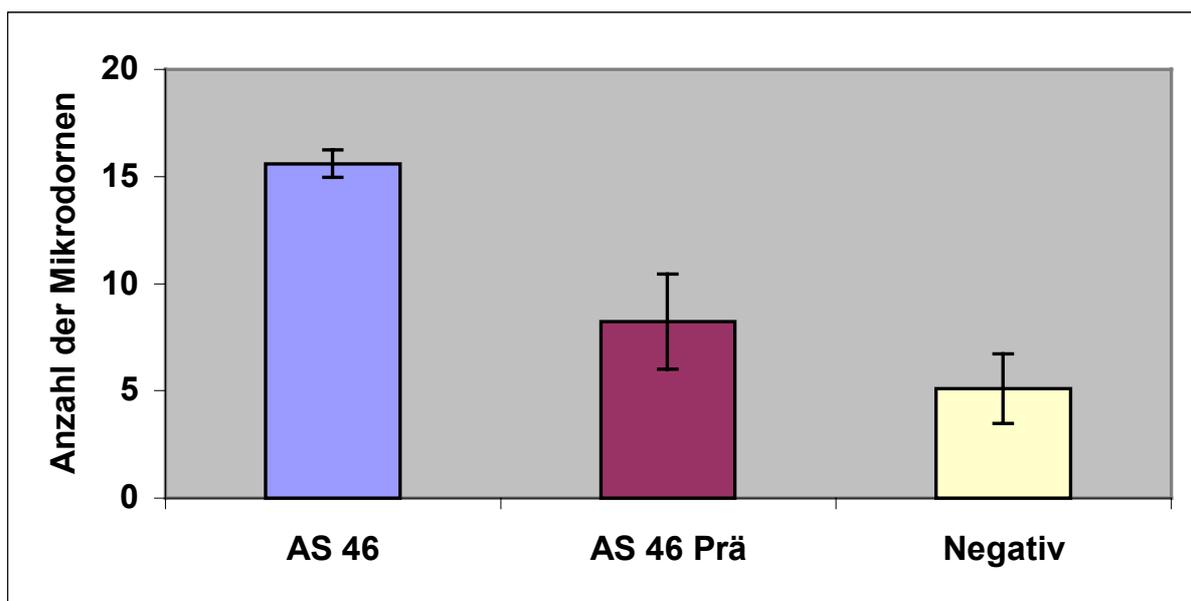


Abb. 21 Bildung von Mikrodornen ist nicht substratabhängig. RGC-Axone wurden auf Poly-D-Lysin/Laminin beschichteten Oberflächen kultiviert und für 3 Std. mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:1000-Verdünnung inkubiert. Nach Phalloidin-Färbung wurde die Anzahl der Mikrodornen pro 110 µm-Segment bestimmt. Es zeigte sich eine im Vergleich zu mit Präimmenserum (AS 46 Prä) oder ohne Antikörper (Negativ) behandelten Kontrollkulturen signifikante Anzahl von Mikrodornen.

5.4.6 Bildung von Mikrodornen auf Axonen anderer Neuronentypen

Eine wichtige Frage war, ob die auf RGC-Axonen beobachtete Bildung von Mikrodornen durch anti-Agrin-Antiseren auch auf Axonen anderer Neuronentypen des ZNS und PNS induziert werden kann. Deshalb wurden Axone von tecto-bulbären Neuronen unter den gleichen Bedingungen wie RGCs kultiviert und mit dem anti-Agrin-Antiserum behandelt. Nach Fixierung und Phalloidin-Färbung zeigte sich auch bei diesem Neuronentyp eine Bildung von Mikrodornen, die sich sowohl in ihrer Anzahl als auch in ihrer Morphologie kaum von Mikrodornen auf RGC-Axonen unterschieden (s. Abb. 22). Die Bildung von Mikrodornen ist also nicht auf RGCs beschränkt.

Um zu untersuchen, ob auch Neurone des PNS in der Lage waren, Mikrodornen zu bilden, wurden sowohl Axone von Hinterwurzelganglienneuronen (DRG-Neurone) als auch von Neuronen sympathischer Ganglien (SG-Neurone) unter gleichen Bedingungen kultiviert. Bei beiden peripheren Neuronentypen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Zunahme der Anzahl der Mikrodornen nach Behandlung mit dem anti-Agrin-Antiserum. Die Morphologie der Mikrodornen auf Axonen von PNS-Neuronen unterschied sich nicht von denen des ZNS. Allerdings war die Zahl der Mikrodornen bei PNS-Neuronen ca. 3 bis 4 mal niedriger als bei ZNS-Neuronen (s. Abb. 22). Obwohl PNS-Neurone also grundsätzlich in der Lage sind, Mikrodornen auszubilden, ist dieser Effekt bei gleichen Antikörperkonzentrationen jedoch geringer als im ZNS. Bei Kulturen von nicht-neuronalen Zellen wie beispielsweise Muskelfasern wurde nach Behandlung mit anti-Agrin-Antiseren kein Effekt beobachtet. Die Bildung von Mikrodornen ist also keine allgemeine Antwort von Zellen auf anti-Agrin-Antikörper.

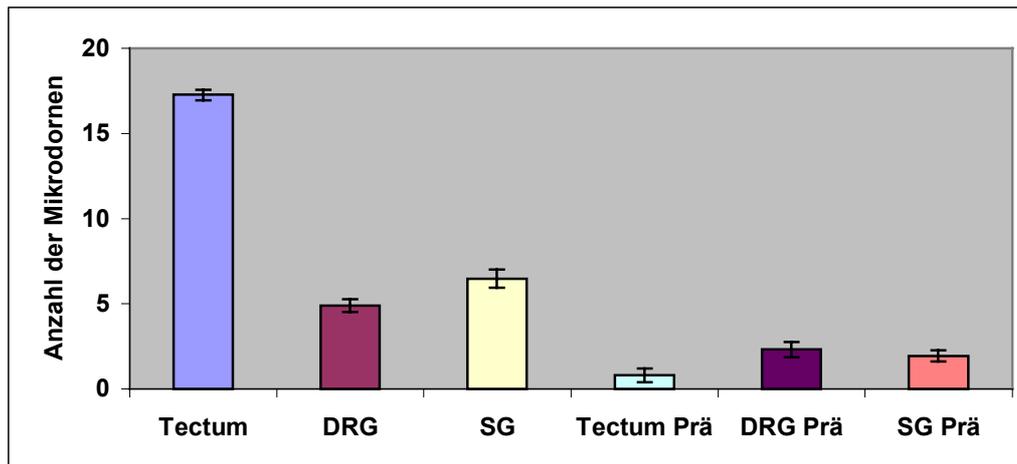


Abb. 22 Bildung von Mikrospinnen auf Axonen verschiedener Neuronentypen. Axone von tectobulbären Neuronen (Tectum) sowie Neuronen des Hinterwurzelganglions (DRG) und des sympathischen Ganglions (SG) wurden kultiviert und 3 Std. mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:100-Verdünnung sowie mit Präimmunsereum behandelt. Nach Phalloidin-Färbung zeigte sich pro 110 µm-Segment bei allen Neuronentypen eine signifikante Bildung von Mikrospinnen im Vergleich zu Kontrollkulturen, die mit Präimmunsereum behandelt wurden (Prä). Allerdings war die Anzahl der Mikrospinnen auf Axonen von ZNS-Neuronen (Tectum) ca. 3 bis 4 mal höher als von PNS-Neuronen (DRG, SG).

5.4.7 Zeitraffer-Videomikroskopie der Mikrospinnenbildung

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte nicht geklärt werden, ob die untersuchten Mikrospinnen dynamisch oder eher statisch waren. Um dies zu untersuchen wurden wachsende RGC-Axone kurz vor und längere Zeit nach der Zugabe des anti-Agrin-Antiserums mit Hilfe von Zeitraffer-Videomikroskopie untersucht (s. Abb. 23). Die Aufnahmen zeigten deutlich, daß sich die ersten Mikrospinnen bereits wenige Minuten nach Zugabe des Antiserums bildeten. Die gebildeten Mikrospinnen zeigten außerdem ein hohes Maß an Dynamik, wobei sie zwischenzeitlich ihre Länge änderten oder teilweise wieder weitgehend zurückgezogen wurden. Einige Mikrospinnen bildeten außerdem zwischenzeitlich Strukturen aus, die morphologisch kleineren Wachstumskegeln glichen (Pfeile in Abb. 23). Diese transient gebildeten wachstumskegelartigen Strukturen wuchsen allerdings nicht weiter als etwa 20 µm und wurden nicht stabilisiert, sondern vielmehr innerhalb kürzester Zeit wieder zurückgebildet. Eine weitere morphologische Veränderung betraf den primären Wachstumskegel. Etwa 1 Std. nach Antikörperzugabe war eine deutliche Vergrößerung der Fläche und damit der Lamellipodien zu beobachten.

Die Ergebnisse der Zeitraffervideomikroskopie machten deutlich, daß die Mikrospinnen tatsächlich nicht statisch, sondern vielmehr hochgradig dynamisch sind und außerdem morphologisch transient eine Ähnlichkeit mit wachstumskegelartigen Strukturen wie z.B. Filopodien aufweisen.

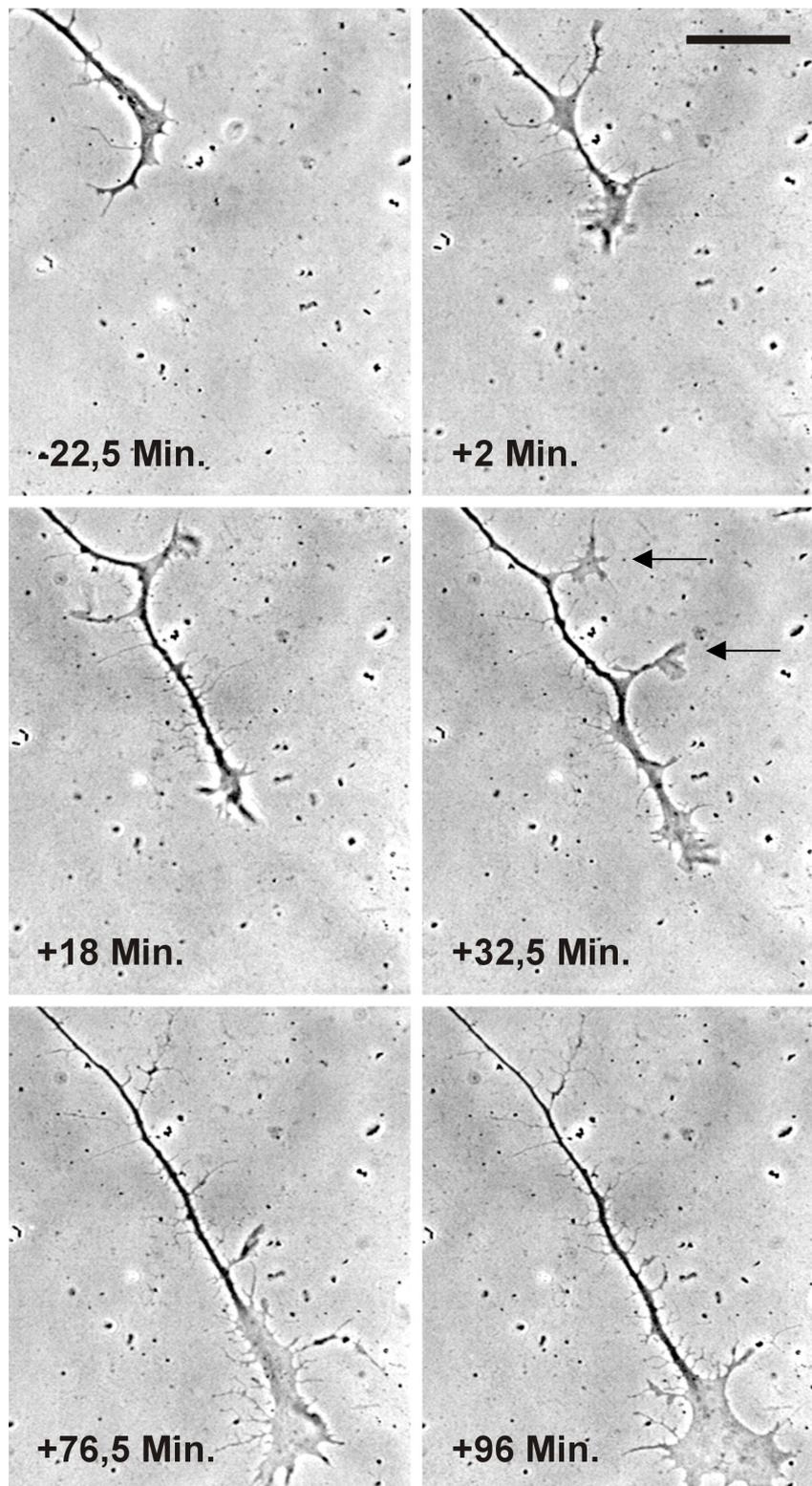


Abb. 23 Zeitraffer-Videomikroskopie von wachsenden RGC-Axonen nach Behandlung mit anti-Agrin-Antisera. RGC-Axone wurden mit anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:1000-Verdünnung behandelt. Erste Mikrodornen bildeten sich wenige Minuten nach Zugabe des Antiserums. Die Mikrodornen besaßen ein hohes Maß an Dynamik und bildeten teilweise zwischenzeitlich wachstumskegelartige Strukturen aus (s. Pfeile). Außerdem wurde eine Zunahme der Wachstumskegelgröße beobachtet. Der Skalierungsbalken entspricht 20 μm .

5.4.8 Molekulare Zusammensetzung der Mikrodornen

Die Zeitraffer-Videomikroskopie zeigte, daß zumindest einige der gebildeten Mikrodornen transient wachstumskegelartige Strukturen ausbildeten. Die Mikrodornen besaßen weiterhin eine morphologische Ähnlichkeit mit Filopodien. Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen stellte sich deshalb die Frage, ob die induzierten Mikrodornen auch eine molekulare Ähnlichkeit zu Filopodien besaßen. Um dies zu untersuchen, wurden Mikrodornen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin sowie mit monoklonalen Antikörpern gegen Proteine doppelgefärbt, die entweder auf Filopodien von Wachstumskegeln lokalisiert sind wie Synaptotagmin und GAP-43 (Meiri et al., 1986; Vanselow et al., 1991; Hering und Kröger, 1996; Kabayama et al., 1999), oder die sich nur auf Axonen bzw. im zentralen Bereich des Wachstumskegels befinden wie Neurofilament 68 (NF 68) und β -Tubulin (Rivas et al., 1992; Tang und Goldberg, 2000). Immunreaktivität für Neurofilament 68 und β -Tubulin war fast ausschließlich im Axon und nicht in den Mikrodornen zu finden (Abb. 25 A-B). Das präsynaptische Protein Synaptotagmin (Perin et al., 1990; Südhof, 1995) und das auf wachsenden Axonen und Wachstumskegeln lokalisierte Protein GAP-43 (Meiri et al., 1986) konnten zumindest auf einem Teil der Mikrodornen nachgewiesen werden (s. Pfeile in Abb. 25 C-D). Da beide Proteine auch auf Filopodien von Wachstumskegeln lokalisiert sind (Meiri et al., 1986; Vanselow et al., 1991; Hering und Kröger, 1996; Kabayama et al., 1999), bestätigte dies die Vermutung, daß die beobachteten Mikrodornen eine molekulare Verwandtschaft mit Filopodien aufweisen.

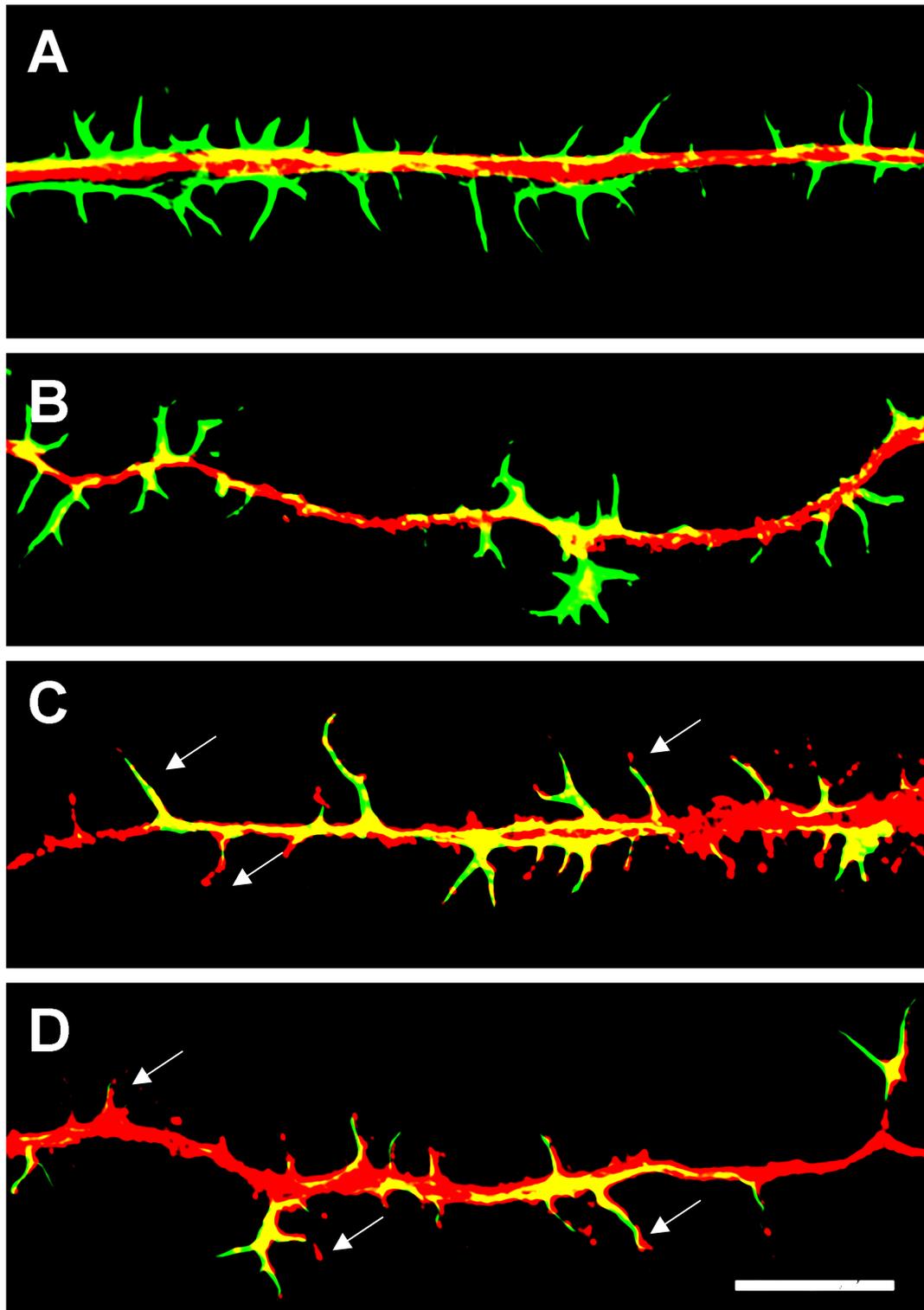


Abb. 24 Molekulare Zusammensetzung von Mikrodornen. RGC-Axone wurden mit anti-Agrin-Antiserum (AS 46) für 3 Std. in 1:1000-Verdünnung behandelt und mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (grün) sowie monoklonalen Antikörpern gegen Neurofilament 68 (NF 68) (A), β -Tubulin (B), Synaptotagmin (C) sowie GAP-43 (D) gefärbt (jeweils rot). Während NF 68 und β -Tubulin kaum Immunreaktivität im Bereich der Mikrodornen zeigten (klare Trennung von roter und grüner Fluoreszenz), waren Synaptotagmin und GAP-43 zumindest in einigen Mikrodornen (s. Pfeile) lokalisiert (rote bzw. gelbe Fluoreszenz aufgrund Kolo­kalisation von Aktin und Synaptotagmin/GAP-43). Der Skalierungsbalken entspricht 10 μ m.

5.4.9 Abhängigkeit der Mikrodornbildung von intrazellulärem Kalzium

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration spielt eine wichtige Rolle bei den verschiedensten physiologischen Prozessen und ist insbesondere essentiell bei strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts. Außerdem ist intrazelluläres Kalzium notwendig für die durch Agrin induzierte Aggregation von AChR *in vitro* auf kultivierten Muskelfasern (Wallace, 1988). Da die Bildung von Mikrodornen von einer Reorganisation des axonalen Zytoskeletts begleitet und außerdem durch Agrin vermittelt wird, stellte sich die Frage, ob intrazelluläres Kalzium auch für diesen Prozeß notwendig ist.

Um dies zu untersuchen, wurden deshalb RGC-Axone 1 Std. mit BAPTA-AM in verschiedenen Konzentrationen präinkubiert. BAPTA-AM, ein Acetoxymethylester-Derivat von BAPTA, ist membrangängig und wird intrazellulär von ubiquitären Esterasen in BAPTA gespalten. BAPTA wiederum ist ein starker Kalzium-Chelator, der intrazelluläres Kalzium irreversibel bindet und dadurch kalziumabhängige Prozesse blockiert (Tsien, 1980). Die Präinkubationen mit BAPTA-AM bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Bildung von Mikrodornen nach Zugabe des anti-Agrin-Antiserums. Bei höheren BAPTA-AM-Konzentrationen wurde deren Bildung sogar nahezu vollständig unterbunden (s. Abb. 25). Dieses Ergebnis zeigte, daß Kalzium eine Rolle bei der durch anti-Agrin-Antiseren vermittelten Bildung von Mikrodornen und der damit verbundenen Reorganisation des Zytoskeletts spielt.

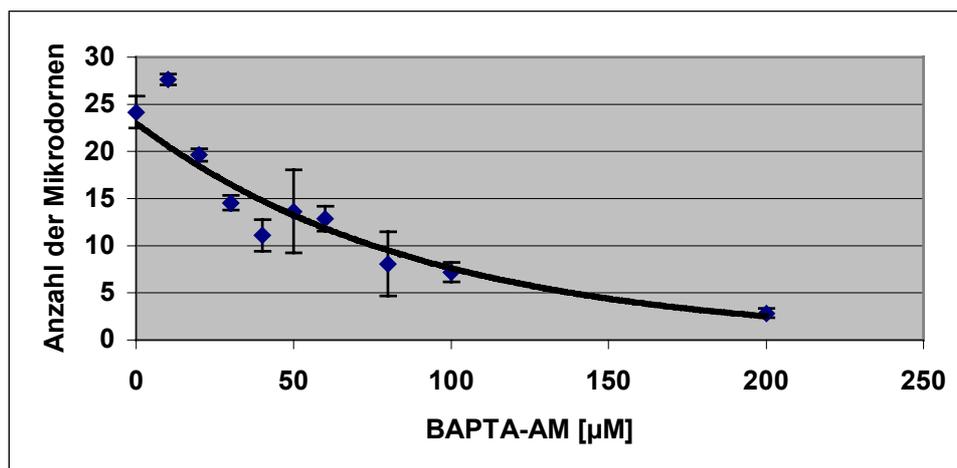


Abb. 25 Abhängigkeit der Bildung von Mikrodornen von intrazellulärem Kalzium. RGC-Axone wurden 1 Std. mit verschiedenen Konzentrationen von BAPTA-AM präinkubiert und anschließend mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) für 3 Std. in 1:1000-Verdünnung behandelt. Das Auszählen nach Phalloidininfärbung pro 110 µm-Segment zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bildung von Mikrodornen.

Eine Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann entweder durch die Kalzium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgen oder durch einen Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum. Ein Einstrom von Kalzium aus dem Medium durch Kalziumkanäle kann mit Kobalt(II)chlorid blockiert werden (Hille, 1992). Um zu untersuchen, ob bei der Bildung von Mikrodornen ein Einstrom von extrazellulärem Kalzium durch Kalziumkanäle eine Rolle spielt, wurden RGC-Axone gleichzeitig mit dem anti-Agrin-Antiserum und 2 mM Kobalt(II)chlorid inkubiert. Diese Inkubation führte zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der Mikrodornen im Vergleich zu Kontrollkulturen. Allerdings konnte keine vollständige Inhibition wie bei höheren BAPTA-AM-Konzentrationen beobachtet werden (s. Abb. 26). Es ist daher davon auszugehen, daß sowohl intrazellulär gespeichertes Kalzium, als auch ein Einstrom von extrazellulärem Kalzium bei der durch TM-Agrin vermittelten Bildung von Mikrodornen eine wichtige Rolle spielen.

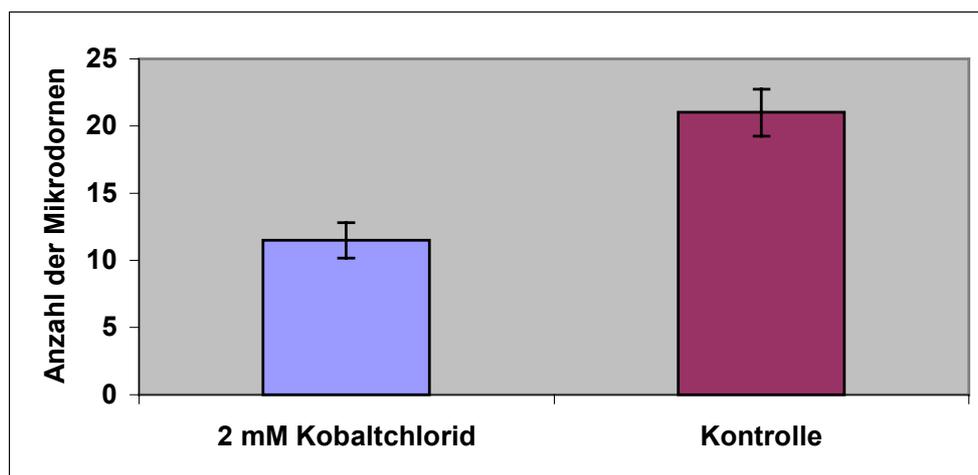


Abb. 26 Abhängigkeit der Bildung von Mikrodornen von extrazellulärem Kalzium. RGC-Axone wurden 3 Std. mit 2 mM Kobaltchlorid zusammen mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:1000-Verdünnung inkubiert. Das Auszählen nach Phalloidininfärbung pro 110 µm-Segment zeigte eine Verminderung der Anzahl der Mikrodornen.

5.4.10 Rolle von Proteinkinase C, Tyrosin-Phosphatasen und Heparin bei der Bildung von Mikrodoernen

Proteinkinasen und Proteinphosphatasen spielen eine wichtige Rolle bei kalziumabhängigen intrazellulären Signaltransduktionsprozessen. Auch die durch Agrin vermittelte AChR-Aggregation an der NMJ ist abhängig von Proteinkinasen wie der Proteinkinase C (PKC) und Tyrosin-Phosphatasen (Wallace 1994, 1995; Meier et al., 1995). Daneben bewirkt das Polyanion Heparin eine Inhibition der Agrin-induzierten AChR-Aggregation auf kultivierten Muskelfasern (Wallace, 1990). Es stellte sich deshalb die Frage, ob möglicherweise auch die durch TM-Agrin vermittelte Bildung von Mikrodoernen von Proteinkinasen, Proteinphosphatasen oder Heparin abhängig ist.

Die Aktivität der Proteinkinase C kann selektiv durch Staurosporin inhibiert werden (Ruegg und Burgess, 1989). RGC-Axone wurden deshalb vor der Behandlung mit dem anti-Agrin-Antiserum mit verschiedenen Konzentrationen Staurosporin behandelt. Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigte sich jedoch keine signifikante Abnahme der Anzahl der Mikrodoernen (s. Abb. 27). Dies machte deutlich, daß eine Hemmung der PKC keinen Einfluß auf die Bildung der Mikrodoernen hat.

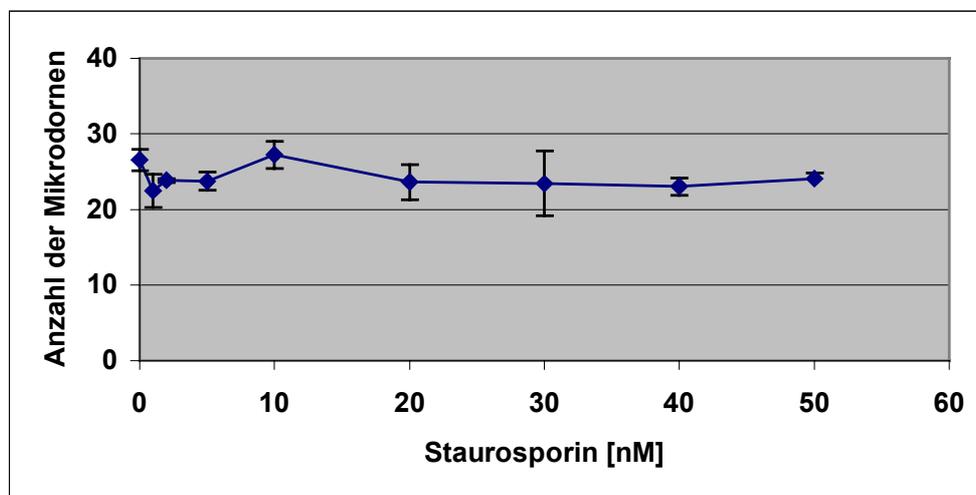


Abb. 27 Rolle von Proteinkinase C (PKC) bei der Bildung von Mikrodoernen. RGC-Axone wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin 10 Min. präinkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:1000-Verdünnung behandelt und die Mikrodoernen nach Phalloidin-Färbung pro 110 µm-Segment ausgezählt. Es zeigte sich kein Einfluß von Staurosporin auf die Bildung von Mikrodoernen.

Um eine Abhängigkeit der Bildung von Mikrodornen von Tyrosinphosphatasen zu untersuchen, wurden RGC-Axone vor der Zugabe des anti-Agrin-Antiserums mit Pervanadat behandelt. Pervanadat inhibiert selektiv die Aktivität von Tyrosinphosphatasen (Pumiglia et al., 1992). Auch in diesem Fall war kein Einfluß auf die Bildung der Mikrodornen zu beobachten (s. Abb. 28).

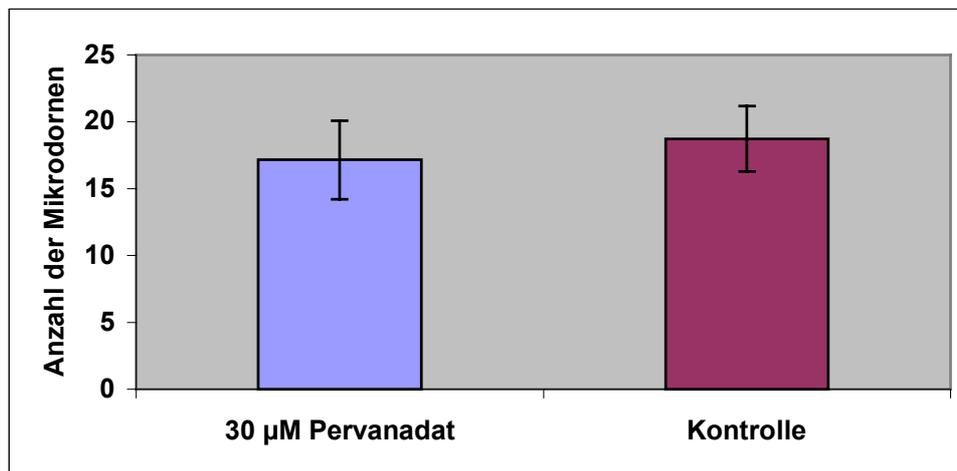


Abb. 28 Rolle von Tyrosin-Phosphatasen bei der Bildung von Mikrodornen. RGC-Axone wurden mit 30 µM Pervanadat 10 Min. präinkubiert. Anschließend wurden die Kulturen mit dem anti-Agrin-Antiserum (AS 46) in 1:1000-Verdünnung behandelt und die Mikrodornen nach Phalloidin-Färbung pro 110 µm-Segment ausgezählt. Es zeigte sich kein Einfluß von Pervanadat auf die Bildung von Mikrodornen.

Schließlich wurde ein möglicher Einfluß des Polyanions Heparin analysiert. RGC-Kulturen wurden zusammen mit dem anti-Agrin-Antiserum mit verschiedenen Konzentrationen von Heparin inkubiert. Auch im Falle von Heparin war dabei kein eindeutiger Einfluß zu beobachten (s. Abb. 29).

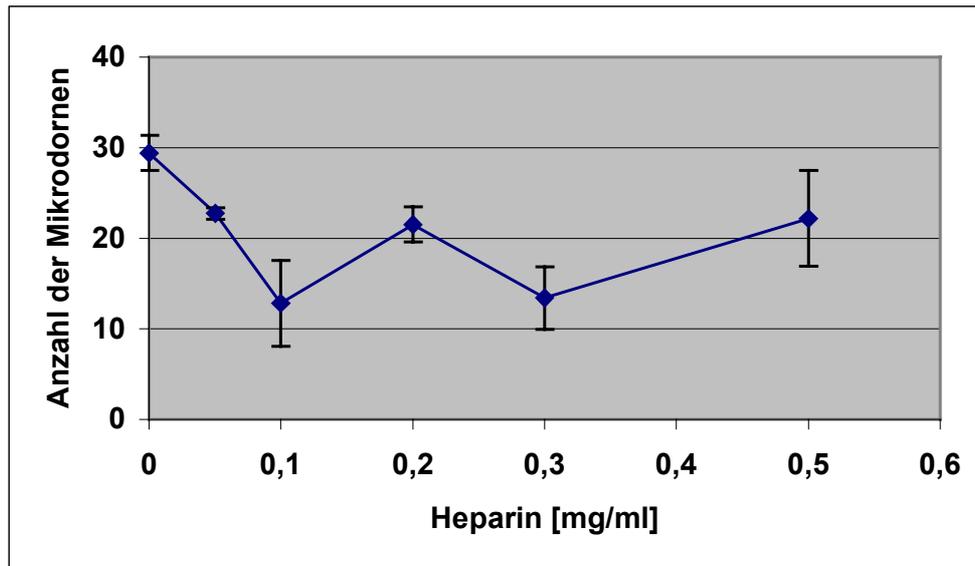


Abb. 29 Rolle von Heparin bei der Bildung von Mikrodoernen. RGC-Axone wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Heparin 3 Std. zusammen mit dem anti-Agrin-Antiserum in 1:1000-Verdünnung inkubiert und die Mikrodoernen nach Phalloidin-Färbung pro 110 μm -Segment ausgezählt. Es zeigte sich kein eindeutiger Einfluß von Heparin auf die Bildung von Mikrodoernen.

Die beschriebenen Experimente mit Staurosporin, Pervanadat und Heparin zeigten, daß weder eine Hemmung der Proteinkinase C oder von Tyrosinphosphatasen noch eine Bindung von Heparin an Agrin einen Einfluß auf die Bildung von Mikrodoernen haben. Da die Agrin-induzierte AChR-Aggregation an der NMJ jedoch von diesen Faktoren beeinflußt wird, ist davon auszugehen, daß sich die intrazellulären Signaltransduktionskaskaden beider Prozesse unterscheiden. Offensichtlich aktivieren also das an der NMJ sekretierte NtA-Agrin und das im ZNS exprimierte TM-Agrin unterschiedliche intrazelluläre Effektoren, die dann zu unterschiedlichen physiologischen Effekten führen.

5.4.11 Induktion von Mikrodoernen durch einen potentiellen Liganden von Transmembran-Agrin

Die Beobachtung, daß anti-Agrin-Fab-Fragmente nicht in der Lage waren, Mikrodoernen auf Axonen zu induzieren, legt nahe, daß eine Kreuzvernetzung bzw. Di- oder Multimerisierung von TM-Agrin auf der axonalen Oberfläche für diesen Effekt notwendig ist (s. Abschnitt 5.4.3). Eine solche Kreuzvernetzung von TM-Agrin könnte aber theoretisch nicht nur von einem Antikörper induziert werden, sondern ebenfalls von einem noch unbekanntem physiologisch wirksamen Liganden. In diesem Fall würde TM-Agrin als Rezeptor fungieren, der vom Antikörper lediglich artifiziell aktiviert wird. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde ein Extrakt aus membranassoziierten Proteinen aus dem

Hühnerhirn hergestellt, der anstelle des anti-Agrin-Antiserums TM-Agrin aktivieren sollte. Die Inkubation von RGC-Axonen mit 66 $\mu\text{g/ml}$ Gesamtprotein über Nacht bewirkte dabei eine deutliche Bildung von Mikrodornen. Die Anzahl der Mikrodornen pro Axonsegment war im Vergleich zur antikörperinduzierten Bildung allerdings geringer (s. Abb. 30). Möglichwerweise war dies auf eine geringe Konzentration des potentiellen Liganden von TM-Agrin im Proteinextrakt zurückzuführen.

Die hier beschriebenen Experimente bestätigten also die Hypothese, daß die Bildung von Mikrodornen physiologisch durch die Bindung eines noch unbekanntes Liganden an TM-Agrin auf der axonalen Oberfläche induziert werden kann.

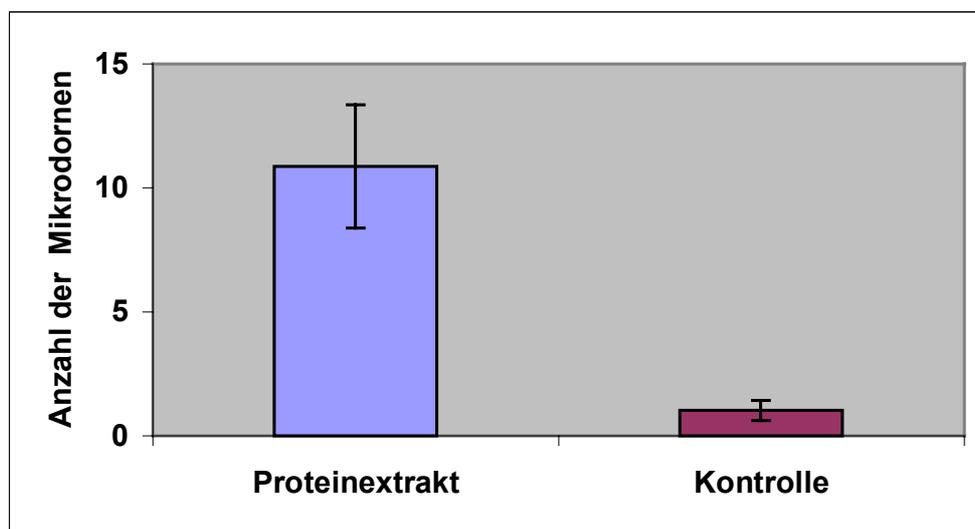


Abb. 30 Induktion von Mikrodornen durch einen potentiellen Liganden von TM-Agrin. RGC-Axone wurden über Nacht mit 66 $\mu\text{g/ml}$ eines membranhaltigen Proteinextraktes aus dem Hühnerhirn behandelt und die Mikrodornen nach Phalloidin-Färbung pro 110 μm -Segment ausgezählt. Es ergab sich eine im Vergleich zu nicht mit dem Proteinextrakt behandelten Kontrollkulturen signifikante Zunahme der Anzahl von Mikrodornen.

5.4.12 Größenvergleich der Mikrodoernen

Im folgenden Experiment sollte abschließend die Länge der Mikrodoernen auf verschiedenen Neuronentypen des ZNS und PNS untersucht werden. Alle in dieser Arbeit untersuchten Mikrodoernen hatten eine durchschnittliche Länge zwischen 4,0 und 4,5 μm (s. Abb. 31). Es war also kein signifikanter Längenunterschied zwischen den antikörperinduzierten Mikrodoernen auf Axonen unterschiedlicher Neuronentypen des ZNS und PNS festzustellen. Außerdem zeigten auch die durch den Proteinextrakt, also durch einen potentiellen Liganden von TM-Agrin auf RGC-Axonen induzierten Mikrodoernen, eine vergleichbare Länge. Da auch morphologisch keine Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit beschriebenen Mikrodoernen beobachtet wurden, ist davon auszugehen, daß es sich hier in allen Fällen um dieselbe zelluläre Struktur handelt, die voraussichtlich durch ähnliche zelluläre Mechanismen induziert werden kann.

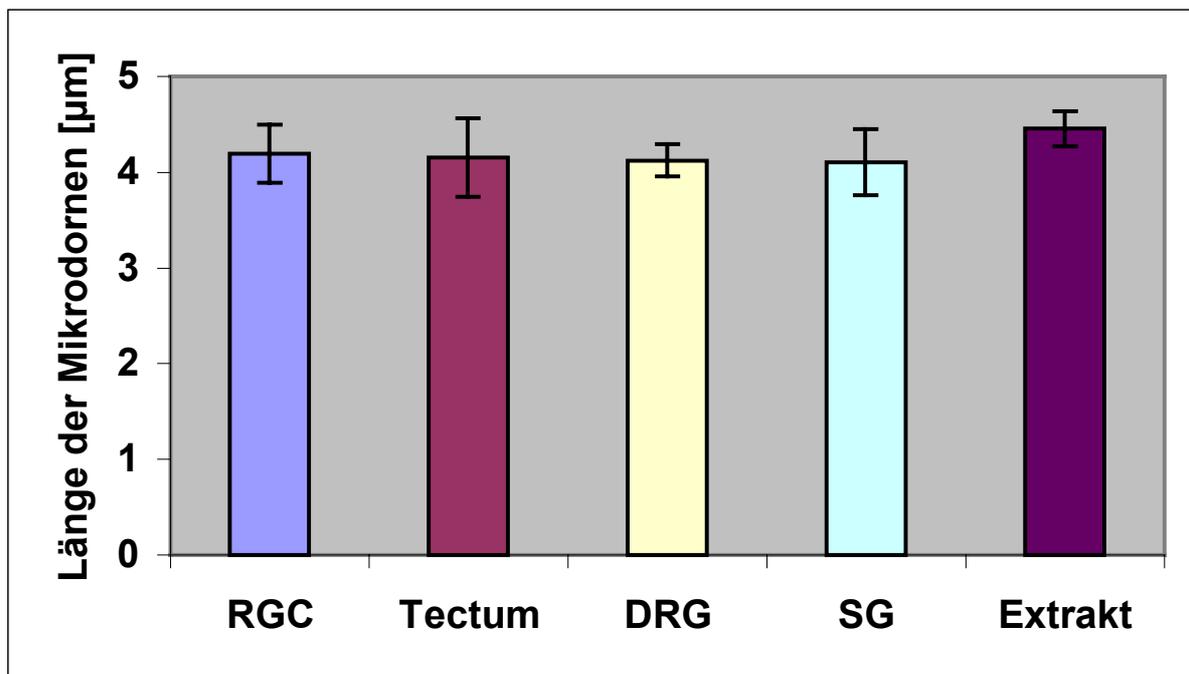


Abb. 31 Längenvergleich der durch anti-Agrin-Antiserum (AS 46) induzierten Mikrodoernen auf RGCs, tecto-bulbären Neuronen (Tectum) sowie Neuronen des Hinterwurzelganglions (DRG) und sympathischen Ganglions (SG) mit durch Proteinextrakt (Extrakt) induzierten Mikrodoernen auf RGC-Axonen. Alle beobachteten Mikrodoernen hatten eine durchschnittliche Länge von ca. 4,0 bis 4,5 μm .

5.5 Untersuchung eines wachstumskegelstabilisierenden Effektes der anti-Agrin-Antiseren

Die Beeinflussung des Wachstumskegels durch wachstumsfördernde oder hemmende Substanzen spielt physiologisch bei der axonalen Wegfindung, z.B. bei der Ausbildung der retino-tectalen Projektion, eine äußerst wichtige Rolle (Drescher, 1997). Der Kontakt des Wachstumskegels mit lokal wirkenden wachstumshemmenden Substanzen kann dabei zum einen die Richtung des wachsenden Axons ändern oder gar zum Kollaps des Wachstumskegels und damit zu einem Zurückziehen der Filopodien und Lamellipodien führen. Phorbolester wie z.B. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) bewirken bereits in nanomolaren Konzentrationen eine Aktivierung der PKC (Saitoh und Dobkins, 1986) und eine Inhibition des Axonwachstums bzw. einen Kollaps des Wachstumskegels (Campenot et al., 1991). Dieser Effekt ist begleitet von strukturellen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts. Um zu untersuchen, ob die Bildung von Mikrodornen eine Rolle bei der axonalen Wegfindung spielen könnte, wurden RGC-Axone mit anti-Agrin-Antiserum bzw. Präimmenserum behandelt. Dies hatte keinen nachhaltigen Einfluß auf die Morphologie bzw. Stabilität der Filopodien und Lamellipodien des Wachstumskegels, wie Färbungen mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin zeigten (s. Abb 32 A-B). Wurden Axone dagegen nach der Inkubation mit Präimmenserum für 1 Std. mit 2 μ M PMA behandelt, beobachtete man einen vollständigen Kollaps des Wachstumskegels, wobei sich sowohl die Filopodien als auch die Lamellipodien des Wachstumskegels zurückbildeten (s. Abb 32 C). Die Zugabe von PMA nach Inkubation mit dem anti-Agrin-Antiserum führte dagegen nicht zu dem erwarteten Kollaps. Wenngleich die meisten Lamellipodien zurückgebildet wurden, zeigte sich kein Kollaps der Filopodien des Wachstumskegels (s. Abb. 32 D). Auch die Mikrodornen auf der axonalen Oberfläche zeigten keine morphologischen Veränderungen nach der Behandlung mit PMA.

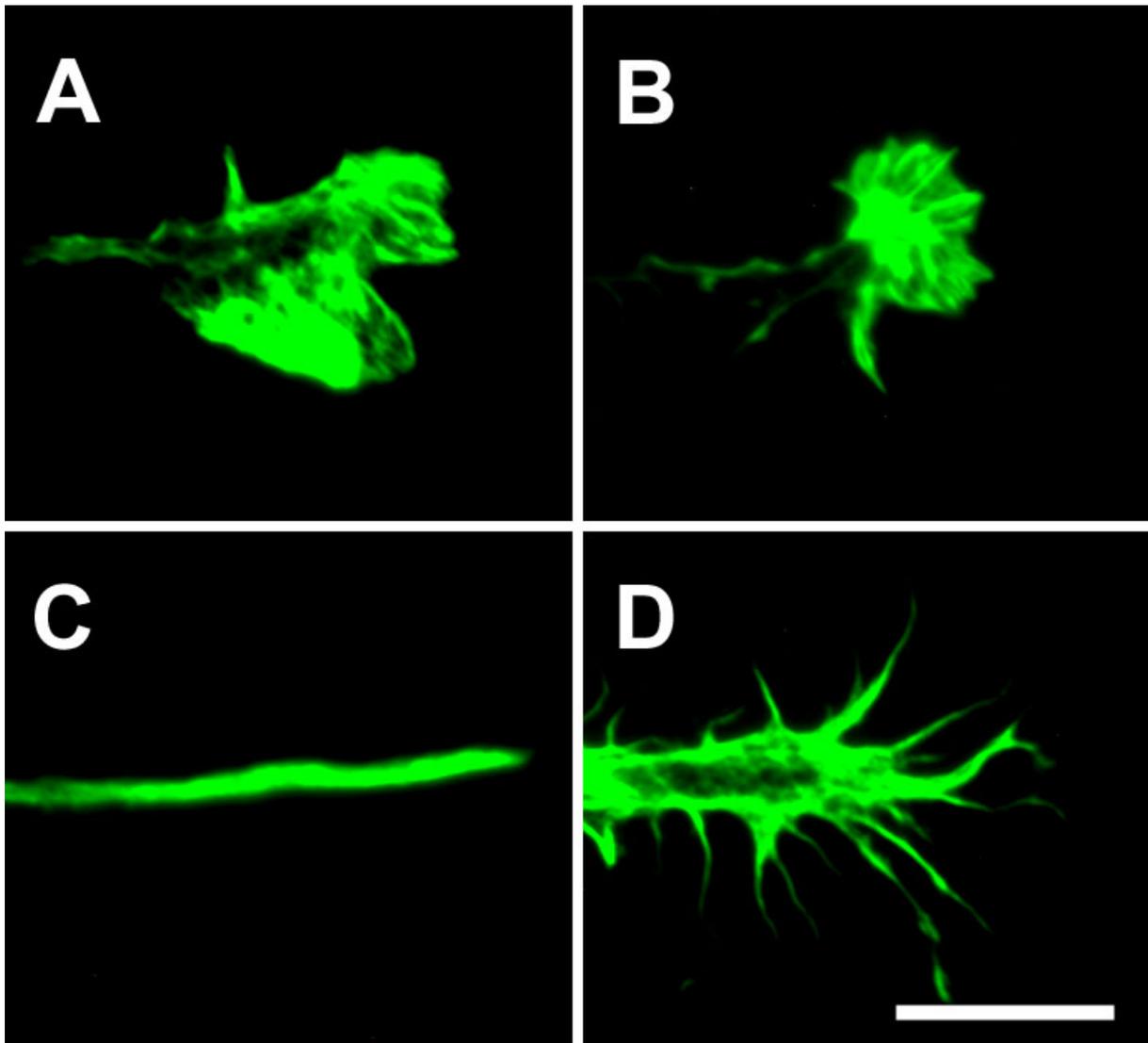


Abb. 32 Anti-Agrin-Antisera stabilisieren Filopodien von Wachstumskegeln nach Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Wachstumskegel von RGCs wurden allein mit Präimmunsereum (A) oder anti-Agrin-Antiserum (AS 46) (B) für 3 Std. in 1:1000-Verdünnung inkubiert. In beiden Fällen zeigte sich kein Einfluß auf die Morphologie bzw. Stabilität der Filopodien und Lamellipodien des Wachstumskegels. Eine anschließende Inkubation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) für 1 Std. führte im Falle von mit Präimmunsereum behandelten Kulturen zu einem vollständigen Kollaps des Wachstumskegels und einem Zurückziehen der Filopodien und Lamellipodien (C). Bei zuvor mit anti-Agrin-Antiserum behandelten Kulturen (D) führte die Behandlung mit PMA lediglich zu einer Rückbildung der Lamellipodien, nicht aber der Filopodien. Die Wachstumskegel wurden mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt (grün). Der Skalierungsbalken entspricht 10 μm .

Zur Quantifizierung des beobachteten Effektes wurden drei verschiedene Kategorien von Wachstumskegeln definiert: Wachstumskegel mit Filopodien und Lamellipodien, Wachstumskegel nur mit Filopodien aber ohne Lamellipodien sowie vollständig kollabierter Wachstumskegel ohne Filopodien und Lamellipodien (s. Abb. 33). Die Auszählung ergab, daß bei alleiniger Behandlung der Kulturen mit Präimmunsereum bzw. anti-Agrin-Antiserum mehr als 80 % der Wachstumskegel eine normale Morphologie mit Filopodien und Lamellipodien zeigten. Die Zugabe von PMA nach der Inkubation mit Präimmunsereum führte

zu einem Kollaps von mehr als 80 % der Wachstumskegel. Dagegen verhinderte eine vorherige Inkubation mit dem anti-Agrin-Antiserum den vollständigen Kollaps. Nahezu alle Wachstumskegel besaßen nach wie vor Filopodien, wenngleich die meisten Lamellipodien zurückgebildet wurden. Interessanterweise bewirkte die Zugabe von PMA ebenfalls keinen Kollaps der bereits beschriebenen Mikrodornen, die bei Behandlung der RGC-Axone mit dem anti-Agrin-Antiserum gebildet wurden. Dies unterstützt die Hypothese, daß es sich auch bei den Mikrodornen um filopodienähnliche Strukturen handelt. Das anti-Agrin-Antiserum scheint also möglicherweise generell sowohl die filopodienähnlichen Mikrodornen, als auch Filopodien von Wachstumskegeln zu stabilisieren und gegen den kollapsinduzierenden Effekt von Substanzen wie PMA zu schützen.

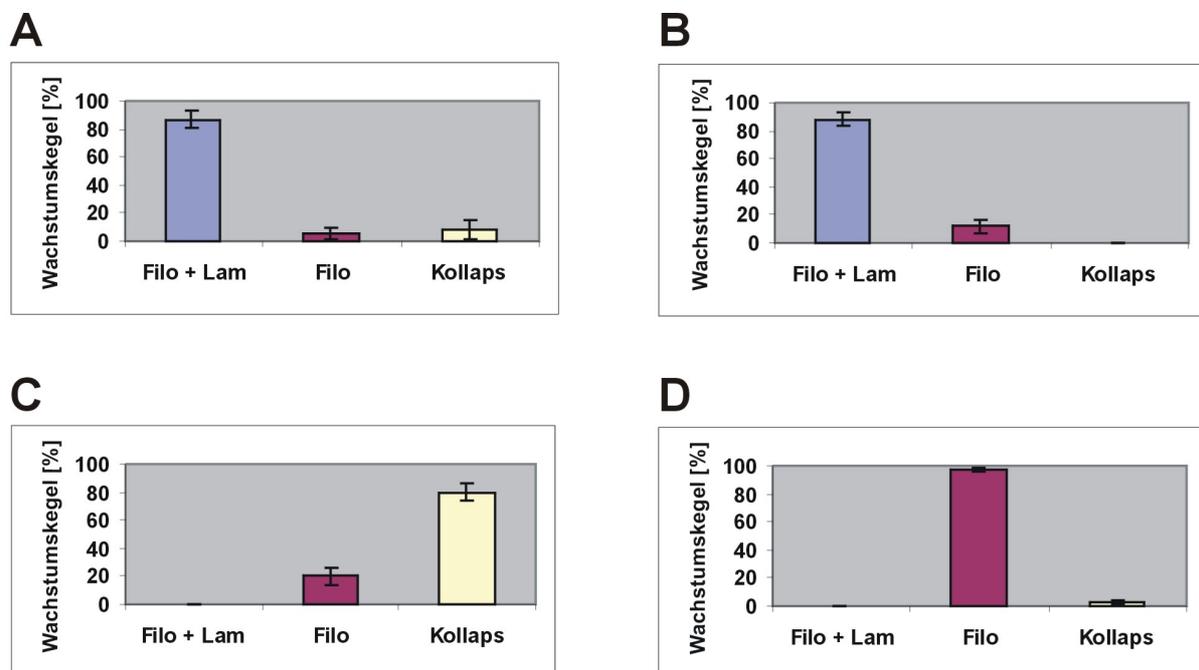


Abb. 33 Quantifizierung des stabilisierenden Effektes von anti-Agrin-Antiseren auf Filopodien von Wachstumskegeln nach Behandlung mit Phorbol ester (PMA). Die untersuchten Wachstumskegel wurden jeweils einer von drei morphologischen Kategorien zugeordnet: Wachstumskegel mit Filopodien und Lamellipodien (Filo + Lam, vgl. Abb. 32 A, B), Wachstumskegel mit Filopodien (Filo, vgl. Abb. 32 D) oder vollständig kollabierte Wachstumskegel ohne Filopodien und Lamellipodien (Kollaps, vgl. Abb. 33 C). Bei alleiniger Behandlung mit Präimmunserum (A) oder anti-Agrin-Antiserum (AS 46) (B) zeigten die meisten Wachstumskegel eine normale Morphologie mit Filopodien und Lamellipodien. Eine Inkubation mit PMA führte bei mit Präimmunserum behandelten Kulturen zu einer Rückbildung der meisten Filopodien und Lamellipodien (C). Die Inkubation mit anti-Agrin-Antiserum stabilisierte die Filopodien, so daß eine Behandlung mit PMA lediglich zu einer Rückbildung der Lamellipodien, nicht aber der Filopodien führte (D).

6. Diskussion

6.1 Expression von Agrin in retinalen Ganglienzellen

Es besteht kein Zweifel, daß Agrin einen der Hauptregulatoren der Synaptogenese an der NMJ darstellt. Die Funktion von Agrin im sich entwickelnden ZNS ist dagegen unbekannt. Erste funktionelle Experimente untersuchten die Hypothese, daß Agrin im ZNS eine ähnliche Funktion bei der Synapsenbildung haben könnte wie im PNS an der NMJ. Die Charakterisierung der Agrin-knockout-Maus zeigte jedoch keine Störungen der Synapsenbildung an zentralnervösen Synapsen in der Retina (Schröder und Kröger, unveröffentlicht), in primären Hippocampus- (Serpinskaya et al., 1999) und in Cortexkulturen (Li et al., 1999). Agrin scheint also im ZNS keine ähnlich bedeutende Rolle bei der Synaptogenese zu spielen wie an der NMJ. Zwar ist eine Funktion von Agrin bei der Synaptogenese auch im ZNS nicht auszuschließen, allerdings scheint es sich hier um einen weitaus komplexeren Prozeß zu handeln, der nicht auf einen alleinigen synaptogenen Faktor reduzierbar ist. Eine Möglichkeit, die normal ablaufende Synaptogenese im ZNS von Agrin-knockout-Mäusen zu erklären besteht darin, daß ein Fehlen von Agrin *in vivo* durch andere Faktoren kompensiert werden könnte. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung untermauert, daß die akute Inhibition der Agrin-Expression durch antisense-Oligonucleotide oder die direkte Inaktivierung von Agrin durch spezifische anti-Agrin-Antikörper in Hippocampuskulturen von Wildtypmäusen zu Störungen der Synapsenbildung sowie zu Veränderungen der synaptischen Übertragung führen. In Kulturen von Agrin-knockout-Mäusen zeigen die gleichen Antikörper und Oligonucleotide dagegen keinen Effekt, was die Spezifität des Experimentes bestätigt (Böse et al., 2000). In diesem *in vitro*-System kann also die akute Blockade von Agrin im Gegensatz zur langfristigen Defizienz von Agrin in der knockout-Maus nicht durch andere Faktoren kompensiert werden.

Agrin wird im sich entwickelnden ZNS besonders während des axonalen Wachstums exprimiert und ist auf der axonalen Oberfläche weitprojizierender Neurone lokalisiert (Halfter, 1993; Kröger et al., 1996; Halfter et al., 1997; Koulen et al., 1999). Um eine Rolle von Agrin während des axonalen Wachstums zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Expression verschiedener Agrin-Isoformen in Ganglienzellen der embryonalen Hühnerretina (RGCs) untersucht. Diese Zellpopulation bietet sich an, da hier eine Expression von Agrin während des axonalen Wachstums bereits nachgewiesen werden konnte (Halfter, 1993; Kröger et al., 1996; Halfter et al., 1997; Koulen et al., 1999) und RGC-

Kulturen sich hervorragend für die Analyse molekularer Vorgänge während des axonalen Wachstums eignen.

Sowohl in der Retina als auch in aufgereinigten RGCs wurden zu verschiedenen Entwicklungsstadien vor, während und nach der Synaptogenese gleichzeitig verschiedene Agrin-Isoformen mit und ohne AChR-Aggregationsaktivität exprimiert. Es handelte sich dabei um die inaktive B0-Isoform sowie die aktiven B11- und B19-Isoformen. Besonders auffällig war hier die deutliche Expression von Agrin bereits vor dem Zeitpunkt der Synaptogenese während des axonalen Wachstums, was die Hypothese, daß Agrin eine Funktion gerade während dieser Phase der Embryonalentwicklung besitzt, unterstützte. Das Expressionsschema der verschiedenen Agrin B-Isoformen in der Retina und in aufgereinigten RGCs zeigte gewisse Homologien zur Agrin-Expression in anderen Gewebetypen des ZNS. So werden beispielsweise im Gehirn alle aktiven und inaktiven Agrin-B-Isoformen exprimiert, wobei die inaktive B0-Isoform den größten Anteil ausmacht (Hoch et al., 1993). Auch in der Retina wird die B0-Isoform verglichen mit anderen Agrin-Isoformen am stärksten exprimiert (Kröger et al., 1996). Ein Unterschied zwischen dem Agrin-Expressionsmuster in der Retina bzw. in aufgereinigten RGCs und der Expression in anderen ZNS-Gewebetypen wie dem Gehirn besteht allerdings im Fehlen der B8-Isoform (Kröger et al., 1996; diese Arbeit), welches darüber hinaus auch in Stratospheroidkulturen der embryonalen Hühnerretina beobachtet werden kann (Hering und Kröger, 1999). Die Ursache für das Fehlen gerade dieser Agrin-Isoform in der Retina und in aufgereinigten RGCs ist unbekannt.

Die Untersuchung der Agrin-Expression in einzelnen RGCs mittels Einzelzell-RT-PCR ergab, daß einzelne Zellen mehrere Agrin Isoformen exprimieren. Ein Teil der untersuchten RGCs des Entwicklungsstadiums E10, die vorher eindeutig durch retrograde Markierung sowie durch elektrophysiologische Charakterisierung identifiziert worden waren, zeigten eine gleichzeitige Expression der B0- und B11-Isoformen. Der prozentuale Anteil dieser Zellen lag bei 26,3 %. Einzelne Neurone des ZNS wie RGCs sind dementsprechend in der Lage gleichzeitig verschiedene Agrin-Isoformen zu exprimieren. Der größere Anteil der durch Einzelzell-RT-PCR untersuchten RGCs zeigte dagegen eine alleinige Expression der B0-Isoform. Für Neurone des PNS ergibt die Analyse der Agrin-Expression mittels Einzelzell-RT-PCR ein ähnliches Ergebnis (Smith und O'Dowd, 1994). Einzelne Motoneurone des Ciliarganglions sind ähnlich wie RGCs in der Lage, gleichzeitig verschiedene Agrin-Isoformen zu exprimieren. Dabei werden alle Kombinationen der verschiedenen Agrin-B-Isoformen exprimiert (Smith und O'Dowd, 1994).

Die inaktive B0-Isoform wird im ZNS allgemein wesentlich stärker exprimiert als im PNS, wobei die Funktion dieser Agrin-Isoform unbekannt ist (Hoch et al., 1993). Auch in einzelnen Zellen des ZNS, nämlich RGCs, war die Anzahl der nur die B0-Isoform exprimierenden Zellen mit 47,4 % deutlich höher als in einzelnen Motoneuronen des PNS, wo die Anzahl dieser Zellen lediglich 3,5 % betrug (Smith und O'Dowd, 1994). Daraus läßt sich ableiten, daß der B0-Isoform auch in einzelnen Neuronen des ZNS aufgrund ihrer starken Expression eine wichtige Rolle zukommt, wenngleich die genaue Funktion noch nicht verstanden ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der isoformspezifischen RT-PCR mit aufgereinigten RGCs wurde in der Einzelzell-RT-PCR keine Expression der B19-Isoform nachgewiesen. Daneben zeigten einige RGCs keinerlei Agrin-Expression. Eine wahrscheinliche Erklärung ist, daß das hier beobachtete Fehlen bestimmter Agrin-Isoformen in einzelnen Zellen teilweise auf eine Expression dieser Isoformen unterhalb der Nachweisgrenze der Einzelzell-RT-PCR zurückzuführen war. Außerdem ist es möglich, daß die beim Aussaugen der Zellen gesammelte RNA-Menge für einen Nachweis in der Einzelzell-RT-PCR nicht ausreichend war, beispielsweise weil die Zellen und damit deren RNA-Menge zu klein waren oder die RNA der Zelle nicht vollständig gesammelt werden konnte. Andererseits könnte es sich bei den die B19-Isoform exprimierenden RGCs um eine seltene Subpopulation handeln, die bei der Analyse durch Einzelzell-RT-PCR nicht erfaßt werden konnte. Wie bei RGCs wird auch bei der Analyse von Motoneuronen durch Einzelzell-RT-PCR in einigen Zellen ein völliges Fehlen jeglicher Agrin-Expression beobachtet (Smith und O'Dowd, 1994). Die Optimierung der PCR geschah im Hinblick auf die Vermeidung von falsch positiven Resultaten. Bei dieser Art der Optimierung mußte deshalb eine erhöhte Zahl von Zellen ohne nachweisbare mRNA in Kauf genommen werden.

Es stellt sich die Frage, ob das bei der Einzelzell-RT-PCR von RGCs beobachtete unterschiedliche Expressionsschema verschiedener Agrin-B-Isoformen möglicherweise mit dem jeweiligen Subtyp der RGCs korreliert. Ähnliches wird bei der Untersuchung von Subtypen von Motoneuronen des Ciliarganglions, nämlich Ciliar- und Choroidneuronen, beobachtet (Smith und O'Dowd, 1994). Aufgrund der experimentellen Bedingungen konnte in der vorliegenden Arbeit keine anatomische Charakterisierung der RGCs durchgeführt werden, weshalb eine Untersuchung dieser Fragestellung nicht möglich war. Eine Abhängigkeit der Agrin-Expression vom jeweiligen RGC-Subtyp analog zu Motoneuronen ist aber durchaus möglich.

In der Retina wurden zu allen Entwicklungsstadien sowohl NtA- als auch Transmembran-Agrin (TM-Agrin) exprimiert. Aufgereinigte RGCs dagegen exprimierten ausschließlich TM-Agrin. Dies wirft die Frage auf, welche Funktion TM-Agrin insbesondere in RGCs spielt. Eine synaptogene Aktivität von TM-Agrin ist aus folgenden Gründen unwahrscheinlich: TM-Agrin wird nahezu ausschließlich im ZNS und nicht im PNS exprimiert (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001). Außerdem führt die selektive Inaktivierung des sekretierten NtA-Agrins in Mausmutanten zu denselben Störungen an der NMJ wie bei der Agrin knockout-Maus bei der alle Agrin-Isoformen fehlen (Burgess et al., 2000). TM-Agrin kann also das Fehlen des synaptogenen NtA-Agrins an der NMJ nicht kompensieren. Dies läßt darauf schließen, daß TM-Agrin eine vollkommen andere Funktion ausübt als NtA-Agrin an der NMJ. Insbesondere die alleinige Expression von TM-Agrin in RGCs während des axonalen Wachstums läßt auf eine Funktion gerade während dieser Phase der Embryonalentwicklung schließen.

6.2 Biologische Aktivität von ganglienzellassoziertem Agrin

In Kokulturen von Muskelfasern mit Retinaexplantaten zeigte sich, daß Axone von RGCs, im Gegensatz zu Axonen von Rückenmarksneuronen bzw. Motoneuronen (Magill-Solc und McMahan, 1988; Reist et al., 1992; Lieth und Fallon, 1993), nicht in der Lage waren, auf der Oberfläche der Muskelfasern in signifikantem Ausmaß AChR-Aggregate zu induzieren. Analog sind auch Kokulturen von dissoziierten Zellen der Gesamtr retina bzw. konditioniertes Medium von retinalen Zellen nicht fähig, AChR auf Muskelfasern zu aggregieren (Thompson und Rapoport, 1988). Dies war überraschend, da RGCs auf ihrer Oberfläche *in vivo* wie *in vitro* Agrin exprimieren (Halfter, 1993; Kröger et al., 1996; Halfter et al., 1997; Koulen et al., 1999) und zumindest ein Teil dieses Agrins den aktiven Isoformen B11 und B19 entspricht. Darüberhinaus enthält auch konditioniertes Medium von retinalen Zellen AChR-Aggregationsaktivität (Mann und Kröger, 1996). Am Embryonaltag 6 wird ausschließlich TM-Agrin von RGCs exprimiert. Die fehlende AChR-Aggregationsaktivität von RGC-assoziertem Agrin kann jedoch nicht durch die alleinige Expression von TM-Agrin durch RGCs begründet werden, da TM-Agrin wie lösliches NtA-Agrin prinzipiell AChR-Aggregationsaktivität besitzt, wie sich in Kokulturen von transfizierten HEK-293-Zellen und Muskelfasern zeigte (Neumann et al., 2001). Dies war zu erwarten, da es sich bei TM-Agrin um ein Typ II-Transmembranprotein mit $N_{\text{zyto}}/C_{\text{exo}}$ -Orientierung handelt, so daß die C-terminale G3-Domäne, die notwendig und hinreichend für die AChR-Aggregation auf Muskelfasern *in vitro* und *in vivo* ist (Gesemann et al., 1995; Meier et al., 1998), in den

Extrazellulärraum gerichtet ist und somit ein Kontakt zu Agrin-Rezeptoren auf den Muskelfasern gewährleistet sein sollte.

Warum das auf der Oberfläche von RGC-Axonon exprimierte TM-Agrin trotzdem keine AChR-Aggregationsaktivität besitzt ist unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die AChR-Aggregationsaktivität von RGC-assoziiertem TM-Agrin durch einen noch unbekanntem Faktor inhibiert wird. Für diese Hypothese spricht die Beobachtung, daß sich in Kokulturen von Muskelfasern mit RGC-Axonon nach der Zugabe von löslichem aktivem Agrin an den Kontaktstellen zwischen RGC-Axonon und Muskelfasern signifikant weniger AChR-Aggregate ausbildeten als in Bereichen ohne Kontakt zu Axonen. Ein potentieller, die AChR-Aggregationsaktivität von Agrin inhibierender Faktor sollte deshalb lokal wirken und mit der Oberfläche der RGC-Axone assoziiert sein. Ein Inhibitor der AChR-Aggregation wurde bereits für Proteinextrakte aus dem Gehirn des Huhns bzw. des Zitterrochen *Torpedo californica* gefunden (Magill-Solc und McMahan, 1988). Diese Extrakte enthalten zumindest in geringen Mengen Agrin-Isoformen mit AChR-Aggregationsaktivität, sind jedoch trotzdem nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß in der Lage, AChR-Aggregate auf kultivierten Muskelfasern zu induzieren. Außerdem können diese Extrakte die durch Agrin induzierte Aggregation von AChR inhibieren. Ein solcher die AChR-Aggregation inhibierender Faktor konnte bisher im Gehirn noch nicht molekular identifiziert werden. Die physiologische Funktion einer Inhibition bzw. Regulation von Agrins AChR-Aggregationsaktivität im ZNS bleibt unklar, zumal bisher keine experimentellen Befunde für eine Beteiligung von Agrin an der AChR-Aggregation an zentralnervösen Synapsen nachgewiesen werden konnten (Schröder und Kröger, unveröffentlicht).

6.3 Transmembran-Agrin vermittelt die Bildung von Mikrodornen auf wachsenden Axonen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein Einfluß von Agrin auf das axonale Wachstum von Neuronen nachgewiesen werden. Die Inkubation von wachsenden RGC-Axonon mit verschiedenen anti-Agrin-Antisera für lediglich 3 Std. bewirkte die Bildung zahlreicher aktinreicher, filopodienähnlicher Fortsätze (Mikrodornen) entlang des gesamten Axons. Die Lokalisation des Zytoskelettbestandteils Aktin in den neugebildeten Mikrodornen deutete darauf hin, daß eine aktive Reorganisation des axonalen Zytoskeletts für deren Bildung notwendig war. Dies wurde dadurch bestätigt, daß die Präinkubation der Kulturen von RGC-Axonon mit Substanzen, die die Aktin- bzw. Tubulin-Polymerisation unterbinden, nämlich Cytochalasin D (Urbanik et al., 1989) und Demecolcin (Nishiyama und Fujii, 1992),

auch die Bildung von Mikrodornen hemmen konnte. Da die Wirkung von Cytochalasin D im Vergleich zu Demecolcin stärker war, ist davon auszugehen, daß insbesondere die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung für die Bildung von Mikrodornen ist.

In weiteren Experimenten wurde die Spezifität der anti-Agrin-Antikörper bei der Bildung von Mikrodornen auf wachsenden RGC-Axonon analysiert. Während eine Reihe verschiedener anti-Agrin-Antiseren in der Lage war, Mikrodornen zu induzieren, zeigten Präimmunsereen sowie Antiseren, die lediglich gegen bestimmte Teilbereiche oder Domänen des Agrin-Proteins gerichtet waren wie z.B. die NtA-Domäne oder das B8- oder B19-Peptid, keinen Effekt. Dies stimmte mit der Expressionsanalyse überein, wonach Agrin-Isoformen, die die NtA-Domäne oder das B8-Exon enthielten, nicht von RGCs exprimiert wurden. Die Spezifität des beobachteten Effektes und die Beteiligung von Agrin wurden ferner dadurch nachgewiesen, daß eine Präinkubation des Antiserums mit Agrin-Protein die Bildung von Mikrodornen fast vollständig unterbinden konnte. Ein Sekundäreffekt anderer Antikörper im Antiserum war also auszuschließen. Übereinstimmend damit zeigten Antikörper gegen andere Proteine wie α -Dystroglykan, β 1-Integrin oder Thy-1 ebenfalls keine Wirkung. Insbesondere Thy-1 (Sheppard et al., 1988; Lehwalder et al., 1989) und β 1-Integrin (Hering et al., 2000) sind wie TM-Agrin auf der Oberfläche von RGC-Axonon lokalisiert und stellen deshalb eine gute Kontrolle dar. Zusammenfassend zeigten diese Experimente, daß die Bildung von Mikrodornen spezifisch von anti-Agrin-Antikörpern im Antiserum und nicht durch einen Sekundäreffekt des Antiserums verursacht wurde. Da TM-Agrin außerdem die einzige von RGCs des Entwicklungsstadiums E6 exprimierte N-terminale Form von Agrin darstellt, muß TM-Agrin für die Induktion der Mikrodornen verantwortlich sein.

Monoklonale anti-Agrin-Antikörper waren weder allein noch in Kombination in der Lage, Mikrodornen auf der Oberfläche von RGC-Axonon zu induzieren. Monoklonale Antikörper erkennen im Gegensatz zu polyklonalen Antiseren lediglich ein einziges Epitop auf dem Antigen. Offensichtlich ist also die Bindung eines oder auch zweier monoklonaler Antikörper an jeweils nur ein Epitop des Agrin-Proteins nicht ausreichend, um die Bildung von Mikrodornen zu induzieren. Ähnlich wie monoklonale Antikörper zeigten Fab-Fragmente auch in 100-fach erhöhter Konzentration ebenfalls keinen Effekt, obwohl das Serum, aus dem die Fab-Fragmente hergestellt wurden, in der Lage war, Mikrodornen zu induzieren. Fab-Fragmenten fehlt der Fc-Teil des Immunglobulinmoleküls. Wenngleich also von Fab-Fragmenten dieselben Epitope des Antigens erkannt werden wie von entsprechenden bivalenten Antikörpern ist keine Kreuzvernetzung der entsprechenden Antigene möglich. Für

die Induktion der Bildung von Mikrodornen durch anti-Agrin-Antikörper scheint also gerade diese Kreuzvernetzung des Antigens, in diesem Falle von TM-Agrin, notwendig zu sein. Dies läßt darauf schließen, daß durch die anti-Agrin-Antikörper eine Di- oder Multimerisierung von TM-Agrin-Molekülen auf der axonalen Oberfläche und damit eine Aktivierung von Agrin ausgelöst wird.

Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß Agrin, das sich auf der Oberfläche der RGC-Axone und dem verwendeten Substrat, nämlich der Basalmembran der Hühnerretina, befindet (Kröger et al., 1996; Kröger und Mann, 1996), durch anti-Agrin-Antikörper inhibiert und dadurch eine Bildung von Mikrodornen verursacht wird. Dies kann jedoch aus 2 Gründen ausgeschlossen werden. Zum einen war die für die Bildung von Mikrodornen notwendige Konzentration des anti-Agrin-Antiserums zu gering, um alle Agrin-Proteine auf dem Axon oder dem Substrat absättigen und blockieren zu können. Zum anderen konnten Fab-Fragmente, wie erwähnt, keine Mikrodornen induzieren. Dies spricht gegen eine einfache Funktionsinhibierung von Agrin durch anti-Agrin-Antikörper, da anti-Agrin-Fab-Fragmente grundsätzlich in der Lage sind, Agrin zu blockieren. So können Fab-Fragmente beispielsweise an der NMJ die AChR-Aggregation durch Inhibition bzw. Blockierung von Agrin hemmen (Campagna et al., 1997). Auch eine direkte Beteiligung des auf dem Substrat lokalisierten Agrins kann ausgeschlossen werden, da eine Induktion von Mikrodornen auch auf Substraten möglich war, die kein Agrin enthielten wie poly-D-Lysin/Laminin. Da hier jedoch die Anzahl der Mikrodornen signifikant geringer war als auf RGC-Axonon, die auf Basalmembranen kultiviert wurden, ist davon auszugehen, daß die wachstumsfördernden Eigenschaften der Basalmembran, die allgemein ein im Vergleich zu poly-D-Lysin/Laminin besseres Substrat für wachsende Axone darstellt (Halfter et al., 1987), den Effekt der Antiseren, z.B. durch eine erhöhte Expression von TM-Agrin, verstärken konnten.

Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit des beobachteten Effektes zeigte, daß sich erste Mikrodornen äußerst schnell innerhalb weniger Minuten ausbilden. Eine maximale Anzahl wurde nach ca. 3 Stunden erreicht. Die Anzahl der Mikrodornen war außerdem von der Konzentration des zugegebenen anti-Agrin-Antiserums abhängig. Dabei bildeten sich Mikrodornen bereits bei äußerst hohen Verdünnungen des anti-Agrin-Antiserums. Die halbmaximale Aktivität des Antiserums, d.h. die Verdünnung bei der eine halbmaximale Anzahl von Mikrodornen induziert werden konnte, lag bei etwa 1:5000. Eine maximale Anzahl wurde bei einer Verdünnung von etwa 1:100 erreicht.

Mikrodornen konnten prinzipiell auf den Axonen aller untersuchten Neuronentypen induziert werden. Dabei handelte es sich sowohl um Neurone des ZNS (RGCs, tecto-bulbäre

Neurone) als auch des PNS (Neurone des Hinterwurzelganglions und sympathischen Ganglions). Die Anzahl der Mikrodornen war allerdings bei gleichen Antikörperkonzentrationen auf Axonen von ZNS-Neuronen ca. 3 bis 4 mal höher als auf Axonen von PNS-Neuronen. TM-Agrin, das an der Bildung der Mikrodornen beteiligt ist, wird fast ausschließlich im ZNS und kaum im PNS exprimiert (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der TM-Agrin-Expression und der Anzahl der induzierten Mikrodornen besteht. Die geringere Anzahl von Mikrodornen auf PNS-Neuronen könnte somit durch die im Vergleich zu ZNS-Neuronen geringere Expression von TM-Agrin begründet werden.

Durch Zeitraffer-Videomikroskopie wurde untersucht, ob die gebildeten Mikrodornen dynamisch waren, d. h. ob sie nach ihrer Bildung wieder zurückgebildet werden konnten und sich möglicherweise auch in ihrer Größe veränderten. Die durchgeführten Experimente zeigten zunächst, daß sich erste Mikrodornen bereits wenige Minuten nach Zugabe des Antiserums bildeten, was die zuvor untersuchte Zeitabhängigkeit des Effektes bestätigte. Die Mikrodornen waren außerdem hochdynamisch und änderten ihre Länge innerhalb weniger Minuten. In mehreren Fällen bildeten sich an den Spitzen der Mikrodornen zwischenzeitlich wachstumskegelartige Strukturen aus. Diese Strukturen wurden allerdings nicht weiter stabilisiert, so daß es nach kurzer Zeit zu einem vollständigen Kollaps und einer Rückbildung kam. Es ist daher davon auszugehen, daß zumindest einige Mikrodornen Überreste von Wachstumskegeln darstellen. Dies könnte auf einen Zusammenhang der Mikrodornen mit der Bildung axonaler Verzweigungen oder Kollateralen hindeuten. Ferner zeigte sich eine Zunahme der Wachstumskegelgröße ca. 1 Std. nach Zugabe des Antiserums. Dies deutet möglicherweise auf einen zusätzlichen Einfluß von TM-Agrin auf die Morphologie und Stabilität des Wachstumskegels hin, wobei auch dieser Effekt von strukturellen Veränderungen des Zytoskeletts begleitet ist.

Die Ergebnisse der Zeitraffer-Videomikroskopie legten eine morphologische Ähnlichkeit der Mikrodornen mit Filopodien nahe. Dies konnte durch Immunfärbungen mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern bestätigt werden. So zeigten die Mikrodornen zumindest zum Teil Immunreaktivität für die Proteine Synaptotagmin und GAP-43. Synaptotagmin ist ein präsynaptischer Marker, der auch in wachsenden Axonen vorkommt (Perin et al., 1990; Südhof, 1995), GAP-43 ein auf Wachstumskegeln und wachsenden Axonen lokalisiertes Zytoskelettprotein (Meiri et al., 1986). Beide Moleküle stellen einen molekularen Bestandteil von Filopodien des Wachstumskegels dar (Meiri et al., 1986; Vanselow et al., 1991; Hering und Kröger, 1996; Kabayama et al., 1999). Im Gegensatz zu

Synaptotagmin und GAP-43 fanden sich die Proteine Neurofilament 68 (NF 68) und β -Tubulin nur im Bereich des Axonschafes und nicht in den Mikrodornen. Interessanterweise sind beide Proteine auch nicht auf Filopodien von Wachstumskegeln lokalisiert (Rivas et al., 1992; Tang und Goldberg, 2000). Die Mikrodornen zeigen neben der durch Zeitraffer-Videomikroskopie nachgewiesenen morphologischen Ähnlichkeit also auch eine molekulare Verwandtschaft zu Filopodien.

Die Inkubation von RGC-Axonon mit anti-Agrin-Antiseren war nicht nur in der Lage, Mikrodornen auf Axonen zu induzieren. Vielmehr wurde in einem weiteren Experiment ein stabilisierender Effekt auf Filopodien des Wachstumskegels nach Behandlung mit kollapsinduzierenden Substanzen wie Phorbol ester (PMA) beobachtet. PMA aktiviert die Proteinkinase C (PKC) (Saitoh und Dobkins, 1986) und bewirkt einen Kollaps des Wachstumskegels inklusive aller Filopodien und Lamellipodien (Campenot et al., 1991). Wurden RGC-Axone vor der Behandlung mit PMA mit anti-Agrin-Antiserum inkubiert, bildeten sich lediglich die Lamellipodien des Wachstumskegels zurück, wohingegen die Filopodien bestehen blieben. Die Aktivierung von TM-Agrin durch anti-Agrin-Antiseren führt also wahrscheinlich zu einer Verhinderung des Wachstumskegelskollaps durch eine Stabilisierung der Filopodien. Interessanterweise wurde ebenso kein Kollaps der durch anti-Agrin-Antiseren induzierten Mikrodornen nach Behandlung mit PMA beobachtet. Möglicherweise führt also die Inkubation mit anti-Agrin-Antiseren und damit verbunden die Aktivierung von TM-Agrin zu einer generellen Stabilisierung von Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Die physiologische Bedeutung dieses Effektes ist allerdings noch unklar.

6.4 Mechanismus und Funktion der Mikrodornenbildung

Die Ausbildung filopodienartiger Fortsätze auf wachsenden RGC-Axonon nach Behandlung mit bestimmten Antiseren wurde bereits von Halfter (1989) beschrieben. In dieser Untersuchung wurde ein Antiserum gegen die Basallamina der Retina hergestellt, von der mittlerweile bekannt ist, daß sie Agrin enthält (Kröger und Mann, 1996). Dieses Antiserum war gegen verschiedene Komponenten der Basallamina gerichtet. Die Inkubation der RGC-Axone mit diesem Antiserum führte zur Bildung zahlreicher filopodienartiger Fortsätze entlang des Axons, die in ihrer Morphologie und Anzahl den durch anti-Agrin-Antiseren induzierten Mikrodornen ähnelten. Außerdem wurde eine allgemeine Inhibition des Axonwachstums und eine Verkleinerung der Wachstumskegel beobachtet. In der Untersuchung von Halfter (1989) konnte nicht geklärt werden, auf welche Moleküle der Basallamina die beobachteten Effekte zurückzuführen waren. Die vorliegende Arbeit zeigt,

daß diese Fortsätze durch anti-Agrin-Antikörper im verwendeten Antiserum induziert wurden. Die anderen bei Halfter (1989) beschriebenen Effekte wie die Inhibition des Axonwachstums und die Verkleinerung der Wachstumskegel, die nach Behandlung mit anti-Agrin-Antiseren nicht beobachtet wurden, sind dagegen möglicherweise die Folge von Antikörpern gegen andere Basallaminamoleküle.

In einer weiteren Untersuchung konnte auf Axonen von Moosfasern des Cerebellums der von Körnerzellen sekretierte Faktor WNT-7a morphologische Veränderungen induzieren, die der von TM-Agrin vermittelten Reorganisation des axonalen Zytoskeletts ähnlich waren (Hall et al., 2000). So bewirkt sowohl konditioniertes Medium von Körnerzellen als auch lösliches WNT-7a die Ausbildung filopodienartiger Fortsätze und Verzweigungen auf Axonen sowie eine Vergrößerung der Wachstumskegel. Außerdem beobachtet man eine Aggregation des präsynaptischen Proteins Synapsin I an axonalen Nervenendigungen, was auf eine Funktion von WNT-7a bei der Ausbildung präsynaptischer Strukturen schließen läßt. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen WNT-7a und Agrin besteht möglicherweise in einer Korezeptorfunktion von Heparansulfatproteoglykanen wie Agrin für Faktoren der WNT-Familie. Letzteres ist bereits in *Drosophila* für bestimmte membrangebundene Heparansulfatproteoglykane wie *sugarless (sgl)* oder *sulfateless (sfl)* beschrieben worden. So führen Störungen der Biosynthese dieser Faktoren zu Beeinträchtigungen der Signaltransduktion von *wingless (wg)*, einem weiteren Mitglied der WNT-Familie (Binari et al., 1997; Haecker et al., 1997; Haerry et al., 1997; Lin und Perrimon, 1999). Daneben bewirken Mutationen des membrangebundenen Heparansulfatproteoglykans *dally* in *Drosophila* einen Phänotyp, der entsprechenden *wg*-Mutanten ähnelt. Außerdem wird *dally* mit dem Korezeptor von *wg*, nämlich Frizzled 2, koexprimiert (Lin und Perrimon, 1999; Tsuda et al., 1999). Heparansulfatproteoglykane wie z.B. Syndecane stellen außerdem Korezeptoren für bestimmte Heparin-bindende Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) oder HB-GAM/Pleiotropin dar (Bernfield et al., 1999). Die in dieser Arbeit beschriebene Aktivierung von TM-Agrin durch anti-Agrin-Antikörper läßt jedoch eine ähnliche Funktion von TM-Agrin als reinen Korezeptor, der lediglich einen Liganden einer weiteren Rezeptorkomponente präsentiert und selbst nicht in der Lage ist, eine Signaltransduktionskaskade zu aktivieren, eher unwahrscheinlich erscheinen. Ein solcher Korezeptor könnte nämlich selbst nicht direkt durch Antikörper aktiviert werden. Eine Aktivierung von TM-Agrin durch Antikörper ließe sich nur mit einer Funktion als Korezeptor vereinbaren, wenn die Bindung des Antikörpers bzw. Liganden eine Konformationsänderung des Korezeptors bewirkt, die letztendlich zur Aktivierung einer signalweiterleitenden

Rezeptorkomponente führt. Weitere funktionelle Experimente wie etwa die selektive Inaktivierung von TM-Agrin sind notwendig, um eine mögliche Rezeptorfunktion zu klären.

Andere Arbeiten zeigen, daß eine Bildung filopodienartiger Fortsätze oder Dornen auf RGC-Axonon durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (McCaig, 1990; Williams et al., 1995) oder den Kontakt des Wachstumskegels mit kollapsinduzierenden Substanzen wie Ephrin-A2 oder Ephrin-A5 bzw. durch mechanische Reizung induziert werden kann (Davenport et al., 1999). Dabei wird offensichtlich das Signal, das schließlich zur Bildung der Dornen führt, vom Wachstumskegel an weiter proximale Bereiche auf der Axonoberfläche weitergeleitet. Der größte Anteil der in diesem Fall gebildeten Dornen ähnelt Filopodien, nur ein geringerer Anteil hat eine lamellipodienartige Struktur. Damit ähneln die von Davenport et al. (1999) beschriebenen Dornen sowohl in der Kinetik ihrer Entstehung als auch in ihrer Morphologie den durch anti-Agrin-Antiseren induzierten Mikrodornen. Außerdem zeigen die von Davenport et al. (1999) beschriebenen Dornen eine hohe Dynamik und bilden zwischenzeitlich wachstumskegelartige Strukturen aus, die jedoch wie die durch anti-Agrin-Antiseren induzierten Mikrodornen meist nur in geringem Maße weiter wachsen, weil offensichtlich entsprechende wachstumsfördernde oder attraktive Substanzen im Kultursystem fehlen. In Analogie zu den bei Davenport et al. (1999) beobachteten Dornen könnte die physiologische Funktion einer Bildung von Mikrodornen *in vivo* darin bestehen, daß neue axonale Verzweigungen in einem gewissen Abstand vom Wachstumskegel gebildet werden. Es bleibt allerdings zu erwähnen, daß die Bildung der bei Davenport et al. (1999) beschriebenen Fortsätze durch einen Kollaps des Wachstumskegels induziert wurde. Die Bildung von Mikrodornen durch anti-Agrin-Antiseren hatte dagegen einen genau gegenteiligen Effekt, nämlich eine Vergrößerung und Stabilisierung der Wachstumskegel.

Eine weitere wesentliche Frage ist, ob die in dieser Arbeit untersuchten axonalen Mikrodornen eine Ähnlichkeit mit den auf Dendriten zu beobachtenden Filopodien aufweisen. Während des Wachstums bilden Dendriten zahlreiche ca. 10 µm lange Filopodien, die den Ausgangspunkt für die Bildung von Dornensynapsen mit Axonen in der Umgebung darstellen (Wong und Wong, 2000). Diese Filopodien sind in dieser frühen Phase der Entwicklung hochdynamisch (Dailey und Smith, 1996; Dunaevsky et al., 1999; Ziv und Smith, 1996) und bilden sich erst später zu den immobilen und wesentlich kürzeren, ca. 1 µm langen dendritischen Dornen zurück. Diese postsynaptischen Dornen entwickeln sich in der Folge meist zu Synapsen und assoziieren mit präsynaptischen Strukturen des Axons (Papa et al., 1995; Saito et al., 1997; Fiala et al., 1998). Im Vergleich zu ihren Vorläufern, den Filopodien, ist ihre Dynamik wesentlich eingeschränkt, um stabile synaptische Strukturen zu

gewährleisten (Dailey und Smith, 1996; Ziv und Smith, 1996). Die Bildung dendritischer Filopodien kann durch exogene Zugabe von Glutamat (Smith und Jahr, 1992) oder durch lokale NMDA-Rezeptor-vermittelte Stimulation induziert werden (Engert und Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999). Dies legt nahe, daß Axone in der Nähe der Dendriten früh in der Entwicklung die Bildung dendritischer Filopodien bzw. Dornen induzieren können, was den ersten Schritt zur Bildung synaptischer Strukturen darstellt. Wie die in dieser Arbeit untersuchten Mikrodornen beinhalten die dendritischen Filopodien bzw. Dornen in erster Linie Aktin-Filamente und keine Mikrotubuli (Matus et al., 1982; Markham und Fifkova, 1986; Fiala et al., 1998). Außerdem verringert sich die Dynamik nach Inkubation mit entsprechenden, die Aktin-Polymerisation inhibierenden Substanzen (Fischer et al., 1998; Dunaevsky et al., 1999; Matus, 1999). Die Bildung der dendritischen Filopodien und Dornen hängt außerdem intrazellulär von kleinen GTPasen wie Rac und Rho (Wong et al., 2000) sowie von Kalzium ab (Korkotian und Segal, 1999). Diese Vergleiche zeigen, daß die in dieser Arbeit untersuchten Mikrodornen und dendritischen Filopodien bzw. Dornen sowohl auf struktureller als auch mechanistischer Ebene durchaus gewisse Homologien zeigen. Eine dendritischen Dornen vergleichbare Funktion der axonalen Mikrodornen bei der Synapsenbildung konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. Filopodienartige Strukturen können also im Organismus trotz ihrer strukturellen Verwandtschaft möglicherweise unterschiedlichste physiologische Funktionen erfüllen.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Experimente zur Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade der durch TM-Agrin vermittelten Bildung von Mikrodornen durchgeführt. Dabei stand zunächst die Rolle von Kalzium bei der Bildung der Mikrodornen im Vordergrund. Eine Inkubation der Kulturen mit BAPTA-AM, das intrazellulär in den starken Kalzium-Chelator BAPTA gespalten wird (Tsien, 1980), bzw. Kobaltchlorid, einem unselektiven Blocker von Kalziumkanälen (Hille, 1992), bewirkten eine Hemmung der Bildung von Mikrodornen. Dies zeigt eine Abhängigkeit der Mikrodornenbildung auf Axonen sowohl von der intrazellulären Kalziumkonzentration als auch von einem Einstrom von Kalzium aus dem Kulturmedium. Die Mikrodornenbildung ist also wie viele andere zelluläre Prozesse, die zu einer Reorganisation des Zytoskeletts führen wie z.B. die Bildung dendritischer Filopodien oder Dornen (Korkotian und Segal, 1999), ebenfalls kalziumabhängig.

Eine Inkubation von RGC-Axonen mit Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) und Tyrosin-Proteinphosphatasen, Staurosporin bzw. Pervanadat, zeigte keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung von Mikrodornen. Eine Hemmung von PKC oder

Proteinphosphatasen hat also prinzipiell keinen Einfluß auf die Bildung von Mikrodornen. Dies steht im Gegensatz zum Mechanismus der Agrin-induzierten AChR-Aggregation an der NMJ, die sowohl von PKC als auch von Tyrosin-Proteinphosphatasen abhängig ist (Wallace, 1994, 1995; Meier et al., 1995). Ein unterschiedlicher Mechanismus der Agrin-induzierten AChR-Aggregation an der NMJ und der durch TM-Agrin vermittelten Bildung von Mikrodornen wurde außerdem durch die Beobachtung bestätigt, daß das Polyanion Heparin nicht in der Lage war, signifikant die Bildung von Mikrodornen zu inhibieren. Heparin bindet an das A4-Peptid innerhalb der G2-Domäne im C-terminalen Bereich von Agrin und hemmt die durch das Protein vermittelte AChR-Aggregation auf kultivierten Muskelfasern (Gesemann et al., 1996). Daneben inhibiert Heparin die Bindung von Agrin an das membranassoziierte Protein α -Dyotroglykan (Campanelli et al., 1994; Gee et al., 1994; Sugiyama et al., 1994). Da der C-Terminus der beiden N-terminalen Isoformen von NtA- und TM-Agrin identisch ist, sollte Heparin also prinzipiell auch an TM-Agrin binden können. Diese Bindung führt jedoch, wie erwähnt, nicht zur Inhibition der durch TM-Agrin vermittelten Mikrodornenbildung im ZNS. Zusammenfassend kann gefolgert werden, daß Agrin an der NMJ über eine andere intrazelluläre Signaltransduktionskaskade wirkt, als bei der Bildung von Mikrodornen.

Im Zusammenhang mit der Bildung von Mikrodornen stellt sich die Frage, wie TM-Agrin *in vivo* aktiviert werden könnte. Theoretisch besteht die Möglichkeit, daß TM-Agrin als Rezeptor fungiert und von einem noch unbekanntem Liganden aktiviert wird. Ein Proteinextrakt aus dem Hirn von E6-Hühnerembryonen, der in erster Linie membranassoziierte Proteine enthielt, war in der Lage einen ähnlichen Effekt zu induzieren wie die verwendeten anti-Agrin-Antiseren. Zwar konnte durch den Proteinextrakt nur eine im Vergleich zum Antiserum geringere Anzahl von Mikrodornen auf RGC-Axonon induziert werden, jedoch war diese Anzahl im Vergleich zu Kontrollkulturen signifikant erhöht. Außerdem unterschieden sich die durch den Proteinextrakt und die Antiseren induzierten Mikrodornen morphologisch nicht. So war beispielsweise kein Unterschied in der Länge der Mikrodornen festzustellen. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, daß der Proteinextrakt einen noch unbekanntem Liganden enthält, der *in vivo* den von TM-Agrin vermittelten physiologischen Effekt im ZNS auslösen könnte.

Aus den oben diskutierten experimentellen Befunden läßt sich folgender möglicher Mechanismus der durch TM-Agrin vermittelten Bildung von Mikrodornen ableiten (s. Abb. 34). Es ist davon auszugehen, daß anti-Agrin-Antikörper, wie erwähnt, eine Di- bzw. Multimerisierung von TM-Agrin-Molekülen auf der axonalen Oberfläche induzieren können.

Dies könnte zu einer Aktivierung von TM-Agrin führen, das in diesem Prozeß als Rezeptor für einen noch unbekanntem Liganden wirkt. Eine vergleichbare Aktivierung durch Dimerisierung mittels Antikörper wurde bereits in vielen Systemen beschrieben. Beispielsweise kann auch die an der Agrin-induzierten AChR-Aggregation beteiligte Rezeptortyrosinkinase MuSK mit Antikörpern aktiviert werden, wobei auch hier eine Inkubation mit Fab-Fragmenten keine Aktivierung des Rezeptors bewirkt (Hopf und Hoch, 1998). Andere Rezeptortyrosinkinasen wie TrkA (Clary et al., 1994), aber auch Rezeptoren ohne Kinaseaktivität wie Integrine (Yurochko et al., 1992) oder der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI (Ishizaka et al., 1979; Eiseman und Bolen, 1992) sind auf diese Weise ligandenunabhängig aktivierbar.

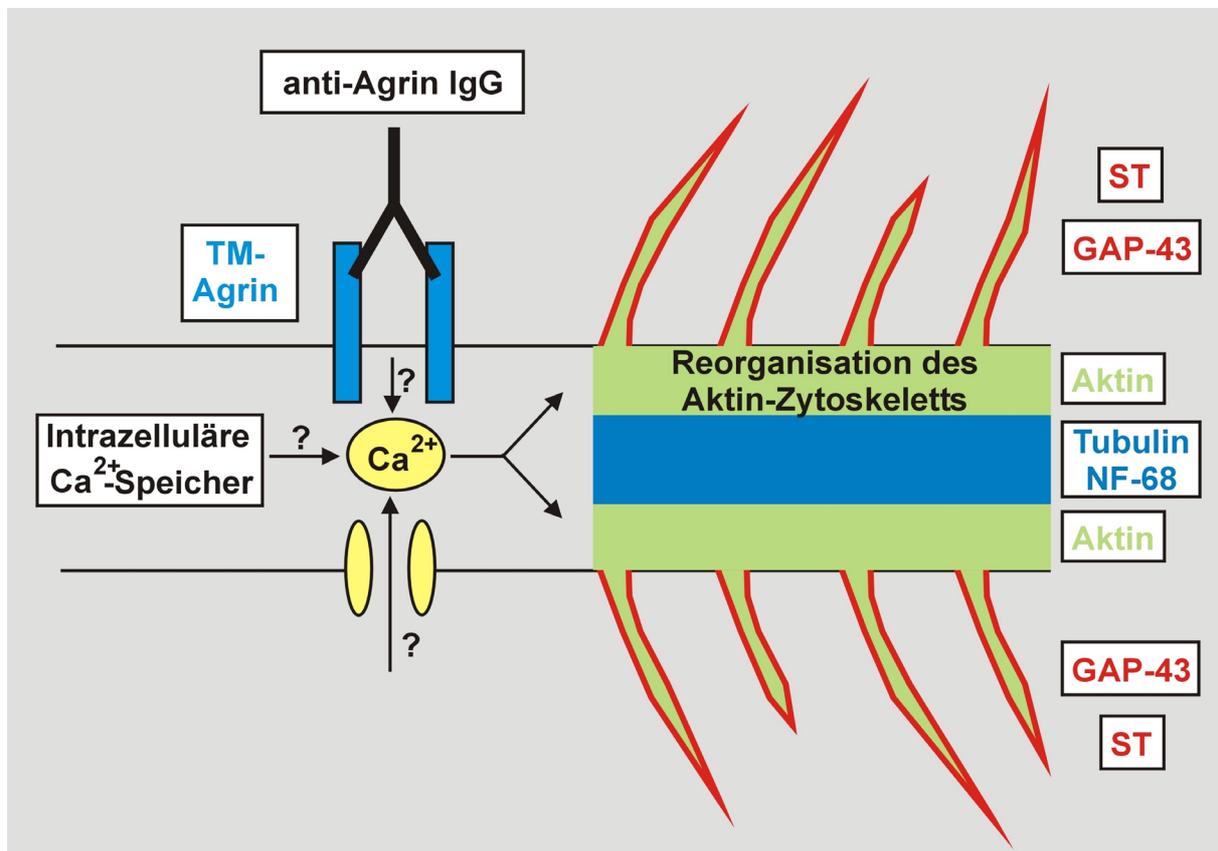


Abb. 34 Potentieller Mechanismus der durch TM-Agrin vermittelten Bildung von Mikrodornen auf Axonen. Anti-Agrin-Antikörper binden an TM-Agrin auf der axonalen Oberfläche und führen zu einer Di- oder Multimerisierung von TM-Agrin. Dieser Effekt wird physiologisch möglicherweise von einem noch unbekanntem Liganden bewirkt. Die künstliche Aktivierung von TM-Agrin durch Antikörper führt zur Aktivierung einer kalziumabhängigen Signaltransduktionskaskade, die schließlich die Bildung von Mikrodornen induziert. Diese enthalten neben Aktin-Filamenten die Proteine Synaptotagmin (ST) sowie GAP-43, nicht aber Neurofilament 68 (NF 68) und β -Tubulin.

Die Aktivierung von TM-Agrin könnte eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade auslösen, die eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels durch Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern oder durch einen Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Milieu bewirkt. In diesem Zusammenhang ist jedoch bisher nicht geklärt, wie die Aktivierung von TM-Agrin zur Auslösung der nachgeschalteten kalziumabhängigen intrazellulären Signaltransduktionskaskade führt, insbesondere weil die relativ kurze intrazelluläre Domäne von Agrin keine Homologie zu Bindungsstellen für bekannte intrazelluläre Signalmoleküle oder Phosphorylierungsstellen aufweist (Neumann et al., 2001). Einen Bestandteil der potentiellen Signaltransduktionskaskade stellt möglicherweise eine Gruppe sogenannter kleiner Rho Guanosintriphosphasen (Rho GTPasen) dar, zu denen die zytoplasmatischen Proteine Rho, Rac und Cdc42 gehören. Diese sind allgemein an Signaltransduktionsprozessen von Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Insbesondere die Aktivierung von Cdc42 in Axonen führt zur Bildung filopodienartiger Strukturen (Kozma et al., 1995; Nobes und Hall, 1995). Rho GTPasen fungieren als molekulare Schalter, die in einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand existieren. Die Aktivität der Rho GTPasen wird dabei von Faktoren gesteuert, die die GTP-GDP-Austauschrate der Proteine beeinflussen. So verstärken Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs) den Austausch von GDP durch GTP und damit die Aktivierung der Rho GTPasen. GTPase aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren dagegen die GTPase Aktivität der Rho GTPasen, was zu deren Inaktivierung führt (Hall, 1998; Kjøller und Hall, 1999). Interessanterweise aktiviert Agrin auch an der NMJ die kleinen GTPasen Rac und Cdc42, wobei eine Inaktivierung zur Hemmung der AChR-Aggregation führt (Weston et al., 2000). Weitere Untersuchungen zum Nachweis einer ähnlichen Signaltransduktionskaskade bei der Bildung von Mikrodornen nach einer Aktivierung von TM-Agrin sind notwendig.

Filopodienartige Strukturen wie die in dieser Arbeit beschriebenen Mikrodornen stellen im sich entwickelnden Nervensystem ein weitverbreitetes Merkmal von Neuronen dar und erfüllen unterschiedlichste Funktionen, insbesondere während des axonalen Wachstums. Die Beteiligung von Agrin an der Ausbildung solcher Strukturen und damit verbunden ein Einfluß auf die Bildung axonaler Verzweigungen oder Kollateralen eröffnet neue Möglichkeiten für das Verständnis der Funktion von Agrin im ZNS.

7. Zusammenfassung

Die Expression von Agrin früh in der Embryonalentwicklung hat zu der Hypothese geführt, daß Agrin eine Rolle beim axonalen Wachstum spielen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese in Ganglienzellen der embryonalen Hühnerretina (RGCs) untersucht.

RGCs verschiedener Entwicklungsstadien exprimierten verschiedene Agrin Isoformen. Einzelne RGCs waren in der Lage, gleichzeitig mehrere Agrin-Isoformen zu exprimieren. Alle diese Isoformen wurden nicht als lösliche Matrixproteine sekretiert, sondern als Transmembran-Heparansulfatproteoglykane synthetisiert.

RGC-assoziiertes TM-Agrin war nicht in der Lage, auf kultivierten Muskelfasern AChR-Aggregate zu induzieren. Auch die exogene Zugabe von Agrin konnte im Bereich der Kontaktstellen zwischen RGC-Axonon und Muskelfasern kaum AChR-Aggregate induzieren. Da TM-Agrin grundsätzlich AChR-Aggregationsaktivität besitzt, scheint deshalb ein RGC-assoziiertes Faktor die AChR-Aggregation zu inhibieren.

Verschiedene anti-Agrin-Antiseren induzierten auf wachsenden RGC-Axonon konzentrations- und zeitabhängig ca. 4,0 bis 4,5 μm lange Fortsätze, sogenannte Mikrodornen. Die Bildung der Mikrodornen war nicht substratabhängig und auf Axonen verschiedener Neurone des ZNS und PNS zu beobachten. Die Mikrodornen entstanden vermutlich aufgrund einer Aktivierung der Transmembranform von Agrin mit bivalenten Antikörpern. Zeitraffer-Videomikroskopie zeigte, daß die Mikrodornen hochdynamisch waren und zwischenzeitlich wachstumskegelartige Strukturen ausbildeten. Die Mikrodornen ähnelten morphologisch und biochemisch Filopodien. Die Bildung von Mikrodornen war abhängig von Kalzium. Dagegen fand sich keine direkte Abhängigkeit der Mikrodornenbildung von Proteinkinase C (PKC), Tyrosinphosphatasen oder Heparin. Da die Agrin-induzierte AChR-Aggregation an der NMJ von diesen Faktoren abhängt, wird die durch TM-Agrin vermittelte Bildung von Mikrodornen in ZNS und die von sezerniertem Agrin induzierte AChR-Aggregation an der NMJ durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen. Die induzierten Mikrodornen waren stabil gegenüber einer Behandlung mit Wachstumskegelkollaps-induzierenden Substanzen.

Da auch membranhaltige Proteinextrakte aus dem Gehirn Mikrodornen induzieren konnten, ist davon auszugehen, daß die in dieser Arbeit beschriebenen durch TM-Agrin induzierten Mikrodornen physiologisch Vorläufer von axonalen Verzweigungen oder Kollateralen darstellen, die dem Auffinden des Zielgebietes der wachsenden Axone dienen.

Dieser hier erstmalig beschriebene Einfluß von Agrin auf strukturelle Veränderungen des axonalen Zytoskeletts während des axonalen Wachstums ist ein Schritt zu einem besseren Verständnis der Funktion von Agrin im sich entwickelnden ZNS.

8. Literatur

- Apel,E.D., Glass,D.J., Moscoso,L.M., Yancopoulos,G.D. & Sanes,J.R. (1997) Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron*, **18**, 623-635.
- Argiro,V., Bunge,M.B. & Johnson,M.I. (1984) Correlation between growth form and movement and their dependence on neuronal age. *J.Neurosci.*, **4**, 3051-3062.
- Austin,C.P., Feldman,D.E., Ida,J.A. & Cepko,C.L. (1995) Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development*, **121**, 3637-3650.
- Barres,B.A., Silverstein,B.E., Corey,D.P. & Chun,L.L. (1988) Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron*, **1**, 791-803.
- Bernfield,M., Gotte,M., Park,P.W., Reizes,O., Fitzgerald,M.L., Lincecum,J. & Zako,M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu.Rev.Biochem.*, **68**, 729-777.
- Binari,R.C., Staveley,B.E., Johnson,W.A., Godavarti,R., Sasisekharan,R. & Manoukian,A.S. (1997) Genetic evidence that heparin-like glycosaminoglycans are involved in wingless signaling. *Development*, **124**, 2623-2632.
- Bloch,R.J. & Morrow,J.S. (1989) An unusual beta-spectrin associated with clustered acetylcholine receptors. *J.Cell Biol.*, **108**, 481-493.
- Böse,C.M., Qiu,D., Bergamaschi,A., Gravante,B., Bossi,M., Villa,A., Rupp,F. & Malgaroli,A. (2000) Agrin controls synaptic differentiation in hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, **20**, 9086-9095.
- Bovolenta,P. & Mason,C. (1987) Growth cone morphology varies with position in the developing mouse visual pathway from retina to first targets. *J.Neurosci.*, **7**, 1447-1460.
- Burden,S.J., Sargent,P.B. & McMahan,U.J. (1979) Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. *J.Cell Biol.*, **82**, 412-425.
- Burden,S.J., DePalma,R.L. & Gottesman,G.S. (1983) Crosslinking of proteins in acetylcholine receptor-rich membranes: association between the beta-subunit and the 43 kd subsynaptic protein. *Cell*, **35**, 687-692.
- Burgess,R.W., Skarnes,W.C. & Sanes,J.R. (2000) Agrin isoforms with distinct amino termini. Differential expression, localization, and function. *J.Cell Biol.*, **151**, 41-52.
- Campagna,J.A., Ruegg,M.A. & Bixby,J.L. (1997) Evidence that agrin directly influences presynaptic differentiation at neuromuscular junctions in vitro. *Eur.J.Neurosci.*, **9**, 2269-2283.
- Campanelli,J.T., Roberds,S.L., Campbell,K.P. & Scheller,R.H. (1994) A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin- induced AChR clustering. *Cell*, **77**, 663-674.
- Campenot,R.B., Walji,A.H. & Draker,D.D. (1991) Effects of sphingosine, staurosporine, and phorbol ester on neurites of rat sympathetic neurons growing in compartmented cultures. *J.Neurosci.*, **11**, 1126-1139.
- Chomczynski,P. & Sacchi,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, **162**, 156-159.

- Clary,D.O., Weskamp,G., Austin,L.R. & Reichardt,L.F. (1994) TrkA cross-linking mimics neuronal responses to nerve growth factor. *Mol.Biol.Cell*, **5**, 549-563.
- Dailey,M.E. & Smith,S.J. (1996) The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J.Neurosci.*, **16**, 2983-2994.
- Davenport,R.W., Thies,E. & Cohen,M.L. (1999) Neuronal growth cone collapse triggers lateral extensions along trailing axons. *Nat.Neurosci.*, **2**, 254-259.
- Debus,E., Weber,K. & Osborn,M. (1983) Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation*, **25**, 193-203.
- DeChiara,T.M., Bowen,D.C., Valenzuela,D.M., Simmons,M.V., Poueymirou,W.T., Thomas,S., Kinetz,E., Compton,D.L., Rojas,E., Park,J.S., Smith,C., DiStefano,P.S., Glass,D.J., Burden,S.J. & Yancopoulos,G.D. (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*, **85**, 501-512.
- DeLong, R.G. & Coulombre, A.J. (1965) Development of the retinotectal topographic projection in the chick embryo. *Exp.Neurol.*, **13**, 351-363.
- Denzer,A.J., Gesemann,M., Schumacher,B. & Ruegg,M.A. (1995) An amino-terminal extension is required for the secretion of chick agrin and its binding to extracellular matrix. *J.Cell Biol.*, **131**, 1547-1560.
- Dorsky,R.I., Chang,W.S., Rapaport,D.H. & Harris,W.A. (1997) Regulation of neuronal diversity in the xenopus retina by delta signalling. *Nature*, **385**, 67-70.
- Drescher,U. (1997) The Eph family in the patterning of neural development. *Curr.Biol.*, **7**, R799-R807.
- Dunaevsky,A., Tashiro,A., Majewska,A., Mason,C. & Yuste,R. (1999) Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 13438-13443.
- Ehrlich,D. (1981) Regional specialization of the chick retina as revealed by the size and density of neurons in the ganglion cell layer. *J.Comp Neurol.*, **195**, 643-657.
- Eiseman,E. & Bolen,J.B. (1992) Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature*, **355**, 78-80.
- Engert,F. & Bonhoeffer,T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, **399**, 66-70.
- Ericson,J., Thor,S., Edlund,T., Jessell,T.M. & Yamada,T. (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science*, **256**, 1555-1560.
- Ferns,M.J., Campanelli,J.T., Hoch,W., Scheller,R.H. & Hall,Z.W. (1993) The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans. *Neuron*, **11**, 491-502.
- Fertuck,H.C. & Salpeter,M.M. (1974) Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **71**, 1376-1378.
- Fiala,J.C., Feinberg,M., Popov,V. & Harris,K.M. (1998) Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J.Neurosci.*, **18**, 8900-8911.
- Fischer,M., Kaech,S., Knutti,D. & Matus,A. (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*, **20**, 847-854.

- Franke, F.E., Schachenmayr, W., Osborn, M. & Altmannsberger, M. (1991) Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am.J.Pathol.*, **139**, 67-79.
- French, P.W. & Jeffrey, P.L. (1986) Partial characterization of chicken Thy-1 glycoprotein by monoclonal antibodies. *J.Neurosci.Res.*, **16**, 479-489.
- Froehner, S.C. (1991) The submembrane machinery for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J.Cell Biol.*, **114**, 1-7.
- Gautam, M., Noakes, P.G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G.C., Sanes, J.R. & Merlie, J.P. (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, **377**, 232-236.
- Gautam, M., Noakes, P.G., Moscoso, L., Rupp, F., Scheller, R.H., Merlie, J.P. & Sanes, J.R. (1996) Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, **85**, 525-535.
- Gee, S.H., Montanaro, F., Lindenbaum, M.H. & Carbonetto, S. (1994) Dystroglycan- α , a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell*, **77**, 675-686.
- Gesemann, M., Denzer, A.J. & Ruegg, M.A. (1995) Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J.Cell Biol.*, **128**, 625-636.
- Gesemann, M., Cavalli, V., Denzer, A.J., Brancaccio, A., Schumacher, B. & Ruegg, M.A. (1996) Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor. *Neuron*, **16**, 755-767.
- Glass, D.J., Bowen, D.C., Stitt, T.N., Radziejewski, C., Bruno, J., Ryan, T.E., Gies, D.R., Shah, S., Mattsson, K., Burden, S.J., DiStefano, P.S., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M. & Yancopoulos, G.D. (1996) Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell*, **85**, 513-523.
- Godfrey, E.W., Nitkin, R.M., Wallace, B.G., Rubin, L.L. & McMahan, U.J. (1984) Components of Torpedo electric organ and muscle that cause aggregation of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J.Cell Biol.*, **99**, 615-627.
- Godfrey, E.W., Dietz, M.E., Morstad, A.L., Wallskog, P.A. & Yorde, D.E. (1988a) Acetylcholine receptor-aggregating proteins are associated with the extracellular matrix of many tissues in Torpedo. *J.Cell Biol.*, **106**, 1263-1272.
- Godfrey, E.W., Siebenlist, R.E., Wallskog, P.A., Walters, L.M., Bolender, D.L. & Yorde, D.E. (1988b) Basal lamina components are concentrated in premuscle masses and at early acetylcholine receptor clusters in chick embryo hindlimb muscles. *Dev.Biol.*, **130**, 471-486.
- Godfrey, E.W. (1991) Comparison of agrin-like proteins from the extracellular matrix of chicken kidney and muscle with neural agrin, a synapse organizing protein. *Exp.Cell Res.*, **195**, 99-109.
- Goodman, C.S. (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu.Rev.Neurosci.*, **19**, 341-377.
- Gozes, I. & Barnstable, C.J. (1982) Monoclonal antibodies that recognize discrete forms of tubulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **79**, 2579-2583.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.*, **36**, 59-74.

- Groffen,A.J., Buskens,C.A., van Kuppevelt,T.H., Veerkamp,J.H., Monnens,L.A. & van den Heuvel,L.P. (1998) Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *Eur.J.Biochem.*, **254**, 123-128.
- Haecker,U., Lin,X. & Perrimon,N. (1997) The *Drosophila* sugarless gene modulates Wingless signaling and encodes an enzyme involved in polysaccharide biosynthesis. *Development*, **124**, 3565-3573.
- Haerry,T.E., Heslip,T.R., Marsh,J.L. & O'Connor,M.B. (1997) Defects in glucuronate biosynthesis disrupt wingless signaling in *drosophila*. *Development*, **124**, 3055-3064.
- Halfter,W., Newgreen,D.F., Sauter,J. & Schwarz,U. (1983) Oriented axon outgrowth from avian embryonic retinæ in culture. *Dev.Biol.*, **95**, 56-64.
- Halfter,W., Deiss,S. & Schwarz,U. (1985) The formation of the axonal pattern in the embryonic avian retina. *J.Comp Neurol.*, **232**, 466-480.
- Halfter,W., Reckhaus,W. & Kröger,S. (1987) Nondirected axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. *J.Neurosci.*, **7**, 3712-3722.
- Halfter,W. (1989) Antisera to basal lamina and glial endfeet disturb the normal extension of axons on retina and pigment epithelium basal laminae. *Development*, **107**, 281-297.
- Halfter,W. (1993) A heparan sulfate proteoglycan in developing avian axonal tracts. *J.Neurosci.*, **13**, 2863-2873.
- Halfter,W., Schurer,B., Yip,J., Yip,L., Tsen,G., Lee,J.A. & Cole,G.J. (1997) Distribution and substrate properties of agrin, a heparan sulfate proteoglycan of developing axonal pathways. *J.Comp Neurol.*, **383**, 1-17.
- Halfter,W. (1998) Disruption of the retinal basal lamina during early embryonic development leads to a retraction of vitreal end feet, an increased number of ganglion cells, and aberrant axonal outgrowth. *J.Comp Neurol.*, **397**, 89-104.
- Halfter,W., Dong,S., Schurer,B., Osanger,A., Schneider,W., Ruegg,M. & Cole,G.J. (2000) Composition, synthesis, and assembly of the embryonic chick retinal basal lamina. *Dev.Biol.*, **220**, 111-128.
- Hall,A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Hall,A.C., Lucas,F.R. & Salinas,P.C. (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*, **100**, 525-535.
- Hamill,O.P., Marty,A., Neher,E., Sakmann,B. & Sigworth,F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, **391**, 85-100.
- Harris,W.A. & Holt,C.E. (1990) Early events in the embryogenesis of the vertebrate visual system: cellular determination and pathfinding. *Annu.Rev.Neurosci.*, **13**, 155-169.
- Hering,H. & Kröger,S. (1996) Formation of synaptic specializations in the inner plexiform layer of the developing chick retina. *J.Comp Neurol.*, **375**, 393-405.
- Hering,H. & Kröger,S. (1999) Synapse formation and agrin expression in stratospheroid cultures from embryonic chick retina. *Dev.Biol.*, **214**, 412-428.

- Hering,H., Koulen,P. & Kröger,S. (2000) Distribution of the integrin beta 1 subunit on radial cells in the embryonic and adult avian retina. *J.Comp Neurol.*, **424**, 153-164.
- Herrmann,R., Straub,V., Blank,M., Kutzick,C., Franke,N., Jacob,E.N., Lenard,H.G., Kröger,S. & Voit,T. (2000) Dissociation of the dystroglycan complex in caveolin-3-deficient limb girdle muscular dystrophy. *Hum.Mol.Genet.*, **9**, 2335-2340.
- Hille,B. (1992) Ion channels of excitable membranes. *Sinauer Associates, Sunderland*.
- Hoch,W., Ferns,M., Campanelli,J.T., Hall,Z.W. & Scheller,R.H. (1993) Developmental regulation of highly active alternatively spliced forms of agrin. *Neuron*, **11**, 479-490.
- Hopf,C. & Hoch,W. (1996) Agrin binding to alpha-dystroglycan. Domains of agrin necessary to induce acetylcholine receptor clustering are overlapping but not identical to the alpha-dystroglycan-binding region. *J.Biol.Chem.*, **271**, 5231-5236.
- Hopf,C. & Hoch,W. (1998) Dimerization of the muscle-specific kinase induces tyrosine phosphorylation of acetylcholine receptors and their aggregation on the surface of myotubes. *J.Biol.Chem.*, **273**, 6467-6473.
- Ishida,A.T. (1995) Ion channel components of retinal ganglion cells. *Prog. Ret. Eye Res.*, **15**, 261-280.
- Ishizaka,T., Foreman,J.C., Sterk,A.R. & Ishizaka,K. (1979) Induction of calcium flux across the rat mast cell membrane by bridging IgE receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **76**, 5858-5862.
- Kabayama,H., Takei,K., Fukuda,M., Ibata,K. & Mikoshiba,K. (1999) Functional involvement of synaptotagmin I/II C2A domain in neurite outgrowth of chick dorsal root ganglion neuron. *Neuroscience*, **88**, 999-1003.
- Kjøller,L. & Hall,A. (1999) Signaling to Rho GTPases. *Exp.Cell Res.*, **253**, 166-179.
- Korkotian,E. & Segal,M. (1999) Release of calcium from stores alters the morphology of dendritic spines in cultured hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**, 12068-12072.
- Koulen,P., Honig,L.S., Fletcher,E.L. & Kröger,S. (1999) Expression, distribution and ultrastructural localization of the synapse-organizing molecule agrin in the mature avian retina. *Eur.J.Neurosci.*, **11**, 4188-4196.
- Kozma,R., Ahmed,S., Best,A. & Lim,L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol.Cell Biol.*, **15**, 1942-1952.
- Kröger,S. & Niehörster,L. (1990) Isolation, characterization, and substrate properties of the external limiting membrane from the avian embryonic optic tectum. *J.Neurosci.Res.*, **27**, 169-183.
- Kröger,S. & Schwarz,U. (1990) The avian tectobulbar tract: development, explant culture, and effects of antibodies on the pattern of neurite outgrowth. *J.Neurosci.*, **10**, 3118-3134.
- Kröger,S., Horton,S.E. & Honig,L.S. (1996) The developing avian retina expresses agrin isoforms during synaptogenesis. *J.Neurobiol.*, **29**, 165-182.
- Kröger,S. & Mann,S. (1996) Biochemical and functional characterization of basal lamina-bound agrin in the chick central nervous system. *Eur.J.Neurosci.*, **8**, 500-509.
- Kröger,S. (1997) Differential Distribution of Agrin Isoforms in the Developing and Adult Avian Retina. *Mol.Cell Neurosci.*, **10**, 149-161.

- Lehwalder,D., Jeffrey,P.L. & Unsicker,K. (1989) Survival of purified embryonic chick retinal ganglion cells in the presence of neurotrophic factors. *J.Neurosci.Res.*, **24**, 329-337.
- Li,Z., Hilgenberg,L.G., O'Dowd,D.K. & Smith,M.A. (1999) Formation of functional synaptic connections between cultured cortical neurons from agrin-deficient mice. *J.Neurobiol.*, **39**, 547-557.
- Lieth,E. & Fallon,J.R. (1993) Muscle agrin: neural regulation and localization at nerve-induced acetylcholine receptor clusters. *J.Neurosci.*, **13**, 2509-2514.
- Lin,X. & Perrimon,N. (1999) Dally cooperates with Drosophila Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature*, **400**, 281-284.
- Löschinger,J., Bandtlow,C.E., Jung,J., Klostermann,S., Schwab,M.E., Bonhoeffer,F. & Kater,S.B. (1997) Retinal axon growth cone responses to different environmental cues are mediated by different second-messenger systems. *J.Neurobiol.*, **33**, 825-834.
- Ma,E., Morgan,R. & Godfrey,E.W. (1994) Distribution of agrin mRNAs in the chick embryo nervous system. *J.Neurosci.*, **14**, 2943-2952.
- Magill-Solc,C. & McMahan,U.J. (1988) Motor neurons contain agrin-like molecules. *J.Cell Biol.*, **107**, 1825-1833.
- Maletic-Savatic,M., Malinow,R. & Svoboda,K. (1999) Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, **283**, 1923-1927.
- Mann,S. & Kröger,S. (1996) Agrin is synthesized by retinal cells and colocalizes with gephyrin. *Mol.Cell Neurosci.*, **8**, 1-13.
- Markham,J.A. & Fikova,E. (1986) Actin filament organization within dendrites and dendritic spines during development. *Brain Res.*, **392**, 263-269.
- Matthes,T. & Dighiero,G. (1988) Detection of private and recurrent idiotopes on natural anti-tubulin antibodies by monoclonal anti-idiotopic antibodies. *J.Immunol.*, **140**, 148-154.
- Matus,A., Ackermann,M., Pehling,G., Byers,H.R. & Fujiwara,K. (1982) High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **79**, 7590-7594.
- Matus,A. (1999) Postsynaptic actin and neuronal plasticity. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **9**, 561-565.
- McCaig,C.D. (1990) Nerve branching is induced and oriented by a small applied electric field. *J.Cell Sci.*, **95**, 605-615.
- McGraw,C.F. & McLaughlin,B.J. (1980) Fine structural studies of synaptogenesis in the superficial layers of the chick optic tectum. *J.Neurocytol.*, **9**, 79-93.
- McMahan,U.J., Sanes,J.R. & Marshall,L.M. (1978) Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature*, **271**, 172-174.
- McMahan,U.J. (1990) The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, **55**, 407-418.
- Meier,T., Perez,G.M. & Wallace,B.G. (1995) Immobilization of nicotinic acetylcholine receptors in mouse C2 myotubes by agrin-induced protein tyrosine phosphorylation. *J.Cell Biol.*, **131**, 441-451.
- Meier,T., Marangi,P.A., Moll,J., Hauser,D.M., Brenner,H.R. & Ruegg,M.A. (1998) A minigene of neural agrin encoding the laminin-binding and acetylcholine receptor-aggregating domains is sufficient to induce postsynaptic differentiation in muscle fibres. *Eur.J.Neurosci.*, **10**, 3141-3152.

- Meiri,K.F., Pfenninger,K.H. & Willard,M.B. (1986) Growth-associated protein, GAP-43, a polypeptide that is induced when neurons extend axons, is a component of growth cones and corresponds to pp46, a major polypeptide of a subcellular fraction enriched in growth cones. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **83**, 3537-3541.
- Meiri,K.F., Bickerstaff,L.E. & Schwob,J.E. (1991) Monoclonal antibodies show that kinase C phosphorylation of GAP-43 during axonogenesis is both spatially and temporally restricted in vivo. *J.Cell Biol.*, **112**, 991-1005.
- Mey,J. & Thanos,S. (2000) Development of the visual system of the chick. I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Res.Rev.*, **32**, 343-379.
- Meyer,G. & Wallace,B.G. (1998) Recruitment of a nicotinic acetylcholine receptor mutant lacking cytoplasmic tyrosine residues in its beta subunit into agrin-induced aggregates. *Mol.Cell Neurosci.*, **11**, 324-333.
- Neumann,F.R., Bittcher,G., Annies,M., Schumacher,B., Kröger,S. & Ruegg,M.A. (2001) An alternative amino-terminus expressed in the central nervous system converts agrin to a type II transmembrane protein. *Mol.Cell Neurosci.*, **17**, 208-225.
- Nishiyama,I. & Fujii,T. (1992) Laminin-induced process outgrowth from isolated fetal rat C-cells. *Exp.Cell Res.*, **198**, 214-220.
- Nitkin,R.M., Smith,M.A., Magill,C., Fallon,J.R., Yao,Y.M., Wallace,B.G. & McMahan,U.J. (1987) Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J.Cell Biol.*, **105**, 2471-2478.
- Nobes,C.D. & Hall,A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**, 53-62.
- Papa,M., Bundman,M.C., Greenberger,V. & Segal,M. (1995) Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J.Neurosci.*, **15**, 1-11.
- Perin,M.S., Fried,V.A., Mignery,G.A., Jahn,R. & Südhof,T.C. (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, **345**, 260-263.
- Prior,P., Schmitt,B., Grenningloh,G., Pribilla,I., Multhaup,G., Beyreuther,K., Maulet,Y., Werner,P., Langosch,D., Kirsch,J. & Betz,H. (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron*, **8**, 1161-1170.
- Pumiglia,K.M., Lau,L.F., Huang,C.K., Burroughs,S. & Feinstein,M.B. (1992) Activation of signal transduction in platelets by the tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate (vanadyl hydroperoxide). *Biochem.J.*, **286**, 441-449.
- Rager,G. & von Oeynhaus,B. (1979) Ingrowth and ramification of retinal fibers in the developing optic tectum of the chick embryo. *Exp.Brain Res.*, **35**, 213-227.
- Reist,N.E., Magill,C. & McMahan,U.J. (1987) Agrin-like molecules at synaptic sites in normal, denervated, and damaged skeletal muscles. *J.Cell Biol.*, **105**, 2457-2469.
- Reist,N.E., Werle,M.J. & McMahan,U.J. (1992) Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron*, **8**, 865-868.
- Rivas,R.J., Burmeister,D.W. & Goldberg,D.J. (1992) Rapid effects of laminin on the growth cone. *Neuron*, **8**, 107-115.

- Rodieck, R.W. (1988) The primate retina. *Comparative Primate Biology*, **4**, 203-278.
- Ruegg, M.A., Tsim, K.W., Horton, S.E., Kröger, S., Escher, G., Gensch, E.M. & McMahan, U.J. (1992) The agrin gene codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution. *Neuron*, **8**, 691-699.
- Ruegg, U.T. & Burgess, G.M. (1989) Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol.Sci.*, **10**, 218-220.
- Rupp, F., Payan, D.G., Magill-Solc, C., Cowan, D.M. & Scheller, R.H. (1991) Structure and expression of a rat agrin. *Neuron*, **6**, 811-823.
- Russell, W.C., Newman, C. & Williamson, D.H. (1975) A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*, **253**, 461-462.
- Saito, Y., Song, W.J. & Murakami, F. (1997) Preferential termination of corticorubral axons on spine-like dendritic protrusions in developing cat. *J.Neurosci.*, **17**, 8792-8803.
- Saitoh, T. & Dobkins, K.R. (1986) Protein kinase C in human brain and its inhibition by calmodulin. *Brain Res.*, **379**, 196-199.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Sanes, J.R., Marshall, L.M. & McMahan, U.J. (1978) Reinnervation of muscle fiber basal lamina after removal of myofibers. Differentiation of regenerating axons at original synaptic sites. *J.Cell Biol.*, **78**, 176-198.
- Sanes, J.R. & Lichtman, J.W. (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu.Rev.Neurosci.*, **22**, 389-442.
- Serafini, T., Kennedy, T.E., Galko, M.J., Mirzayan, C., Jessell, T.M. & Tessier-Lavigne, M. (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*, **78**, 409-424.
- Serpinskaya, A.S., Feng, G., Sanes, J.R. & Craig, A.M. (1999) Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. *Dev.Biol.*, **205**, 65-78.
- Sheppard, A.M., Konopka, M. & Jeffrey, P.L. (1988) Thy-1 expression in the retinotectal system of the chick. *Brain Res.*, **471**, 49-60.
- Smith, M.A., Magill-Solc, C., Rupp, F., Yao, Y.M., Schilling, J.W., Snow, P. & McMahan, U.J. (1992) Isolation and characterization of a cDNA that encodes an agrin homolog in the marine ray. *Mol.Cell.Neurosci.*, **3**, 406-417.
- Smith, M.A. & O'Dowd, D.K. (1994) Cell-specific regulation of agrin RNA splicing in the chick ciliary ganglion. *Neuron*, **12**, 795-804.
- Smith, S.J. (1988) Neuronal cytomotility: the actin-based motility of growth cones. *Science*, **242**, 708-715.
- Smith, S.J. & Jahr, C.E. (1992) Rapid induction of filopodial sprouting by application of glutamate to hippocampal neurons. *The Nerve Growth Cone, Raven Press*, 19-26.
- Südhof, T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature*, **375**, 645-653.

- Sugiyama,J., Bowen,D.C. & Hall,Z.W. (1994) Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron*, **13**, 103-115.
- Takahashi,M., Arimatsu,Y., Fujita,S., Fujimoto,Y., Kondo,S., Hama,T. & Miyamoto,E. (1991) Protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylate a novel 58-kDa protein in synaptic vesicles. *Brain Res.*, **551**, 279-292.
- Tang,D. & Goldberg,D.J. (2000) Bundling of microtubules in the growth cone induced by laminin. *Mol.Cell Neurosci.*, **15**, 303-313.
- Thanos,S. & Bonhoeffer,F. (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**, 420-430.
- Thanos,S., Vanselow,J. & Mey,J. (1992) Ganglion cells in the juvenile chick retina and their ability to regenerate axons in vitro. *Exp.Eye Res.*, **54**, 377-391.
- Thompson,J.M. & Rapoport,S.I. (1988) Retinal neurons lack an acetylcholine receptor aggregating factor. *Synapse*, **2**, 7-10.
- Tsen,G., Halfter,W., Kröger,S. & Cole,G.J. (1995a) Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J.Biol.Chem.*, **270**, 3392-3399.
- Tsen,G., Napier,A., Halfter,W. & Cole,G.J. (1995b) Identification of a novel alternatively spliced agrin mRNA that is preferentially expressed in non-neuronal cells. *J.Biol.Chem.*, **270**, 15934-15937.
- Tsien,R.Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, **19**, 2396-2404.
- Tsim,K.W., Ruegg,M.A., Escher,G., Kröger,S. & McMahan,U.J. (1992) cDNA that encodes active agrin. *Neuron*, **8**, 677-689.
- Tsuda,M., Kamimura,K., Nakato,H., Archer,M., Staatz,W., Fox,B., Humphrey,M., Olson,S., Futch,T., Kaluza,V., Siegfried,E., Stam,L. & Selleck,S.B. (1999) The cell-surface proteoglycan dally regulates wingless signalling in drosophila. *Nature*, **400**, 276-280.
- Urbanik,E. & Ware,B.R. (1989) Actin filament capping and cleaving activity of cytochalasins B, D, E, and H. *Arch.Biochem.Biophys.*, **269**, 181-187.
- Valenzuela,D.M., Stitt,T.N., DiStefano,P.S., Rojas,E., Mattsson,K., Compton,D.L., Nunez,L., Park,J.S., Stark,J.L., Gies,D.R., Thomas,S., Le Beau,M.M., Fernald,A.A., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., Burden,S.J., Glass,D.J. & Yancopoulos,G.D. (1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*, **15**, 573-584.
- Vanselow,J., Müller,B. & Thanos,S. (1991) Regenerating axons from adult chick retinal ganglion cells recognize topographic cues from embryonic central targets. *Vis.Neurosci.*, **6**, 569-576.
- Wallace,B.G. (1988) Regulation of agrin-induced acetylcholine receptor aggregation by Ca⁺⁺ and phorbol ester. *J.Cell Biol.*, **107**, 267-278.
- Wallace,B.G. (1989) Agrin-induced specializations contain cytoplasmic, membrane, and extracellular matrix-associated components of the postsynaptic apparatus. *J.Neurosci.*, **9**, 1294-1302.
- Wallace,B.G. (1990) Inhibition of agrin-induced acetylcholine-receptor aggregation by heparin, heparan sulfate, and other polyanions. *J.Neurosci.*, **10**, 3576-3582.

- Wallace,B.G. (1992) Mechanism of agrin-induced acetylcholine receptor aggregation. *J.Neurobiol.*, **23**, 592-604.
- Wallace,B.G. (1994) Staurosporine inhibits agrin-induced acetylcholine-receptor phosphorylation and aggregation. *J.Cell Biol.*, **125**, 661-668.
- Wallace,B.G. (1995) Regulation of the interaction of nicotinic acetylcholine receptors with the cytoskeleton by agrin-activated protein tyrosine kinase. *J.Cell Biol.*, **128**, 1121-1129.
- Wässle,H. & Boycott,B.B. (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev.*, **71**, 447-480.
- Weston,C., Yee,B., Hod,E. & Prives,J. (2000) Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *J.Cell Biol.*, **150**, 205-212.
- Williams,C.V., Davenport,R.W., Dou,P. & Kater,S.B. (1995) Developmental regulation of plasticity along neurite shafts. *J.Neurobiol.*, **27**, 127-140.
- Wizenmann,A. & Thanos,S. (1990) The developing chick isthmo-optic nucleus forms a transient efferent projection to the optic tectum. *Neurosci.Lett.*, **113**, 241-246.
- Wong,W.T., Faulkner-Jones,B.E., Sanes,J.R. & Wong,R.O. (2000) Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J.Neurosci.*, **20**, 5024-5036.
- Wong,W.T. & Wong,R.O. (2000) Rapid dendritic movements during synapse formation and rearrangement. *Curr.Opin.Neurobiol.*, **10**, 118-124.
- Yurochko,A.D., Liu,D.Y., Eierman,D. & Haskill,S. (1992) Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **89**, 9034-9038.
- Ziv,N.E. & Smith,S.J. (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, **17**, 91-102.

9. Abkürzungen

AChR	Acetylcholinrezeptor
AraC	Cytosin-1- β -D-arabinofuranosid
BAPTA-AM	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N'N'-tetraessigsäure-tetrakis-(acetoxymethyl)-ester
bp	Basenpaare
BTX	Tetramethylrhodamin- α -bungarotoxin
cDNA	komplementäre Deoxyribonucleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
CEE	Hühnerembryonenextrakt (chick embryo extract)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-Dithio-DL-threit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Deoxyribonucleotid-5'-triphosphat
DRG	Hinterwurzelganglion (dorsal root ganglion)
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EBSS	Earle's Balanced Salts
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
HEK	human embryonic kidney
HS	Pferdeserum (horse serum)
ILM	innere Grenzmembran (inner limiting membrane)
INL	innere Körnerschicht (inner nuclear layer)
IPL	innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer)
kDa	Kilodalton
MEM	Minimal Eagle Medium
Min.	Minuten
MuSK	muskelspezifische Kinase (muscle specific kinase)
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NMJ	neuromuskuläre Endplatte (neuromuscular junction)
OFL	optische Faserschicht (optic fiber layer)
ONL	äußere Körnerschicht (outer nuclear layer)
OPL	äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
RGC	retinale Ganglienzellen (retinal ganglion cells)
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
RT	reverse Transkription
Sek.	Sekunden
SG	sympathische Ganglien (sympathetic ganglia)
Std.	Stunden

TM	Transmembran
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
ZNS	Zentralnervensystem

10. Lebenslauf

Name: Maik Annies
 geboren am: 15.9.1969 in Hattingen
 wohnhaft in: Ingelheimer Str. 22
 60529 Frankfurt a. M.
 Eltern: Ruth Annies, geb. Beckmann
 Herbert Annies

Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1976-1980 Bruchfeld-Grundschule in Hattingen
 1980-1989 Gymnasium Waldstrasse in Hattingen
 1989 Abitur

Zivildienst:

1989-1991 Arbeiter-Samariter-Bund in Hattingen

Hochschulbildung:

10/1991-11/1997 Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum

5/1997-11/1997 Diplomarbeit im Fachbereich Biochemie am Lehrstuhl für molekulare Neurobiochemie von Prof. Dr. R. Heumann mit dem Thema
Strukturelle und funktionelle Untersuchung des GDNF-Rezeptorkomplexes

seit 11/1997 Promotion am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in der neuroanatomischen Abteilung von Prof. Dr. H. Wässle unter Betreuung von Priv. Doz. Dr. S. Kröger mit dem Thema
Funktion und Expression des synapseninduzierenden Proteoglykans Agrin in Ganglienzellen der embryonalen Hühnerretina

Mitglied des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen, Funktionen“

Akademische Lehrer: Prof. Dr. R. Heumann, Prof. Dr. B. Benecke, Prof. Dr. H. Wässle, Priv. Doz. Dr. S. Kröger