

# **Lokalisierung der Fortsatz-induzierenden Domäne von Transmembran-Agrin**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

**„Doktor der Naturwissenschaften“**

am Fachbereich Biologie

der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Elmar Porten

geboren in Trier

Mainz, 2010

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 17.08.2010

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2003 bis April 2007 am Institut für Physiologische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

Annie, M., Bittcher, G., Ramseger, R., Loschinger, J., Wöll, S., Porten, E., Abraham, C., Rugg, M. A., Kröger, S., (2006). Clustering transmembrane-agrin induces filopodia-like processes on axons and dendrites. *Mol. Cell Neurosci.* 31, 515-524.

Porten, E., Seliger, B., Schneider, V. A., Wöll, S., Stangel, D., Ramseger, R., Kröger, S., (2010). The process-inducing activity of transmembrane agrin requires follistatin-like domains. *J Biol. Chem.* 285, 3114-3125.

Weitere Publikationen:

Schröder, J. E., Tegeler, M. R., Grosshans, U., Porten, E., Blank, M., Lee, J., Esapa, C., Blake, D. J., Kröger, S., (2007). Dystroglycan regulates structure, proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the developing vertebrate CNS. *Dev. Biol.* 307, 62-78.

## **Danke**

Ich bedanke mich sehr herzlich bei allen, die zum Gelingen dieser Dissertation in irgendeiner Art und Weise beigetragen haben.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1	DIE STRUKTUR VON AGRIN.....	7
1.2	AGRIN AN DER NEUROMUSKULÄREN ENDPLATTE .....	10
1.3	AGRIN IM ZENTRALNERVENSYSTEM.....	12
1.3.1	<i>Die Funktionen von Agrin während der Synapsenbildung im ZNS.....</i>	<i>12</i>
1.3.2	<i>Nicht-synaptogene Funktionen von Agrin im Zentralnervensystem.....</i>	<i>14</i>
1.4	INDUZIERUNG VON FILOPODIENARTIGEN FORTSÄTZEN AUF NEURONEN DURCH TRANSMEMBRAN-AGRIN .....	16
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
3.1	MATERIAL .....	21
3.1.1	<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>21</i>
3.1.2	<i>Materialien für die Molekularbiologie.....</i>	<i>21</i>
3.1.3	<i>Material für die Zellkultur.....</i>	<i>22</i>
3.1.4	<i>Material für die Immunohistologie.....</i>	<i>23</i>
3.1.5	<i>Material für die Proteinbiochemie .....</i>	<i>23</i>
3.1.6	<i>Antikörper .....</i>	<i>25</i>
3.1.7	<i>Plasmide.....</i>	<i>26</i>
3.1.8	<i>Oligonukleotide.....</i>	<i>28</i>
3.2	METHODEN.....	30
3.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>30</i>
3.2.2	<i>Zellkulturmethoden .....</i>	<i>33</i>
3.2.3	<i>Immunohistologische Methoden.....</i>	<i>36</i>
3.2.4	<i>Proteinbiochemische Methoden .....</i>	<i>38</i>
3.2.5	<i>Statistische Auswertung.....</i>	<i>39</i>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
4.1	VORARBEITEN .....	40
4.2	LOKALISIERUNG DER FORTSATZ-INDUZIERENDEN REGION.....	42
4.2.1	<i>Grobkartierung der Fortsatz-induzierenden Region.....</i>	<i>42</i>
4.2.2	<i>Einfluss der Glycosaminoglycan-Seitenketten auf die Bildung der Fortsätze.....</i>	<i>44</i>
4.2.3	<i>Einfluss der Disulfidbrücke C535-C567 auf den Fortsatz- induzierenden Effekt .....</i>	<i>46</i>
4.2.4	<i>Überexpression von TM-Agrin-Mutationskonstrukten in primären Neuronen .....</i>	<i>48</i>
4.2.5	<i>Funktioneller Ersatz der 7. Follistatin-Domäne .....</i>	<i>49</i>
4.3	INTEGRATION DER TM-AGRIN-KONSTRUKTE IN DIE ZELLMEMBRAN.....	51

4.4	EXPRESSION DER TM-AGRIN-KONSTRUKTE.....	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
5.1	TM-AGRIN MUTATIONSKONSTRUKTE WERDEN GLEICHMÄßIG EXPRIMIERT UND IN DIE ZELLMEMBRAN INTEGRIERT .....	56
5.2	DIE FUNKTION VON TM-AGRIN WÄHREND DER FRÜHEN ZNS-ENTWICKLUNG .....	57
5.3	FOLLISTATIN-DOMÄNEN .....	58
5.4	DIE SIEBTE FOLLISTAIN-DOMÄNE VON TM-AGRIN IST FÜR DIE BILDUNG DER FORTSÄTZE VERANTWORTLICH .....	61
5.5	DIE INDUKTION FILOPODIENARTIGER FORTSÄTZE DURCH TM-AGRIN ERFOLGT ÜBER EINE SIGNALKASKADE.....	64
5.6	PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER FORTSÄTZE .....	68
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>

# 1 Einleitung

Die Entstehung chemischer Synapsen ist einer der wesentlichen Schritte der neuronalen Entwicklung. Sie erlauben die gesteuerte Kommunikation zwischen zwei Neuronen oder zwischen Neuronen und anderen Zellen und sind essentiell für alle wesentlichen Gehirnfunktionen wie z.B. Informationsverarbeitung, Lernen und Gedächtnis. Die synaptische Übertragung setzt die genaue Anreihung von prä- und postsynaptischen Spezialisierungen während der neuronalen Entwicklung voraus.

Die neuromuskuläre Endplatte ist aufgrund ihrer Größe, ihrer Zugänglichkeit *in vivo* sowie ihres relativ einfachen Aufbaus das Modellobjekt für die Erforschung der synaptischen Transmission und Synapsenentwicklung. In zahlreichen Studien während der letzten 30 Jahre wurde das extrazelluläre Matrixprotein Agrin als ein Hauptregulator bei der Entstehung der neuromuskulären Endplatte (NMJ) beschrieben. Zusätzlich dazu gibt es vermehrt Belege für eine Funktion Agrins bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Synapsen im Zentralnervensystem (ZNS).

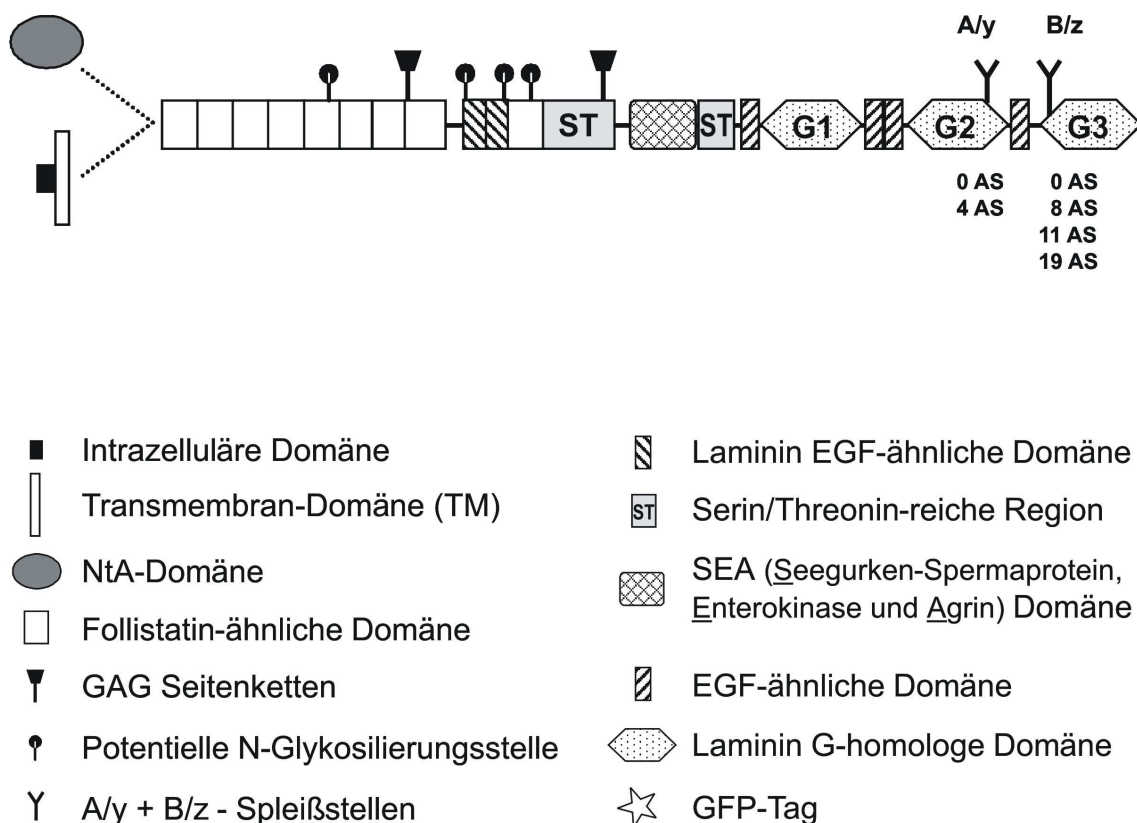
Im Einzelnen soll nun näher auf die Struktur Agrins und seine Funktionen an der neuromuskulären Endplatte sowie im ZNS eingegangen werden.

## 1.1 Die Struktur von Agrin

Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG), das in verschiedenen Spezies vorkommt. So konnte Agrin unter anderem aus dem Zitterrochen *Discopyge ommata* (Smith et al., 1992), dem Huhn (Tsim et al., 1992), der Ratte (Rupp et al., 1991) und dem Menschen (Groffen et al., 1998) isoliert werden. Das Agrin-Gen kodiert für ein Protein mit mehr als 2000 Aminosäuren und einem berechneten Molekulargewicht von 225 kDa. Aufgrund starker Glykosylierung, insbesondere in der N-terminalen Hälfte des Proteins, beträgt das tatsächliche Molekulargewicht mehr als 500 kDa (Tsen et al., 1995; Gesemann et al., 1995; Kröger und Mann, 1996). Agrin besitzt zwei Serin-Glycin-reiche Regionen, an die sich mindestens drei Heparansulfat- bzw. Chondroitinsulfat-Seitenketten anlagern können sowie weitere Konsensussequenzen für N-verknüpfte Glykosylierungsstellen (Tsen et al., 1995; Winzen et al., 2003) (Abb. 1).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Agrin zeigen eine 95 nm lange, fadenartige Struktur mit drei kugelförmigen Verdickungen am C-Terminus (Denzer et al., 1998). Hierbei

handelt es sich um drei globuläre, zu den G-Domänen des Laminins homologe Domänen. Die G3-Domäne zusammen mit einem Insert in der benachbarten Spleißstelle (B/z +) ist notwendig und auch hinreichend für die synapseninduzierende Aktivität von Agrin an der neuromuskulären Endplatte (Gesemann et al., 1995; Jones et al., 1997; Cornish et al., 1999) (siehe Kapitel 1.2). Der Bereich um die G1- und G2-Domäne mit der A/y-Spleißstelle und den benachbarten EGF-Domänen fungiert als Bindungsstelle für die Zuckerseitenketten des extrazellulären Matrixproteins  $\alpha$ -Dystroglycan (Hopf und Hoch, 1996; Gesemann et al., 1996). Heparin kann an die G2-Domäne von Agrin binden (Gesemann et al., 1996).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Agrin.** Anhand der cDNA-Sequenz kann die Struktur der einzelnen Domänen abgeleitet werden. Unterschiedliche erste Exons führen zur Bildung zweier N-terminaler Isoformen: NtA-Agrin und TM-Agrin. TM-Agrin ist ein Typ-II Transmembranprotein und besitzt neben der Transmembrandomäne eine kurze intrazelluläre Region. NtA-Agrin hingegen besteht aus einer Signalsequenz und der Laminin-bindenden NtA-Domäne. Der etwa 1900 Aminosäuren große extrazelluläre Teil des Proteins ist bei beiden Isoformen identisch. Der N-terminale Bereich ist durch neun Follistatin-ähnliche Domänen geprägt, wohingegen sich am C-Terminus drei globuläre Laminin G-homologe Domänen sowie vier EGF-ähnliche Domänen befinden. Alternatives Spleißen an zwei Stellen des Proteins (A/y bzw. B/z) führt zu Isoformen, die sich in Expressionsmuster und synaptogener Aktivität an der neuromuskulären Endplatte unterscheiden.

Im zentralen Bereich des Agrin-Proteins befinden sich zwei Serin/Threonin-reiche Regionen, die eine so genannte SEA-Domäne (benannt nach Seegurken-Spermaprotein, Enterokinase und Agrin) flankieren (Bork und Patthy, 1995). Hier ist auch eine der beiden Anlagerungsstellen für Glycosaminoglycan (GAG)-Seitenketten lokalisiert, an der sich sowohl Chondroitinsulfat- als auch Heparinsulfat-Seitenketten anlagern können. Die andere GAG-Bindungsstelle befindet sich zwischen der siebten und achten von insgesamt neun Follistatin-ähnlichen Domänen, die die N-terminale Hälfte des Proteins dominieren. An dieser Bindungsstelle ist nur eine einzelne Heparansulfat-Seitenkette angelagert (Winzen et al., 2003) (Abb. 1).

Die Klonierung der ersten Vollängen-cDNA aus Ratte (Rupp et al., 1991) und Huhn (Tsim et al., 1992) zeigte eine hohe Sequenzhomologie zwischen beiden Spezies, mit Ausnahme des N-Terminus. Die erste, aus dem Huhn klonierte Isoform (NtA-Agrin) besitzt nach einer Signalsequenz eine N-terminale Agrin-Domäne (NtA) (Denzer et al., 1995; Denzer et al., 1997). Bei der anderen, zunächst in der Ratte gefundenen Isoform (TM-Agrin) ist diese NtA-Domäne durch eine 23 Aminosäuren lange,  $\alpha$ -helikale Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit 34 Aminosäuren ersetzt. Die Bildung der beiden unterschiedlichen Isoformen beruht auf der Expression zweier alternativer erster Exons, die vermutlich unter der Regulation verschiedener Promotoren steht (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001).

Beide Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrer Lokalisierung im Organismus. Die lösliche, sekretierte NtA-Isoform kann über die bisher nur in Agrin gefundene NtA-Domäne an die  $\gamma$ -Kette des Laminins und somit an die Basallamina binden (Denzer et al., 1995; Denzer et al., 1998; Kammerer et al., 1999). Diese Isoform wird hauptsächlich in Motoneuronen (Smith und Odowd, 1994; Ma et al., 1995; Stone und Nikolics, 1995), der Skelettmuskulatur (Ruegg et al., 1992; Hoch et al., 1993; Ma et al., 1994) sowie in Lunge und Niere exprimiert (Hoch et al., 1993; Ma et al., 1994; Stone und Nikolics, 1995). Ihre am besten charakterisierte Funktion ist die Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der synaptischen Spezialisierungen an der neuromuskulären Endplatte. Die membrangebundene TM-Agrin-Isoform ist die dominierende Isoform im ZNS und findet sich hauptsächlich in Neuronen (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001) wie zum Beispiel in retinalen Ganglienzellen (Annie und Kröger, 2002). Die Expression von TM-Agrin wird entwicklungsabhängig reguliert und erfolgt hauptsächlich während der Phase des axonalen Wachstums. Die Entdeckung der membrangebundenen Isoform von Agrin führte zu der Hypothese, dass das Protein einen Rezeptor oder Co-Rezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften darstellt (Neumann et al., 2001).

## 1.2 Agrin an der neuromuskulären Endplatte

Die neuromuskuläre Endplatte (NMJ) ist eine spezielle Synapse des peripheren Nervensystems (PNS) und stellt die Kommunikationsstelle zwischen dem Axonende eines Motoneurons und der Muskelfaser dar. Die Prä- und Postsynapse sind morphologisch und biochemisch hochspezialisierte Einheiten, und die Bildung dieser Spezialisierung gehört zu den Schlüsselprozessen der Synaptogenese an der NMJ. Die neuromuskulären Endplatte wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht, unter anderem auch in der Arbeitsgruppe von McMahan, die erkannte, dass für die Ausbildung von Prä- und Postsynapse ein Bestandteil oder Faktor der Basallamina notwendig ist (Burden et al., 1979). Dieser Faktor wurde nach dem griechischen Wort „ageirein“ für „zusammenbringen“ benannt, was für die Eigenschaft von Agrin steht, Acetylcholinrezeptoren (AChRs) zu aggregieren.

Mitte der 80er Jahre wurde Agrin erstmals aus der Basalmembran des elektrischen Organs des Rochens *Torpedo californica* extrahiert und biochemisch aufgereinigt (Nitkin et al., 1987). McMahan formulierte einige Jahre später die mittlerweile weitestgehend bestätigte Agrin-Hypothese, die besagt, dass Agrin im Soma von Motoneuronen im ventralen Horn des Rückenmarks synthetisiert, dann anterograd zur Präsynapse transportiert und dort in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. Dort wird es dann stabil in die Basalmembran eingebaut und ist verantwortlich für die Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der synaptischen Spezialisierungen an der neuromuskulären Endplatte (NMJ) (McMahan, 1990).

Die Hypothese wurde später durch Ergebnisse mit Agrin-knockout-Mäusen gestützt. Diese entwickeln keine funktionsfähige Atemmuskulatur und sterben während der Geburt, da sich bei ihnen keine funktionsfähigen neuromuskulären Endplatten bilden, sondern stattdessen die Motoneurone verzweigen und über die Muskelfaser hinaus wachsen. Somit wird keine Präsynapse gebildet, und es kommt auch nicht zu postsynaptischen Spezialisierungen und der Aggregation von Acetylcholin-Rezeptoren an der Oberfläche der Muskelfasern (Gautam et al., 1996). Im Gegensatz dazu bildet sich bei der Injektion von rekombinantem Agrin in nicht-synaptische Bereiche des Muskels *in vivo* ein ausgereifter und voll funktionsfähiger postsynaptischer Apparat aus (Jones et al., 1997; Cohen et al., 1997a; Bezakova et al., 2001). Dies zeigt, dass Agrin nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte ist.

Die Differenzierung der NMJ in Prä- und Postsynapse wird durch die Bindung Agrins an einen heteromeren Rezeptorkomplex an der Postsynapse induziert (Glass et al., 1996), dessen signaltransduzierender Teil die muskelspezifische Tyrosinkinase (MuSK) ist (Valenzuela et al., 1995). Agrin bindet nicht direkt an MuSK, sondern an einen anderen Teil des

Rezeptorkomplexes (Glass et al., 1996; Herbst und Burden, 2000). LRP4, ein Mitglied der Familie der Low-density-Lipoprotein-Rezeptoren (LDLR), wurde als das langgesuchte Bindeglied zwischen Agrin und MuSK identifiziert (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008). LRP4 ist ebenso wie MuSK zwingend für die Bildung der neuromuskulären Endplatte notwendig; sowohl LRP4-defiziente als auch MuSK-defiziente Mäuse bilden analog zu Agrin-defizienten Mäusen keine funktionsfähige Atemmuskulatur aus und sterben bei der Geburt (Gautam et al., 1996; DeChiara et al., 1996; Weatherbee et al., 2006).

Die durch Agrin induzierte und über LRP4 vermittelte Aktivierung von MuSK durch Autophosphorylierung führt über das an den Acetylcholinrezeptor assoziierte Molekül rapsyn, welches an die zytoplasmatischen Teile von MuSK und vom AChR bindet (Antolik et al., 2006), zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der  $\beta$ -Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptors (Gesemann et al., 1995), zur Verankerung des Rezeptors im Aktin-Zytoskelett (Antolik et al., 2007) und somit letztlich zur Aggregation von Acetylcholin-Rezeptoren auf der Oberfläche der Skelettmuskelfaser (Moransard et al., 2003). Diese Aggregation wird jedoch nur von Agrin-Isoformen induziert, die an der B/z-Splice Stelle ein Insert von 8, 11 oder 19 Aminosäuren besitzen (B/z-positiv) (Gesemann et al., 1995; Burgess et al., 1999). Hierbei genügt bereits ein etwa 21 kDa großes Fragment, nämlich die C-terminale Laminin-G3-Domäne mit der benachbarten B/z<sup>+</sup>-Splice Stelle, um Acetylcholin-Rezeptoren zu clustern (Gesemann et al., 1995; Cornish et al., 1999).

Des Weiteren bewirkt Agrin die Aggregation von Myonuclei im post-synaptischen Bereich des Muskels und die Synapsen-spezifische Genexpression von Utrophin, Acetylcholinesterase und der  $\epsilon$ -Untereinheit des Acetylcholin-Rezeptors sowie einiger weiterer Proteine (Jones et al., 1996; Rimer et al., 1997; Gramolini et al., 1998). Neueste Untersuchungen zeigen die Bedeutung Agrins bei der Regulierung der Genexpression der Myonuclei durch die Beteiligung bei der Dekondensation des Chromatins, der Histon-Hyperacetylierung sowie -Hyperphosphorylierung (Ravel-Chapuis et al., 2007). Ferner induziert Agrin die Bildung morphologischer Veränderungen wie zum Beispiel synaptischer Falten auf der Muskelfaser (Meier et al., 1997; Jones et al., 1997; Cohen et al., 1997a). Der Einfluss von Agrin ist nicht nur auf die Postsynapse der neuromuskulären Endplatte beschränkt. Agrin ist auch notwendig für die Ausbildung präsynaptischer Spezialisierungen an der NMJ (Campagna et al., 1995) und induziert die Bildung von filopodienartigen Ausläufern auf Muskelfasern (Uhm et al., 2001). Diese ausläuferinduzierende Fähigkeit von Agrin zeigt sich auch bei ZNS-Neuronen (McCroskery et al., 2006; Annies et al., 2006) und anderen, nicht-neuronalen Zelltypen und wird im Rahmen dieser Arbeit noch ausführlich beschrieben und diskutiert werden.

## **1.3 Agrin im Zentralnervensystem**

Die Bedeutung von Agrin bei der Bildung der NMJ und die weit verbreitete Expression im Zentralnervensystem, insbesondere der Transmembran-Isoform, lassen auf eine ähnlich wichtige Rolle von Agrin bei der Synaptogenese im ZNS schließen. Jedoch ist die Funktion von Agrin im ZNS noch nicht annähernd so gut untersucht und verstanden wie an der neuromuskulären Endplatte.

Transmembran-Agrin wird im ZNS überwiegend von Neuronen (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001) und auch von Gliazellen exprimiert (Tournell et al., 2006), wobei einzelne Neurone unterschiedliche C-terminale Isoformen gleichzeitig exprimieren können (Annie und Kröger, 2002). Die Expression von Agrin im ZNS beginnt sehr früh und hält während der Entwicklung des Zentralnervensystems an (Li et al., 1997; Cohen et al., 1997b). Die Funktionen von Agrin bei der Synaptogenese sowie die nicht-synaptogene Funktionen im ZNS werden im Folgenden näher erläutert.

### **1.3.1 Die Funktionen von Agrin während der Synapsenbildung im ZNS**

Eine Reihe von Beobachtungen deutet darauf hin, dass Agrin analog zu seiner Funktion an der NMJ eine Rolle bei der Bildung der Synapsen im ZNS spielt. So wird die Expression von Agrin während der Synaptogenese hochreguliert. In den meisten Hirnregionen wird die Expressionsrate von Agrin anschließend wieder herunterreguliert, jedoch bleibt es im adulten Gehirn im Hippocampus, im Cortex und im olfaktorischen System bei einer hohen Expressionsrate, also in Regionen in denen während der gesamten Lebensspanne neue Synapsen entstehen und reifen (Biroc et al., 1993; OConnor et al., 1994; Stone und Nikolics, 1995; Li et al., 1997; Cohen et al., 1997b). Nach Verletzungen, beispielsweise verursacht durch einen Schlaganfall oder Epilepsie, kommt es ebenfalls zu einer Hochregulation von Agrin mRNA (OConnor et al., 1995; Thomas et al., 1995; Falo et al., 2008).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Agrin im synaptischen Spalt von interneuronalen cholinergen (Gingras und Ferns, 2001), GABAergen, glycinergen sowie glutamatergen Synapsen konzentriert ist (Escher et al., 1996; Mann und Kröger, 1996; Koulen et al., 1999; Ksiazek et al., 2007). In Synaptosomen-Präparationen des Gesamthirns ist Agrin ebenfalls angereichert (Koulen et al., 1999; Bose et al., 2000). Agrin wird von Neuronen sekretiert, und isoliertes, neuronales Agrin aus dem ZNS ist in der Lage, die Aggregation des Acetylcholinrezeptors zu induzieren (Mann und Kröger, 1996).

Die Hypothese, dass Agrin bei der Synaptogenese im ZNS eine wesentliche Rolle spielt, erhält weitere Unterstützung durch *in-vitro*-Experimente zur Blockierung von Agrin in hippocampalen Neuronen von Mäusen mit Hilfe von antisense-Oligonukleotiden oder inhibierenden Antikörpern. Diese Blockade führt zu einer reduzierten Aggregation der Glutamat- und GABA-Rezeptoren und somit zu einer Störung der synaptischen Transmission (Ferreira, 1999; Bose et al., 2000). Dadurch ist die Expression des an der Aggregation von GABA- und Glycinrezeptoren beteiligten Gephyrins verringert, und die Aggregation des Synapsen-assoziierten Proteins synGAP sowie der Transport synaptischer Vesikel sind gestört (Ferreira, 1999; Bose et al., 2000). Im Gegensatz zur akuten Inhibierung von Agrin *in-vitro* sind bei Agrin-defizienten Mäusen die Glutamat- und GABA-Rezeptoren in Cortex- und Hippocampusneuronen normal verteilt. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die synaptische Transmission ebenfalls keine Einschränkungen (Ferreira, 1999; Li et al., 1999; Serpinskaya et al., 1999). Diese scheinbar widersprüchlichen Beobachtungen könnten durch kompensatorische Mechanismen oder redundante Faktoren *in-vivo* während der frühen Entwicklung Agrin-defizienter Mäuse begründet sein, die bei der akuten Blockierung Agrins durch Antikörper oder Oligonukleotide nicht auftreten können.

Weitere Belege für eine mögliche Funktion von Agrin bei der Synaptogenese im ZNS liefert die Zugabe von gereinigtem Agrin zu Hippocampus-Kulturen, die zu einer höheren Expression der Synapsen-spezifischen Proteine Synaptophysin und Synapsin führt (Mantych und Ferreira, 2001). Darüber hinaus führt die mittels Progesteronstimulierung ausgelöste Expression von Agrin in Astrozyten auf darauf kultivierten hippocampalen Neuronen zu einer verstärkten Synapsenbildung (Tournell et al., 2006).

Es wird vermutet, dass die Funktion von Agrin im ZNS und im Speziellen bei der Synaptogenese ähnlich wie bei der neuromuskulären Endplatte über einen Rezeptor und eine damit verbundene Signalkaskade abläuft. Die Existenz eines möglichen Agrin-Rezeptors wird durch die Beobachtung gestützt, dass Agrin die Expression des „immediate early gene“ *c-fos* sowie die Phosphorylierung des cAMP response element-binding-Proteins (CREB) in corticalen und anderen Neuronen induziert (Ji et al., 1998; Hilgenberg et al., 1999). Weitere Untersuchungen zur Signalübertragung zeigen einen intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration in Neuronen durch Agrin, was durch die Tyrosin-Kinase-Hemmer Genistein und Herbimycin inhibiert werden kann (Hilgenberg und Smith, 2004). Dies weist auf eine Tyrosinkinase als möglichen Agrin-Rezeptor hin. Vergleichbare Ergebnisse zeigen sich auch an der neuromuskulären Endplatte (Hilgenberg und Smith, 2004). Jedoch weisen bei den Untersuchungen an ZNS-Neuronen sowohl die B/z<sup>+</sup> als auch die B/z<sup>-</sup>-Isoform dieselbe

Aktivität auf (Hilgenberg et al., 1999; Hilgenberg und Smith, 2004). Dies deutet darauf hin, dass MuSK, das mittlerweile auch im ZNS nachgewiesen wurde (Cheusova et al., 2006; Ksiazek et al., 2007), im Gegensatz zur Situation an der neuromuskulären Endplatte nicht daran beteiligt ist. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Agrin *in vitro* und *in vivo* an die  $\alpha$ -3-Untereinheit der Natrium-Kalium-ATPase (NKA) bindet. Beide sind in synaptischen Bereichen angereichert und kolokalisieren dort (Hilgenberg et al., 2006). Dies führt zu der Hypothese, dass die NKA einen neuronalen Rezeptor für Agrin im ZNS darstellen könnte, der auch wichtig ist im Hinblick auf Agrins mögliche Rolle während der Synaptogenese.

Zusammenfassend deutet vieles auf eine Rolle Agrins bei der Synaptogenese im ZNS hin. Die genaue Funktion von Agrin im Zentralnervensystem ist jedoch noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

### **1.3.2 Nicht-synaptogene Funktionen von Agrin im Zentralnervensystem**

Neben einer möglichen Rolle von Agrin bei der Bildung von Synapsen im ZNS gibt es viele Hinweise auf weitere, nicht mit der Synapsenbildung zusammenhängende Funktionen von Agrin im sich entwickelnden Gehirn.

Agrin wird bereits vor dem Beginn der Synaptogenese in der ventrikulären und subventrikulären Zone des sich entwickelnden ZNS exprimiert. Diese Expression verringert sich während der Entwicklung und ist im adulten Gehirn in diesem Bereich nicht mehr vorhanden, wenn Zellproliferation und Migration abgeschlossen sind. Da die Neuroepithelzellen der ventrikulären Zone die Vorläuferzellen der Neurone und Gliazellen sind, deutet dies auf mögliche Funktionen von Agrin während der Neuro- bzw. Gliagenese hin (Stone und Nikolics, 1995; Cohen et al., 1997b). In Agrin-defizienten Mäusen wurde beispielsweise gezeigt, dass das Gehirn kleiner als in Wild-Typ-Mäusen ist (Serpinskaya et al., 1999), und dass die Anzahl der kortikalen Synapsen ebenso verringert ist wie die Länge der Dendriten. Elektrophysiologische Untersuchungen weisen hierbei auf eine selektive Verringerung der exzitatorischen Synapsen hin, inhibitorische Synapsen sind nicht betroffen (Ksiazek et al., 2007).

Analog zu Agrin ist die Expressionsrate des Fibroblast Growth Factors (FGF)-2 während der kortikalen Neurogenese hoch, und FGF-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Ausreifung von Neuroepithelzellen in Neuronen oder Gliazellen (Powell et al., 1991; Giordano et al., 1992; Qian et al., 1997). Die FGF-Aktivität hängt hierbei von ihrer Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglycanen ab (Ornitz, 2000), was auf eine mögliche Wechselwirkung mit den Agrin-HSPG-Seitenketten hindeutet. *In-vitro*-Untersuchungen haben ergeben, dass FGF-2 an die

Agrin-Seitenketten binden kann (Cotman et al., 1999) und dass beide Proteine bei Zugabe auf kultivierte retinale Ganglienzellen die Ausbildung und das Wachstum von Neuriten verstärken (Kim et al., 2003). Der gleiche Effekt tritt bei Zugabe von FGF-2 auf kultivierte cortikale Neurone auf (Szebenyi et al., 2001). Das deutet auf eine Funktion von Agrin – möglicherweise im Zusammenspiel mit FGF-2 – bei der Bildung und Elongation von Axonen und Dendriten hin.

Eine mögliche weitere, nicht-synaptogene Funktion Agrins zeigt sich während des gerichteten axonalen Wachstums. So wird Agrin auch von Gliazellen exprimiert, die als eine Art Leitstruktur eine wichtige Rolle bei der Wegfindung der Axone bei der ZNS-Entwicklung spielen (Halfter et al., 1997). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die axonale Wegfindung entscheidend von  $\beta$ 1-Integrin abhängt, welches mit Agrin interagiert (Martin und Sanes, 1997; Bixby et al., 2002). Agrin bindet auch an andere Zelloberflächenproteine, die für ihre Funktion bei der axonalen Entwicklung bekannt sind, wie z.B. N-CAM, Laminin und Thrombospondin (Cotman et al., 1999; Bixby et al., 2002).

Agrin wird während der Phase des axonalen Wachstums jedoch nicht nur von Gliazellen, sondern auch direkt auf Axonen und deren Wachstumskegeln exprimiert (Neuhuber und Daniels, 2003). Sobald die Axone ihr Zielgebiet erreicht haben wird die Agrin-Expression jedoch wieder herunterreguliert (Halfter et al., 1997). Dies führt zu der Hypothese, dass Agrin bei der axonalen Wegfindung eine Rolle spielt. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass *in vitro* die Zugabe von Agrin zu hippocampalen Ratten-Neuronen zur Ausbildung von kürzeren, stark verzweigten Axonen sowie längeren, ebenfalls stark verzweigten Dendriten im Vergleich zu Kontrollkulturen führt. Die Blockierung der Agrin-Expression mittels antisense-Oligonukleotiden führt jedoch zur Bildung längerer, aber geringer verzweigter Axone. Die Dendriten sind kürzer und ebenfalls geringer verzweigt als die Dendriten im Kontrollexperiment (Mantych und Ferreira, 2001). Eine ähnliche Studie, bei der rekombinantes Agrin auf kultivierte, spinale Neurone aus *Xenopus laevis* zugegeben wurde, führte ebenfalls zur Ausbildung verkürzter Axone, der Verzweigungsgrad wurde hierbei jedoch nicht untersucht (Xu et al., 2005).

Untersuchungen an Zebrafisch-Embryonen zeigen, dass eine Blockierung der Agrin-Expression sowohl zu einem eingeschränkten Wachstum von primären Motoneuronen und Branchiomotoneuronen, als auch von sensorischen Rohon-Beard-Neuronen im peripheren Nervensystem führt (Kim et al., 2007).

Zusammenfassend lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass Agrin beim axonalen Wachstum sowohl von ZNS- als auch von PNS-Neuronen eine Rolle spielt.

## 1.4 Induzierung von filopodienartigen Fortsätzen auf Neuronen durch Transmembran-Agrin

Transmembran-Agrin ist die dominierende Isoform im ZNS und wird von Neuronen (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001), zum Beispiel retinalen Ganglienzellen (Annie und Kröger, 2002), und Astrozyten (Tournell et al., 2006) exprimiert. Auf wachsenden Axonen und Dendriten findet sich ausschließlich die transmembrane Isoform von Agrin (Neumann et al., 2001; Annie und Kröger, 2002).

Die Identifizierung der membranständigen Agrin-Isoform mit einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne führte zu der Annahme, dass TM-Agrin ein Rezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften sein könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Effekt genutzt, dass sich Rezeptoren mit einer einzelnen Transmembrandomäne mit Hilfe polyklonaler Antikörper kreuzvernetzen und dadurch aktivieren lassen, und das auch ohne Kenntnis des physiologischen Liganden (Heldin, 1995; Weiss und Schlessinger, 1998). Somit wird durch Inkubation mit einem polyklonalen Serum auch in Abwesenheit des physiologischen Liganden eine Signalkaskade ausgelöst, die spezifisch der Funktion des Rezeptors entspricht.

Um zu untersuchen, ob TM-Agrin ein Rezeptor sein könnte, wurden Axone von retinalen Ganglienzellen (RGC) mit polyklonalen anti-Agrin Antikörpern inkubiert. Dies führte zu dramatischen morphologischen Veränderungen, nämlich zur Bildung zahlreicher filopodienartiger Ausläufer oder Fortsätze entlang der gesamten Länge der Axone (Annie et al., 2006) (Abb. 2B, D und F). Filopodien sind dünne, aktinreiche Ausläufer der Plasmamembran, die als Sensoren zur Untersuchung der Zellumgebung dienen. Sie spielen eine wichtige Rolle unter anderem bei Zellmigration, Wundheilung und beim Auswachsen der Neuriten (siehe Review Mattila und Lappalainen, 2008). Die Inkubation von Präimmunsereen, monoklonalen Antikörpern und Fab-Fragmenten von polyklonalen anti-Agrin-Antikörpern führte zu keiner Ausbildung der filopodienartigen Ausläufer (Abb. 2A, C und E), da es hierbei nicht zur Quervernetzung und Multimerisierung von TM-Agrin kommt. Die Vorinkubation der anti-Agrin Antikörper mit gereinigtem Agrin hingegen verhinderte die Bildung der Ausläufer, da die Agrin-Bindestellen der Antikörper blockiert werden (Annie et al., 2006). Mittels RNA-Interferenz wurde TM-Agrin als entscheidender Faktor für die Bildung der filopodienartigen Ausläufer nachgewiesen. Mit spezifischen siRNA-Konstrukten gegen TM-Agrin transfizierte hippocampale Neurone bildeten nicht nur weniger Ausläufer aus. Es kam aufgrund der akuten Hemmung der TM-Agrin-Expression auch zu einer Destabilisierung bereits gebildeter Ausläufer (McCroskery et al., 2006).

Die durch Transmembran-Agrin induzierte Bildung der filopodienartigen Ausläufer beschränkt sich aber nicht nur auf hippocampale Neurone und retinalen Ganglienzellen. Auch auf anderen Neuronen des ZNS und des PNS konnten Ausläufer durch Zugabe polyklonaler Antikörper induziert werden, sowohl auf Axonen als auch auf Dendriten (McCroskery et al., 2006; Annies et al., 2006).

Neben der Aggregation von endogenem TM-Agrin mittels polyklonaler Antikörper bietet die Überexpression durch Transfektion mit TM-Agrin cDNA eine weitere Möglichkeit zur Bildung filopodienartiger Fortsätze in Neuronen. Dabei kommt es zu einer starken Anreicherung des Proteins in der Zellmembran und somit wahrscheinlich zur Selbstaggregation mehrerer TM-Agrin-Moleküle oder zu einer Konzentration in bestimmten Membransubdomänen, was zur Aktivierung einer Signalkaskade und zur Bildung der Fortsätze führt (McCroskery et al., 2006). Die Überexpression durch Transfektion ermöglicht es auch, die filopodienartigen Fortsätze in nicht-neuronalen Zellen und in Zellen, die kein oder kaum endogenes Agrin enthalten, zu induzieren, wie beispielsweise in 293HEK oder PC12-Zellen (Ramseger, 2004).

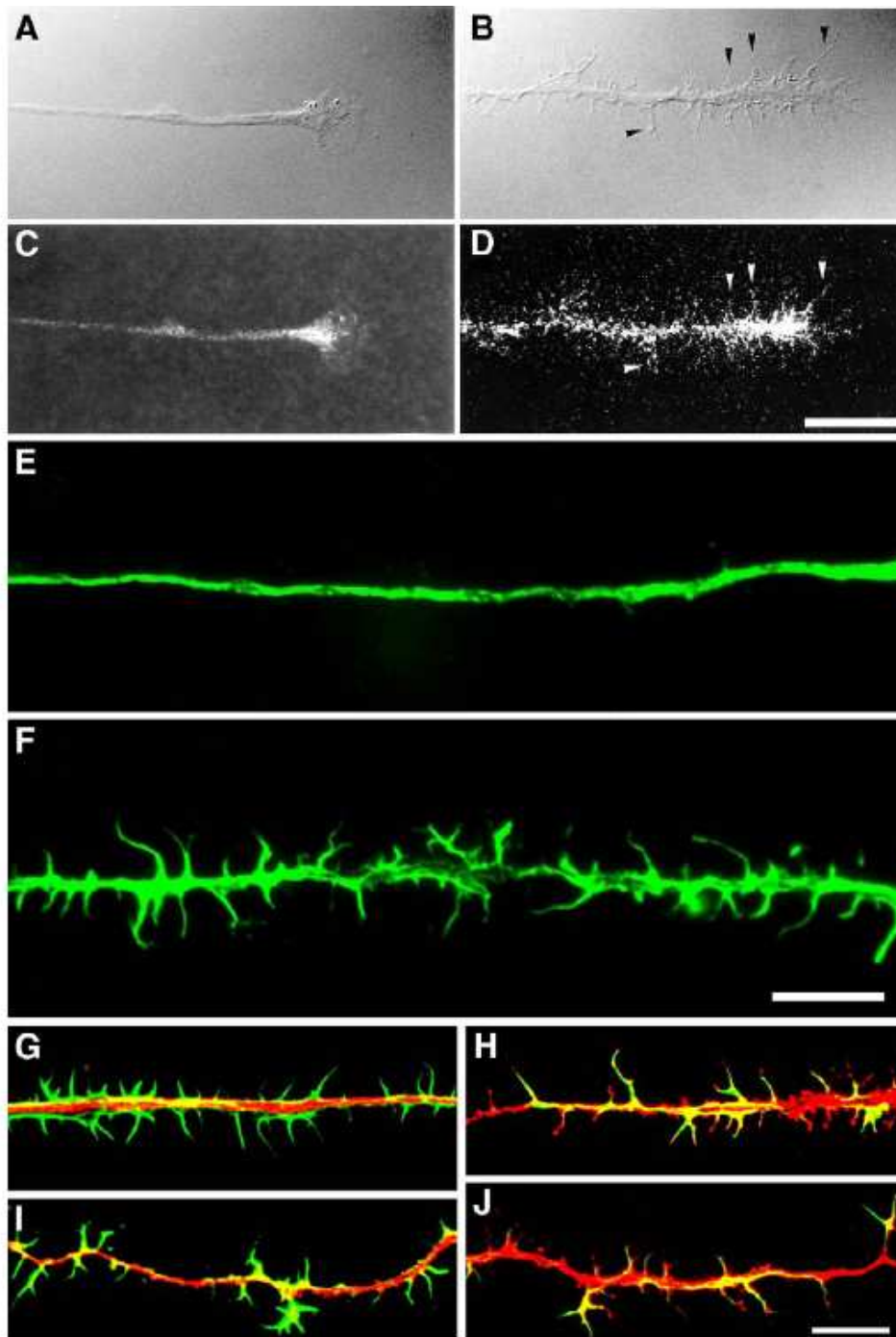
Die filopodienartigen Ausläufer oder Fortsätze enthalten neben Transmembran-Agrin, das bis in die Spitzen hineinreicht (siehe Pfeilköpfe [Abb. 2 D](#)), auch mittels Phalloidin-Färbung anfärbbares F-Aktin ([Abb. 2F](#)). Ebenfalls findet sich dort Fascin, welches für die Quervernetzung der Aktin-Filamente verantwortlich ist (McCroskery et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass die Bildung der Ausläufer auf einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts beruht. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese führt eine Co-Inkubation der Axone mit anti-Agrin-Antiserum und Cytochalasin D aufgrund der blockierten Polymerisation der Aktin-Filamente nicht zur Bildung der Fortsätze (Annies et al., 2006). Des Weiteren findet sich in den Fortsätzen Synaptotagmin ([Abb. 2H](#)) und GAP-43 ([Abb. 2J](#)), Neurofilament-68 jedoch gar nicht ([Abb. 2G](#)) und  $\beta$ -Tubulin nur an der Ausläufer-Basis ([Abb. 2I](#)) (Annies et al., 2006). Die filopodienartigen Fortsätze enthalten also ein komplexes Zytoskelett.

Videomikroskopische Zeitraffer-Aufnahmen zeigen, dass die Bildung der Fortsätze ein hochdynamischer Prozess ist, der bereits wenige Minuten nach Zugabe des polyklonalen Antiserums beginnt (Annies et al., 2006). Die maximale Anzahl wird nach etwa dreistündiger Inkubation erreicht. Die Fortsätze wachsen lateral aus Axon und Dendrit heraus, adhären an das Substrat und üben Zugkräfte auf den Neuriten aus (siehe auch die gebogene Axonstruktur in [Abb. 2I und J](#)). Die Wachstumskegel der Ausläufer sind jedoch nicht stabil, kollabieren nach wenigen Minuten wieder und ziehen sich bis auf den sichtbaren Rest der filopodienartigen Fortsätze zurück (Annies et al., 2006).

Die molekularen Mechanismen, die zur Bildung der von Transmembran-Agrin induzierten Ausläufer führen, sind derzeit Gegenstand einiger Untersuchungen und konnten bisher nur teilweise entschlüsselt werden. So wurde gezeigt, dass die Inkubation mit Staurosporin und Pervanadat, welche die Funktion von NtA-Agrin an der neuromuskulären Endplatte hemmen, keinen Einfluss auf die Ausbildung der durch TM-Agrin induzierten Ausläufer zeigt, was auf unterschiedliche Signalkaskaden bei beiden Prozessen hindeutet (Annie et al., 2006). Nähere Untersuchungen zur durch TM-Agrin induzierten Signalkaskade ergaben, dass die Rho-GTPase Cdc42 daran beteiligt ist und durch TM-Agrin indirekt aktiviert wird (McCroskery et al., 2006).

Des Weiteren zeigte sich, dass sich TM-Agrin auf auswachsenden Axonen und nach Überexpression in nicht-neuronalen Zellen in lipid rafts anreichert und dass lipid rafts sowohl für die Bildung als auch für die Aufrechterhaltung der Ausläufer notwendig sind. Die durch Antikörper induzierte Bildung von Ausläufern kann sowohl durch die Inhibierung der Src-Kinase Fyn, welche in lipid rafts lokalisiert ist, als auch der 44/42 MAP-Kinase gehemmt werden. Zudem führt die Aggregation von TM-Agrin zu einer erhöhten Aktivität von Fyn und 44/42 MAPK (Ramseger et al., 2009).

Die physiologische Funktion der durch TM-Agrin induzierten filopodienartigen Fortsätze ist bis dato noch nicht vollständig geklärt. Um den Mechanismus zur Bildung der Ausläufer genauer zu verstehen, sind weitere Untersuchungen zur Signalübertragung sowie zur Bindung des physiologischen Liganden an TM-Agrin notwendig.



**Abb. 2: Induktion von filopodienartigen Fortsätze auf kultivierten retinalen Ganglienzellen .** Die Inkubation von Axonen retinaler Ganglienzellen entweder mit Präimmenserum (A, C, E) oder mit polyklonalem anti-Agrin-Antiserum (B, D, F) induziert die Bildung vieler Fortsätze entlang der primären Axone. Wachstumskegel und Axone sind in Nomarski-Optik (A, B) bzw. nach Agrin-Antikörperfärbung (C, D) dargestellt. Auf den mit anti-Agrin Antiserum inkubierten Axonen bilden sich zahlreiche Fortsätze aus (Pfeilköpfe B, D). TM-Agrin findet sich ebenfalls auf Axonen, die mit Präimmenserum behandelt wurden, zeigt dort jedoch ein gleichmäßiges Verteilungsmuster über das gesamte Axon (C). Färbungen von Axonen mit Phalloidin, kultiviert in der Gegenwart von Präimmenserum (E) und anti-Agrin-Antiserum (F), zeigen, dass die durch TM-Agrin induzierten Ausläufer Aktin enthalten, was auf eine Reorganisation des axonalen Zytoskeletts hindeutet, sowie Synaptotagmin (H) und GAP-43 (J) (rote Färbung).  $\beta$ -Tubulin (I) hingegen findet sich jedoch nur an der Basis und Neurofilament 68 (G) gar nicht in den Ausläufern. (Skalierungsbalken = 10  $\mu$ m; Abbildung aus Annies et al., 2006)

## 2 Zielsetzung

Die transmembrane Isoform des Heparansulfat-Proteoglycans Agrin (TM-Agrin) wird von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert. Über ihre Funktion ist im Gegensatz zur gut erforschten NtA-Isoform, die an der neuromuskulären Endplatte hauptverantwortlich für die Ausbildung des postsynaptischen Apparates ist, nicht viel bekannt. Ein Ansatzpunkt für die Funktion von TM-Agrin im ZNS ist die Beobachtung, dass die Inkubation von Neuronen mit polyklonalen Antikörpern gegen TM-Agrin oder die Überexpression durch Transfektion von TM-Agrin cDNA zur Bildung filopodienartiger Ausläufer auf Axonen und Dendriten führt. Diese Ausläufer enthalten unter anderem das Zytoskelettprotein Aktin und sind hoch dynamisch. Sie entstehen auch nach Überexpression durch Transfektion von TM-Agrin in nicht-neuronale Zellen, wie beispielsweise 293HEK-Zellen.

Da sich die Mechanismen der Signalübertragung, die zur Bildung der NMJ und der axonalen Ausläufer führen, unterscheiden, ist davon auszugehen, dass ein bis dato noch nicht funktionell charakterisierter Bereich von TM-Agrin für die Bildung der filopodienartigen Fortsätze verantwortlich ist. Ziel dieser Dissertation war es, diesen Bereich von TM-Agrin zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies sollte anhand folgender methodischer Ansätze erreicht werden:

- Klonierung verschiedener Deletions- und Mutationskonstrukte von TM-Agrin
- Transfektion dieser Konstrukte in das 293HEK-Zellsystem sowie in primäre neuronale Zellen
- Quantitative Bestimmung der Protein-Expression nach Transfektion der Konstrukte mittels Western-Blot
- Mikroskopische Untersuchungen zur lokalen Expression der transfizierten Konstrukte

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Chemikalien wurden von Roth, Merck, Applichem, Life Technologies oder Sigma bezogen. Für die Zellkultur wurden Verbrauchsmaterialien von Falcon, Greiner und Nunc verwendet.

#### 3.1.2 Materialien für die Molekularbiologie

Agarose NEEO	Roth
Orange G	Sigma
DNA-Standard	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas / New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Oligonukleotide	IBA
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
dNTP-Mix (je 10 mM)	New England Biolabs
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ ml)	Sigma
Blue View™ Nucleic Acid Stain	Sigma
Ampicillin	Roth
Kanamycin	Roth

#### Bakterienstamm

E. coli XL1-Blue      recA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB<sup>r</sup>ZΔM15Tn10(Tet<sup>r</sup>)] (Stratagene)

**Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung**

LB-Medium	für 1 l: 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl, pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren (Life Technologies)
LB-Selektionsmedium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar, 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin
S.O.C.-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , auf 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen, pH-Wert auf 7,5 einstellen, autoklavieren und 20 mM Glucose zugeben

**Kits**

QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen
Quik Change® XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

**3.1.3 Material für die Zellkultur**

DMEM-Medium	PAA
RPMI 1640-Medium	PAA
Neurobasal A-Medium	PAA
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA
B27 supplement	Invitrogen
Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA
L-Glutamin	PAA
GlutaMAX	Invitrogen
Natriumpyruvat	Invitrogen
SuperFect®-Transfektionsreagenz	Qiagen
Lipofectamin®-Transfektionsreagenz	Invitrogen
Fibronectin	Sigma
Laminin	Invitrogen
Poly-L-Lysin	Sigma
Chicken Neuron Nucleofector® Kit	Amaya

## Zelllinien

Die Zelllinie HEK 293T, auch als 293HEK bezeichnet, ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, die mit dem Adenovirus Typ 5 (Graham et al., 1977) sowie mit dem SV40 Large T Antigen transformiert wurde. Letzteres erlaubt die Transfektion von Vektoren, die die Expression des SV40 Large T Antigens zur episomalen Replikation benötigen.

### 3.1.4 Material für die Immunhistologie

Objektträger	Menzel-Gläser
Deckgläser	Menzel-Gläser
Citifluor AF1 (Einbettmedium)	Plano
Phalloidin-Alexa-488/594	Molecular Probes
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenyl-indol) Farbstoff 33258	Sigma

### Puffer und Lösungen

Waschlösung	1xPBS pH 7,4; 0,1 % BSA; 0,2 % Triton X100
Blocking-Lösung	1xPBS pH 7,4; 1 % BSA; 0,2 % Triton X100

### 3.1.5 Material für die Proteinbiochemie

Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %)	Roth
Nonidet P40	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Sigma
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
PVDF-Membran	
Whatman-Papier	
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus	MBI Fermentas
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
Hyperfilm (Photosensitiver Röntgenfilm)	Amersham Biosciences
Entwickler und Fixierer	Kodak

**Puffer und Medien**

Zellysepuffer	50 mM Tris 500 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % Nonidet P40 1 % Triton X-100 1 Tablette Complete-EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) auf 25 ml Puffer
SDS-Probenauftragspuffer	125 mM Tris 4 % SDS 20 % Glyzerin 10 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,01 % Bromphenolblau mit H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen
10x Elektrophoresepuffer (Laemmlipuffer)	30 g Tris 10 g SDS 144 g Glycin, mit H <sub>2</sub> O bidest auf 1 l auffüllen
4x Trenngelpuffer	375 mM Tris-Base (pH = 8,8) 0,1 % SDS
4x Sammelgelpuffer	125 mM Tris-Base (pH = 6,8) 0,1 % SDS
10 %iges Trenngel	3 ml 4x Trenngelpuffer 4 ml 30 % Acrylamidlg. 5 ml H <sub>2</sub> O bidest. 60 $\mu$ l 10 % APS-Lsg. 12 $\mu$ l TEMED-Lsg.
4 %iges Sammelgel	1 ml 4x Trenngelpuffer 0,52 ml 30 % Acrylamidlg. 1,48 ml H <sub>2</sub> O bidest. 20 $\mu$ l 10 % APS-Lsg. 4 $\mu$ l TEMED-Lsg.
10x Nassblotpuffer	29 g Tris-Base 144 g Glycin 0,1 % SDS 20 % Ethanol (techn.) auf 1 l mit H <sub>2</sub> O bidest. auffüllen
1x TBS	50 ml 1 M Tris-HCl (pH = 7,5) 30 ml 5 M NaCl mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 1 l auffüllen
1x TBST	0,1 % Tween 20 in 1x TBS
Blockingpuffer	5 % Magermilchpulver (Sucofin) in 1x TBST

### 3.1.6 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Referenz
Agrin #46	Kaninchen	1:1000 IHC	Kröger	Tsen et al. 1995 Kröger et al. 1996
TM-Agrin	Schaf	1:50 IHC 1:1000 WB	Kröger	Neumann et al. 2001
GFP	Kaninchen	1:1000 IHC 1:5000 WB	Molecular Probes	
$\beta$ -Tubulin (clone Tub 2.1)	Maus	1:200 IHC	Sigma	
Aktin (clone C4)	Maus	1:10000 WB	Chemicon	

#### Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Maus IgG Alexa-488/594	Ziege	1:1000 IHC	Molecular Probes (Invitrogen)
anti-Schaf IgG Alexa-488/594	Esel	1:1000 IHC	Molecular Probes (Invitrogen)
anti-Kaninchen IgG Alexa-488/594	Ziege	1:1000 IHC	Molecular Probes (Invitrogen)
anti-Maus IgG HRP	Ziege	1:5000 WB	Dianova
anti-Schaf IgG HRP	Esel	1:5000 WB	Dianova
anti-Kaninchen HRP	Ziege	1:5000 WB	Dianova

### 3.1.7 Plasmide

#### pcDNA4/TO

Die cDNA der TM-Agrin-Deletionskonstrukte wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* (TMFD8 und TMFD6) bzw. *HindIII* und *EcoRI* (TMFD7-572, -568, und -566; siehe Kap. 3.1.8 Oligonukleotide) in den Vektor pcDNA4/TO (5078 bp, Invitrogen) inkliniert. Das Plasmid beinhaltet Resistenzgene gegen Zeocin und Ampicillin und erlaubt somit eine selektive Vermehrung der transformierten *E.coli*-Bakterien.

Die gewonnene und aufgereinigte Plasmid-DNA wurde für die transiente Transfektion in HEK 293T-Zellen (293HEK) verwendet.

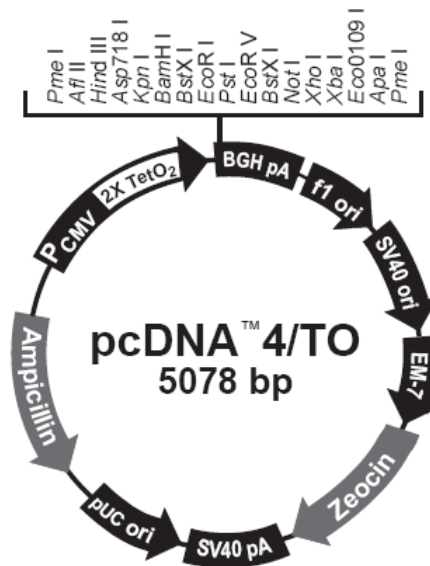


Abb. 3: Karte des Vektors pcDNA 4/TO mit Multiple cloning site (Invitrogen, Instruction Manual No. V1020-20).

### pEGFP-N1

Die cDNA der mit „-GFP“ bezeichneten Deletionskonstrukte (siehe Kap. 3.1.8 Oligonukleotide) sowie die Mutationskonstrukte wurden in den Vektor pEGFP-N1 (4.7 kb, BD Biosciences Clontech) über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* einkloniert. Der Vektor enthält ein Kanamycin-Resistenzgen sowie eine C-terminale Sequenz, die für das GFP-Protein („green fluorescent protein“) codiert. Dieses wird als Fusionsprotein zusammen mit dem Insert exprimiert und dient zur Detektion bei den immunohistochemischen sowie proteinbiochemischen Versuchen.

Neben den oben bezeichneten Konstrukten wurde der Vektor noch für folgende Konstrukte verwendet:

- Für die Zwischenstufen TMFD6-503 (Schnittstellen *HindIII* und *EcoRI*) und intTM-Linker (*NheI* und *XhoI*, unter Verwendung der endogenen *XhoI*-Schnittstelle an Position 209)
- Für die Konstrukte TMFD2-8-GFP und TMFD3-8-GFP (Schnittstellen *XhoI* und *BamHI*).

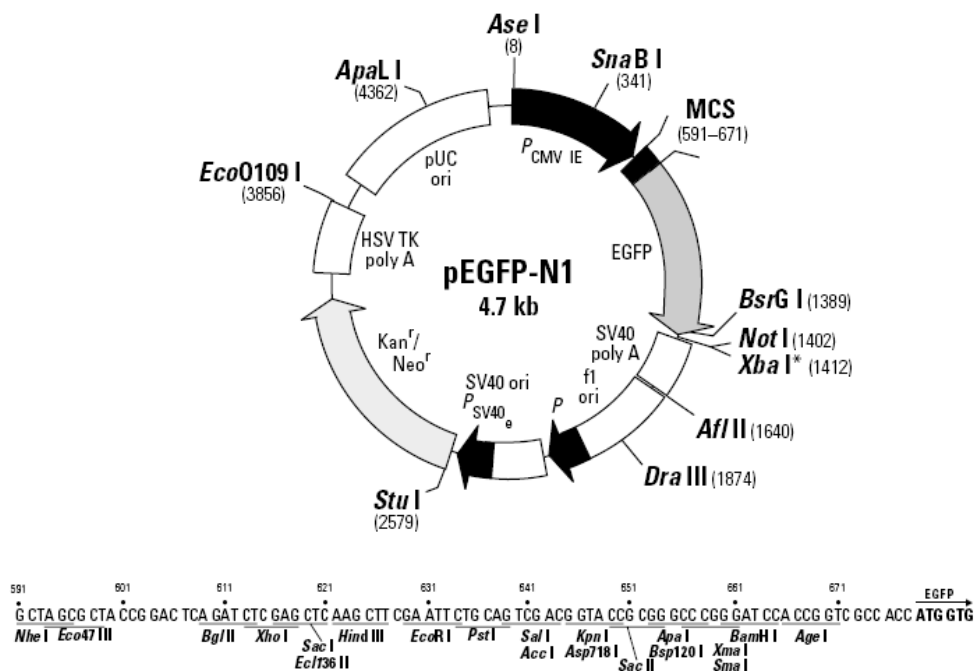


Abb. 4: Karte des Vektors pEGFP-N1 inklusive der Sequenz der Multiple Cloning Site (BD Biosciences Clontech, Protocol PT3027-5)

### 3.1.8 Oligonukleotide

Primer für Deletionskonstrukte		
Konstrukt	Sequenz 5' – 3'	Orientierung
	GTGTGGTGGGAATTCACAGCATGACGGC	sense
TMFD8	GCTCTAGACTGACTGCAGTGCACAACCTGG	antisense
TMFD6	GCTCTAGAGTCATAGGTGAGGCCATCGGTGC	antisense
TMFD8-GFP	CGCGGATCCGTCTGACTGCAGTGC	antisense
TMFD6-GFP	CGCGGATCCTCATAGGTGAGGCCATCG	antisense
	ATAAAGCTTAGCATGACGGCTTGCCAGTACC	sense
TMFD7-572	AATGAATTCTTAGCCACATTCGTCCTCACACG	antisense
TMFD7-568	AATGAATTCTTACTCACACGGCCCCATCTTGG	antisense
TMFD7-566	AATGAATTCTTACGGCCCCATCTTGGCCACC	antisense
TMFD6 (503aa)	ATAAAGCTTAGCATGACGGCTTGCCAGTACC TAGAATTCTTGAGTCGCCTTGGGCAGC	sense antisense
TMFD6+FD1-GFP	ATGAATTCAGATGCCTGCCGAGGGATGC ATGGATCCGTGCTGCCAAAGCTGC	sense antisense
TMFD6+FD6-GFP	ATGAATTCCGACCGCTGTGGCAAGTGC ATGGATCCAAGGAGCACACCGTCGTGC	sense antisense
TMFD6+FD8-GFP	ATGAATTCTGAGGACGAATGTGGCTCAGG CGCGGATCCGTCTGACTGCAGTGC	sense antisense
TMFD6+FD7-8-GFP	ATGAATTCCTGCGGCACGACGGTGTGC CGCGGATCCGTCTGACTGCAGTGC	sense antisense
intTM-Linker	ATAGCTAGCAGCATGACGGCTTGCCAGTACC ATTGAATTCATCTCGAGGGGTCGGCGG	sense antisense
TMFD2-8-GFP	ATACTCGAGGACCATGTGGCTCCAAGGACC CGCGGATCCGTCTGACTGCAGTGC	sense antisense
TMFD3-8-GFP	ATACTCGAGTCTTCAAGAAGTTTGATGGAGCC CGCGGATCCGTCTGACTGCAGTGC	sense antisense

Die beiden gelb unterlegten sense-Primer wurden für die nachfolgenden Konstrukte verwendet. Die blau unterlegten Konstrukte waren Zwischenstufen für die jeweils nachfolgenden Konstrukte.

<b>Primer für Mutationskonstrukte</b>	
<b>Konstrukt</b>	<b>Sequenz 5' – 3'</b>
TMFD8 $\Delta$ GAG 1	GGACGAATGTGGC <sub>g</sub> CAGGGGGCTCAGGCTCTGG
2	GTGGCGCAGGGGGC <sub>g</sub> CAGGCTCTGGTGATGGG
3	CAGGGGGCGCAGGC <sub>g</sub> CTGGTGATGGGAGTGAGTG
TMFD8 C535G-GFP	CCTGGCCCAGGTC <sub>g</sub> GTGGCACCGATGGC
TMFD8 C567G-GFP	CCAAGATGGGGCCG <sub>g</sub> GTGAGGACGAATGTGG
TMFD8 N544D-GFP	GGCCTCACCTATGAC <sub>g</sub> ACCGCTGCGAGCTCCG
TMFD8 C470G-GFP	CCTCCCAGCCTGTC <sub>g</sub> GTGGCACAGATGGCAACACC

Angegeben ist hier nur der sense-Primer. Der antisense-Primer ergibt sich aus der reversen und komplementären Sequenz. Die mutierte Base ist kleingeschrieben.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma IBA (Göttingen) bezogen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### PCR

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurde die Phusion™ High-Fidelity Polymerase (New England Biolabs) aufgrund ihrer Geschwindigkeit und hohen Genauigkeit gewählt. Nach Protokoll des Herstellers wurden 50 µl Ansätze in einem Thermocycler (Biometra) gefahren:

Ansatz		PCR-Programm		
5x Phusion HF-Puffer	10 µl	Temperatur	Zeit	Zyklen
10 mM dNTPs	1 µl	98 °C	30 s	1
sense Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl	98 °C	10 s	
reverse Primer (10 pmol/µl)	2,5 µl	60 – 72 °C	30 s	
Template DNA (10 ng/µl)	1 µl	72 °C	30 s / 1 kb	25
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	72 °C	5 min	1
H <sub>2</sub> O bidest.	32,5 µl			

Anschließend wurden die PCR-Fragmente mittels des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt. Für die weitere Klonierung wurden mit Hilfe der entsprechenden Oligosequenz an den Enden Restriktionsschnittstellen eingefügt.

#### Restriktionsverdau

Die aufgereinigte DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas bzw. New England Biolabs) geschnitten. Für einen präparativen Verdau, mit dem die weitere Klonierung erfolgte, wurden 5-10 µg DNA mit 5-10 Einheiten Restriktionsendonuklease bei 37 °C in der entsprechenden Pufferlösung über Nacht inkubiert. Eine entsprechende Menge des Vektors (pcDNA4/TO bzw. pEGFP-N1) wurde mit denselben Restriktionsenzymen verdaut. Ein analytischer Verdau diente zur Kontrolle der Klone nach der Transformation und wurde mit deutlich weniger DNA (0,5-1 µg) und geringem Enzymeinsatz (0,5–1 Units) für 1-2 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

### **Aufreinigung aus Agarosegelen**

Da Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert und wie UV-Licht Strangbrüche induzieren kann, wurde zur Aufreinigung der geschnittenen DNA das Ethidiumbromid freie Blue View System (Sigma) verwendet. Hierbei erscheinen die DNA-Fragmente im Agarosegel bei Tageslicht als blaue Streifen. Diese wurden mit einem Skalpell herausgetrennt und die DNA mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Die DNA wurde in H<sub>2</sub>O bidest. eluiert.

### **Ligation**

Die Ligation ist der Einbau des DNA-Fragments in einen Vektor. Das Enzym Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5'-Phosphatgruppen des DNA-Fragments und 3'-Hydroxylgruppen des Vektors. Insert und Vektor-DNA wurden quantifiziert und in einem stöchiometrischen Verhältnis von 5:1 mit T4-Ligase (New England Biolabs) im entsprechenden Puffer über mehrere Stunden bei 16 °C inkubiert.

### **Transformation**

Die durch die Ligation entstandenen DNA-Plasmide wurden anschließend in chemisch kompetente *E.coli* XL1-Blue-Bakterien transformiert. Die Bakterien wurden hierzu auf Eis aufgetaut, der gesamte Ligationsansatz nach Hitzeinaktivierung (65 °C für 15 Minuten) hinzugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der anschließende „heat shock“ in einem Wasserbad (90 Sekunden bei 42 °C) führt zur Aufnahme der Plasmide in die Bakterien. Anschließend wurde vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben, 2 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen. Die Selektion der transformierten Bakterien erfolgte mittels Zusatz von Antibiotika, gegen die sich ein entsprechendes Resistenzgen auf dem Vektor befindet. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **Isolierung der Plasmid-DNA**

Einzelne Bakterienkolonien wurden gepickt und mit LB-Medium plus entsprechendem Antibiotikum über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler kultiviert. Für einen Miniprep-Ansatz wurden 1,5 – 3 ml Bakterienkultur verwendet und die DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert. Für größere DNA-Mengen wurde eine Bakterienkultur mit 150 – 200 ml LB-Medium plus Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm

kultiviert. Die DNA wurde mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angabe des Herstellers isoliert.

Die Isolierung der Plasmid-DNA basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, anschließend erfolgt die Bindung der DNA an eine Anionen-Austauscher-Säule bei niedriger Salzkonzentration und geringem pH-Wert. Proteine, RNA und Verunreinigungen werden durch den anschließenden Waschschrift bei mittlerem Salzgehalt entfernt. Durch einen Puffer mit hohem Salzgehalt wird letztlich die DNA eluiert, mit Isopropanol gefällt, gewaschen und in H<sub>2</sub>O bidest. gelöst.

Für die Transfektion mit primären Neuronen war es notwendig, endotoxinfreie DNA-Lösung zu isolieren. Hierzu wurde der EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet, der nach demselben Prinzip abläuft. Jedoch wird nach der alkalischen Lyse ein Zwischenschritt eingeführt, der die Endotoxine größtenteils beseitigt.

### **Photometrische Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA**

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers durch Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 bei 260 nm entspricht etwa 50 µg DNA pro ml. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  erlaubt eine Abschätzung zur Reinheit der DNA. Der Quotient einer weitgehend proteinfreien DNA-Lösung sollte etwa bei 1,8 bis 2,0 liegen.

### **Sequenzierung und Analyse**

Um Mutationen durch die PCR-Reaktion auszuschließen, wurden alle Deletions- und Mutationskonstrukte von TM-Agrin durch die GATC Biotech AG (Konstanz) sequenziert. Dabei wurden sowohl Standardprimer verwendet, die mit dem Vektor hybridisieren, sodass in das Insert hineinsequenziert wurde, als auch spezifisch hergestellte Primer, die im Insert liegen und eine vollständige Sequenzierung ermöglichen. Der Vergleich der Sequenzdaten mit der publizierten DNA-Sequenz von TM-Agrin erfolgte mit Hilfe des Blast Programms im Internet auf [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

### **QuikChange® Site-Directed Mutagenesis**

Alle TM-Agrin-Mutationskonstrukte wurden mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) hergestellt. Dieser ermöglicht es, spezifische Mutationen in ein doppelsträngiges Plasmid einzufügen. Dazu werden zwei zueinander komplementäre Primer

benötigt, die die gewünschte Mutation ungefähr in der Mitte ihrer Sequenz enthalten. Mit Hilfe der *Pfu* Turbo DNA-Polymerase werden in einer PCR-Reaktion beide Plasmidstränge mit hoher Genauigkeit repliziert, ohne dass die Oligonukleotide verschoben oder abgespalten werden. Anschließend wird die methylierte parentale DNA spezifisch von der Endonuklease *DpnI* (Erkennungssequenz 5'-Gm<sup>6</sup> ATC-3') abgebaut. Die Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation wird anschließend in ultrakompetente XL10-Gold-Zellen (Stratagene) transformiert, und die kultivierten Bakterien werden auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Alle Versuchsschritte wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

### **3.2.2 Zellkulturmethoden**

#### **Beschichtung von Deckgläsern mit Fibronectin**

Die Kultivierung von 293HEK-Zellen für die immunohistochemischen Untersuchungen erfolgte auf Fibronectin-beschichteten Deckgläsern. Hierzu wurden sterilisierte runde Deckgläser mit 12 mm Durchmesser in eine 24-well-Platte überführt, mit jeweils 500 µl Fibronectinlösung (100 µg/ml Fibronectin in PBS) überschichtet und 2 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal mit sterilem PBS gewaschen und feucht bis zur Verwendung in PBS bei 4 °C maximal eine Woche lang gelagert.

#### **Kultivierung von 293HEK-Zellen**

Eingefrorene 293HEK-Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut, mit vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert, kurz bei 1000 g abzentrifugiert und der zytotoxische DMSO-haltige Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Zellpellet mit frischem Kulturmedium erneut resuspendiert und die Zellen in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % relativer Luftfeuchte. Je nach Teilungsrate wurden die Zellen bei einem konfluenten Zellrasen nach 2-3 Tagen passagiert. Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit vorgewärmter PBS-Lösung gewaschen und mit 500 µl 0,5 %iger Trypsin-PBS-Lösung versetzt. Die Zellen wurden für 2-3 Minuten im Brutschrank inkubiert, mit Medium von der Flaschenwand abgespült, mittels Pasteurpipette vereinzelt und im Verhältnis 1:4 bis 1:6 gesplittet.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie beim Passagieren trypsiniert, in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und jeweils etwa  $2-3 \times 10^6$  Zellen 5 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,8 ml Einfriermedium (90 % fetales Kälberserum (PAA), 10 % DMSO) resuspendiert, in Cryoröhrchen überführt und in eine ethanolgefüllte Einfrierbox gegeben. Dieses Verfahren bewirkt ein langsames Einfrieren mit einer Temperaturrate von 1-2 °C pro Minute im -80 °C Tiefkühlschrank.

### **Transfektion von 293HEK-Zellen**

#### Calciumphosphat-Transfektion

Die Transfektion mit Calciumphosphat beruht auf der endozytotischen Aufnahme der FremddNA in Form von feinkörnigen DNA-Calciumphosphat-Präzipitaten. Diese bilden sich, wenn eine DNA-CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit einer Phosphat-Lösung vermischt wird (Chen und Okayama, 1987).

Die Transfektionslösung setzte sich wie folgt zusammen: 420 µl 0,05x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 + 1 mM EDTA) wurden mit 7,5 µg des jeweiligen cDNA-Konstruktes in 60 µl steriler 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung vermischt. Anschließend wurde tropfenweise 480 µl 2x HBS (280 mM NaCl + 50 mM Hepes + 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) unter Vortexen hinzugegeben. Die Bildung des Präzipitats erfolgte nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Jeweils 50 µl eines Transfektionsansatzes wurden pro well einer 24-well-Gewebekulturschale eingesetzt. Nach 24 stündiger Inkubation der transfizierten Zellen bei 37° C erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 Stunden konnten die Zellen für immunozytochemische Experimente verwendet werden.

#### SuperFect® - Transfektion

Das SuperFect-Transfektions-Reagenz (Qiagen) ist ein aktiviertes Dendrimer mit einer kugelförmigen Struktur (Tang et al., 1996), mit dem ein breites Spektrum an Zelllinien transfiziert werden kann. Der Komplex aus SuperFect® und DNA hat eine positive Nettoladung, bindet an negativ geladene Rezeptoren auf der Zelloberfläche und dringt so in das Zellinnere ein. In der Zelle schützt SuperFect® zudem die DNA vor dem Abbau durch lysosomale Nukleasen. Die Transfektion erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

### **Präparation und Kultivierung von primären tektalen Neuronen**

Die optischen Tektata von Hühnern am Embryonaltag 7 (E7) wurden herauspräpariert und in vorgewärmtes PBS überführt. Anschließend erfolgte eine mechanische Zerkleinerung und

eine Inkubation mit 0,4 % Trypsin in 5 ml PBS für 15 Minuten bei 37° C. Dieser Schritt diente dazu, die Zellen zu vereinzeln, was für die darauf folgende Nukleofektion sowie die spätere immunohistochemische Auswertung der Versuche unerlässlich ist. Durch Zugabe von Kulturmedium I (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin / Streptomycin, 1 % GlutaMAX) wurde die Proteolyse durch Trypsin und somit der Vereinzlungsprozess gestoppt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1000 rpm (= 80 g) abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde daraufhin mit verengten Pasteur-Pipetten in 2 ml Kulturmedium I resuspendiert. Dieser Schritt wurde zwecks Vereinzlung der Zellen zwei- bis dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Kulturmedium I überführt und gezählt. Für die nachfolgende Nukleofektion wurden pro Ansatz etwa  $4 \times 10^6$  Zellen eingesetzt.

### **Nukleofektion von primären tektalen Neuronen**

Die Nukleofektions-Methode der Firma Amaxa ist besonders für primäre und schwer transfizierbare Zellen geeignet, da sie die Elektroporation mit optimierten und auf den jeweiligen Zelltyp spezifizierten Puffern kombiniert und so eine hohe Transfektionseffizienz und Überlebensrate sicherstellt. Die Nukleofektion der tektalen Neurone wurde mit dem „Chicken Neuron Nucleofector® Kit“, der Nukleofektor I Maschine und dem gespeicherten Programm G-13 nach Anweisung des Herstellers (Amaxa) durchgeführt. Pro Ansatz wurden etwa 6 – 8 µg DNA eingesetzt. Nach dem Nukleofektionsvorgang erfolgte mit Hilfe von Trypan-Blau die Bestimmung der Anzahl der überlebenden Zellen, und etwa 400.000 wurden auf vier mit PLL und Laminin beschichteten Deckgläschen in einer 35 mm Petrischale verteilt (~10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup>). Nach 4 - 6 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und gegen Kulturmedium II (Neurobasal A; 2% B27 supplement; 1 % GlutaMAX; 1 % Penicillin / Streptomycin) ausgetauscht. Die immunohistochemische Auswertung erfolgte nach 48 - 72 Stunden.

### 3.2.3 Immunohistologische Methoden

#### **Antikörperfärbung**

In dieser Arbeit wurden transfizierte 293HEK-Zellen sowie taktale Neurone immunocytochemisch analysiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und danach 5-7 Minuten mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (4 % PFA in PBS) bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS (je 5 min). Nach der Fixierung wurden die Zellen 15-20 Minuten lang bei RT mit Blocking-Lösung (10 % FCS in PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und um eventuell unzugängliche Epitope freizulegen. Die Inkubation mit primärem Antikörper, verdünnt in Blocking-Lösung, erfolgte entweder über Nacht bei 4° C oder für 2 - 3 Stunden bei RT. Danach wurden die Zellen wieder 3x 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen sekundären Antikörpern bzw. mit fluoreszenz-markiertem Phalloidin-Alexa 488 für 45-60 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Identifizierung der einzelnen Zellen wurde dann für 10 Minuten mit dem 1:200 in PBS verdünnten Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt, der spezifisch mit nuklearer DNA interagiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit PBS wurden die Deckgläschen kurz in H<sub>2</sub>O bidest. und danach in -20° C kaltes Ethanol getaucht. Schließlich wurden die Deckgläschen mit Eindeckmedium (Citifluor Fluorescent Mounting Medium) auf Objektträgern eingedeckelt. Die Auswertung der gefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DMRA).

#### **Lebendfärbung**

Eine Variante der soeben beschriebenen Antikörperfärbung stellt die sogenannte „Lebendfärbung“ dar. Sie diente bei den Transfektionsexperimenten mit TM-Agrin-Mutations- bzw. Deletionskonstrukten als Nachweis der exprimierten, mit GFP gekoppelten Proteine auf der Außenseite der Zellmembran. Bei dieser Färbemethode wurden 24 Stunden nach erfolgter Transfektion die kultivierten Zellen 2 Stunden lang mit im Kulturmedium verdünnten anti-GFP-Antikörpern versetzt (1:1000). Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen und fixiert, und es erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, rot-fluoreszierenden Alexa 594-Antikörper (verdünnt in PBS), um nicht die grüne Eigenfluoreszenz des GFP-Proteins im Mikroskop zu beobachten. Die Waschschriften und das Eindeckeln erfolgten wie oben beschrieben.

**Quantitative Auswertung der Ausläuferbildung**

Zur quantitativen Auswertung der Ausläufer-induzierenden Aktivität von TM-Agrin-Mutations- bzw. Deletionskonstrukten wurden 293HEK-Zellen wie in 3.2.2 beschrieben transfiziert und anschließend mit anti-TM-Agrin-AK oder GFP-Antikörper fluoreszenzmarkiert. Zur Ermittlung der Zellzahl diente die DAPI-Färbung. Die jeweiligen Konstrukte wurden als positiv (in Bezug auf ihre Fähigkeit, Ausläufer zu induzieren) gewertet, wenn die transfizierten Zellen mehr als zehn Fortsätze gebildet hatten, oder, falls weniger Fortsätze vorhanden waren, ein Ausläufer mindestens doppelt so groß war wie der Zelldurchmesser. Bei der Auswertung wurden einzeln liegende Zellen bevorzugt, da bei Zellverbänden keine klaren Aussagen über die Anzahl und Länge der Ausläufer gemacht werden konnten. Die Ergebnisse der statistischen Auswertungen wurden als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die Anzahl der unabhängigen Experimente betrug pro transfiziertem Konstrukt mindestens 3 mit jeweils mindestens 100 ausgewerteten Zellen.

Transfizierte Neurone wurden durch Färbung mit  $\beta$ -Tubulin-Antikörper identifiziert. Für die quantitative Auswertung wurden nur isolierte Neurone berücksichtigt, aus deren Neuriten die Ausläufer klar hervorgingen. Es wurden nur Ausläufer ab 3  $\mu$ m Länge gezählt. Als Ergebnis der statistischen Auswertungen wurde die Anzahl der Ausläufer pro 10  $\mu$ m Neuritenlänge als Mittelwert  $\pm$  S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die Anzahl der unabhängigen Experimente betrug pro transfiziertem Konstrukt mindestens 3 mit jeweils 10 ausgewerteten Neuronen.

### 3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### Zellyse

Konfluent mit Zellen bewachsene 35 mm Kulturschalen transfizierter bzw. untransfizierter 293HEK-Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion zunächst mit PBS gewaschen. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte durch Abschaben der Zellen mit 200 µl Lysepuffer und Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Mit Hilfe unterschiedlicher Kanülen der Größen 22G bis 27G wurden die Lysate homogenisiert und zudem die genomische DNA geschert. Die entstandenen Homogenisate wurden anschließend im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenauftragspuffer versetzt und bei 95° C für 5 Minuten hitzedenaturiert. Das Auftragen der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel erfolgte entweder direkt im Anschluss, oder die Proben wurden bis zu einer Woche bei -20° C gelagert.

#### Gelelektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung, deren Größe proportional zum Molekulargewicht ist. Dadurch wird das Auftrennen der Proteine in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe ermöglicht. Glykosylierte Proteine wie Agrin weisen ein etwas atypisches Laufmuster im Gel auf, da ihre Zuckerseitenketten kein SDS binden. Sie laufen nicht in einer streng begrenzten Bande, sondern in einem „Schmier“. Vollängen-Agrin erscheint beispielsweise als breite Bande im Bereich von 400 bis 600 kDa.

Alle verwendeten SDS-Polyacrylamidgele bestanden aus einem 4 % igem Sammelgel und einem Trenngel von variabler Größe (6 % - 16 %). Die Elektrophorese erfolgte bei 70 bis 80 V in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Sigma), die mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt wurde. Mit Hilfe des Größenstandards „Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus“ (MBI Fermentas) konnte das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmt werden.

#### Western-Blot

Der Western-Blot dient zum Nachweis bestimmter Proteine mit jeweils spezifischen Antikörpern. Die Proteine wurden hierzu nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran durch Anlegen einer elektrischen Spannung im Nassblottverfahren (Peqlab, Erlangen) übertragen. Die Stromstärke und die Übertragungs-

dauer wurden abhängig von der Größe bzw. dem Molekulargewicht der zu transferierenden Proteine gewählt (200–360 mA; 1,5-4 Stunden). Anschließend wurden unspezifische Proteinbindstellen mit Hilfe von 4 % Magermilchpulver in TBST-Puffer bei einer 30 minütigen Inkubationszeit abgesättigt. Die PVDF-Membranen wurden dann entweder über Nacht bei 4° C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur mit primären Antikörpern inkubiert.

Nach drei Waschschritten (jeweils 10 Minuten mit TBST) wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Spezies-spezifischen, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Detektion mit Hilfe von Chemilumineszenz-Reagenzien (SuperSignal® West Pico, Pierce) nach Vorschrift des Herstellers und anschließender Exposition der PVDF-Membran auf einem Röntgenfilm. Die Expositionsdauer betrug dabei abhängig von der Intensität des Signals zwischen wenigen Sekunden und etwa 5 Minuten. Anschließend wurden die Filme entwickelt, fixiert und nach einem Waschschriff getrocknet.

Die Filme wurden eingescannt und die Protein-Banden densitometrisch ausgewertet (Software: TINA 2.09, Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland). Die Intensität der Konstrukt-Banden wurde jeweils auf die Aktin-Bande bezogen.

### **3.2.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der gesamten Daten wurde mit der Graph Pad Prism Software Version 4.03 (Graph Pad Software, San Diego CA, USA) unter Verwendung des einseitigen *t*-Tests erstellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen zwei Messreihen wurden mit Sternchen versehen, die Irrtumswahrscheinlichkeit (*p*) wurde folgendermassen definiert:

unter 5%      ( $p < 0,05$ ; \*) = statistisch signifikant

unter 1%      ( $p < 0,01$ ; \*\*) = statistisch hoch signifikant

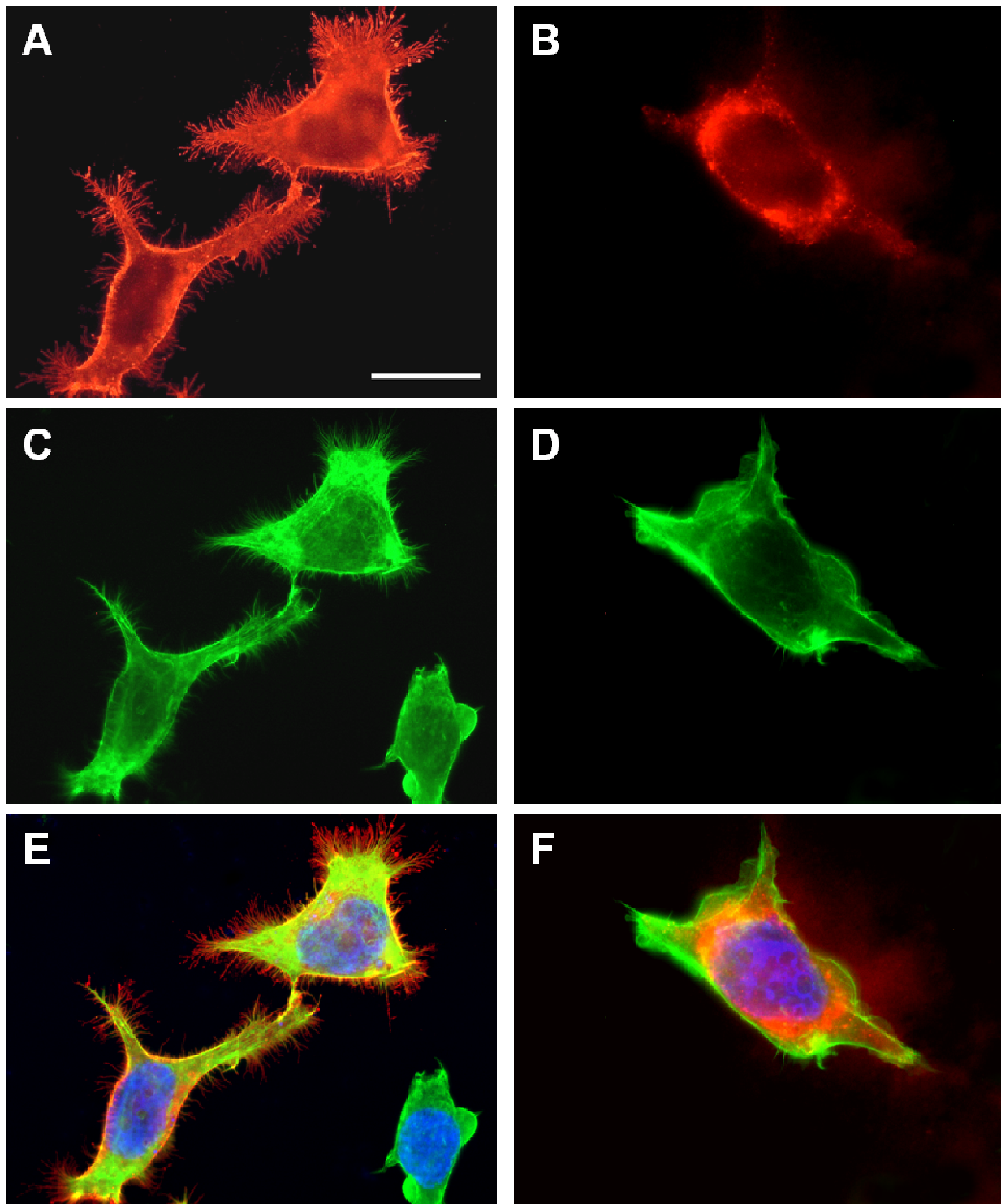
unter 0,01%   ( $p < 0,001$ ; \*\*\*) = statistisch extrem signifikant

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorarbeiten

Die Multimerisierung von TM-Agrin durch Zugabe polyklonaler Antikörper oder die Überexpression mittels Transfektion induziert die Bildung dynamischer, filopodienartiger Fortsätze auf Axonen und Dendriten von Neuronen aus ZNS oder PNS (McCroskery et al., 2006; Annies et al., 2006). Dieser Effekt konnte auch nach transienter Transfektion verschiedener Zelllinien (COS-7, PC-12 und HEK 293T) mit der aus Huhn gewonnenen cDNA von TM-Agrin beobachtet werden. Dabei zeigte sich auch, dass die Bindung von TM-Agrin an die Zellmembran eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung der Fortsätze ist. Denn die sekretierte Isoform NtA-Agrin, die sich von TM-Agrin nur in der N-terminalen Domäne unterscheidet und ansonsten identisch ist, ist nicht in der Lage, Fortsätze zu induzieren (Wöll, 2002) (Abb. 5).

Im Rahmen der Diplomarbeit von René Ramseger (Ramseger, 2004) wurden einige Deletionskonstrukte hergestellt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Hierbei handelte es sich um die Konstrukte TM-Agrin  $\Delta$ IC, TMFD9 und intTM-GFP (schematische Darstellung siehe Abb. 6). Diese Konstrukte wurden in HEK293T-Zellen transient transfiziert, die Zellen wurden fixiert und mit Agrin-Antikörpern und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Dabei zeigte sich, dass die Konstrukte TM-Agrin  $\Delta$ IC und TMFD9 in der Lage waren, die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und die Ausbildung filopodienartiger Fortsätze zu induzieren, das Konstrukt intTM-GFP jedoch nicht mehr (siehe Abb. 6 für die schematische Darstellung, Abb. 7 für die quantitative Auswertung der transfizierten Zellen). Daraus folgt, dass die für diesen Effekt verantwortliche Region von TM-Agrin im Bereich der N-terminalen Follistatin-Domänen liegen muss (siehe Abb. 6). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Forschungsgruppe um Mathew Daniels, die die N-terminale Hälfte des extrazellulären Teils von TM-Agrin als verantwortliche Region identifizierte (McCroskery et al., 2006).

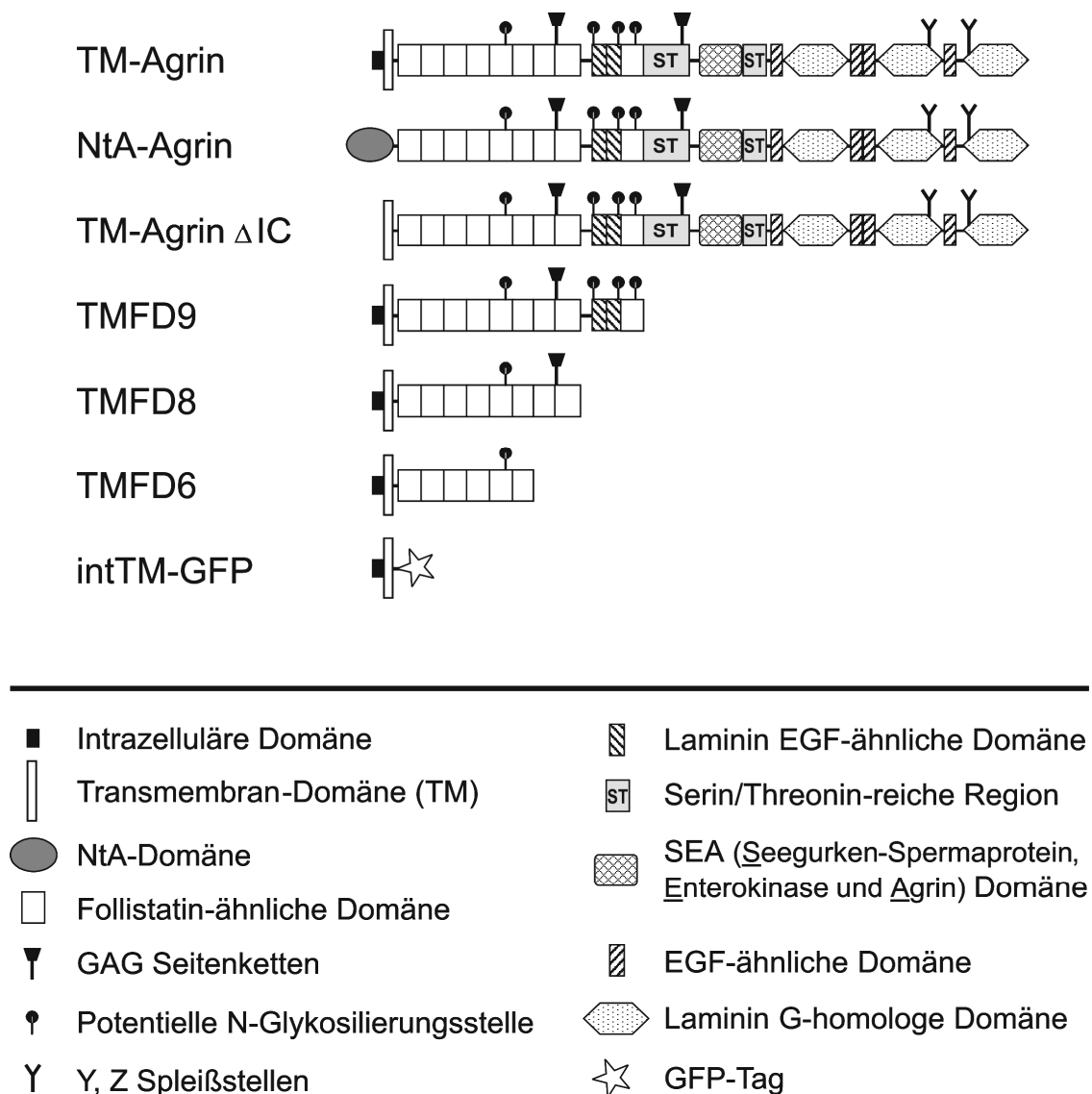


**Abb. 5: HEK 293T-Zellen nach Transfektion mit Agrin.** HEK 293T-Zellen nach transientscher Transfektion mit TM-Agrin cDNA(A, C, E) und NtA-Agrin cDNA(B, D, F). Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit anti-Agrin-Antikörper (A, B) bzw. Alexa488-konjugiertem Phalloidin (C, D) gefärbt. Während die Expression von NtA-Agrin keinen Einfluss auf die Morphologie der transfizierten Zellen hat, führt die TM-Agrin-Expression in transfizierten Zellen zur Bildung zahlreicher filopodienartiger Fortsätze, die bis in die Spitzen mit Aktin-Filamenten gefüllt sind (E). Untransfizierte Zellen zeigen den Effekt nicht (C, E, Zelle rechts unten). Überlagerung sowie Bisbenzimid- (DAPI)-Färbung des Zellkerns (blau, E, F) Skalierbalken in A 20µm.

## 4.2 Lokalisierung der Fortsatz-induzierenden Region

### 4.2.1 Grobkartierung der Fortsatz-induzierenden Region

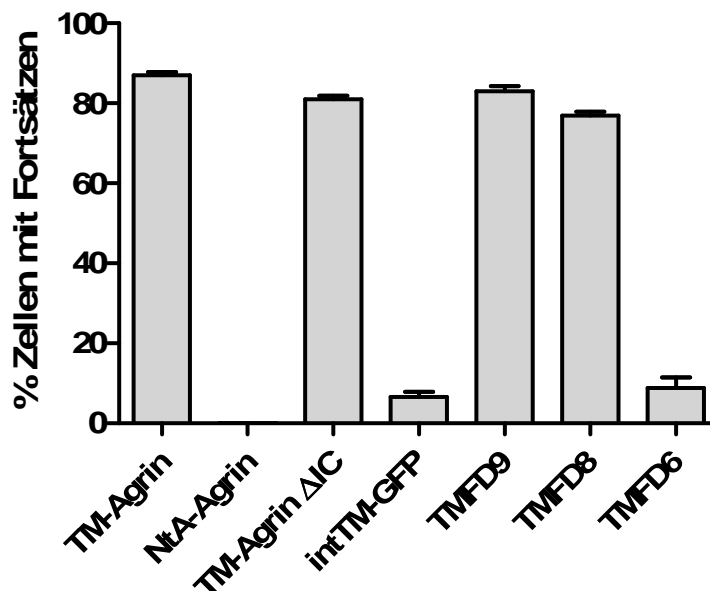
Um herauszufinden, welche Domäne von TM-Agrin für die Induktion der filopodienartigen Fortsätze verantwortlich ist, wurden verschiedene Deletionskonstrukte hergestellt (Abb. 6). Die cDNA dieser Konstrukte wurde in HEK 293T-Zellen transfiziert, 24 Stunden später wurden die Zellen fixiert und mit dem TM-Agrin-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Deletionskonstrukte von TM-Agrin.** Die verschiedenen Domänen der TM-Agrin-Deletionskonstrukte für die Grobkartierung der Fortsatz-induzierenden Region und anhängende GFP-Tags sind angegeben.

Die quantitative Auswertung (siehe Material und Methoden Kap. 3.2.3) ergab, dass nach Transfektion von TM-Agrin, TM-Agrin  $\Delta$ IC, TMFD9 und TMFD8 ca. 80-85 % der transfizierten Zellen filopodienartige Fortsätze ausbildeten. Diese Fortsätze beruhten auf einer Reorganisation des Zytoskeletts und enthielten Aktin, genauso wie die in ZNS-Axonon induzierten Fortsätze (Annie et al., 2006). Nach Transfektion mit NtA-Agrin wurden keine Fortsätze ausgebildet, bei den Konstrukte intTM-GFP und TMFD6 waren weniger als 10 % der transfizierten Zellen mit Fortsätzen versehen (Abb. 7).

Da TMFD8 Fortsätze induziert, während TMFD6 dazu nicht in der Lage ist, folgt daraus, dass die für die Bildung der filopodienartigen Fortsätze notwendige Region von TM-Agrin im Bereich der 7. und 8. Follistatin-ähnlichen Domäne liegen muss.



**Abb. 7: Grobkartierung der Fortsatz-induzierenden Region.** Durchschnittliche Anzahl der transfizierten Zellen mit ausgebildeten Fortsätzen. Der Bereich der 7. und 8. Follistatin-ähnlichen Domäne ist notwendig für die Bildung der Fortsätze. Der Fehlerbalken entspricht +/- SEM mit n = 3.

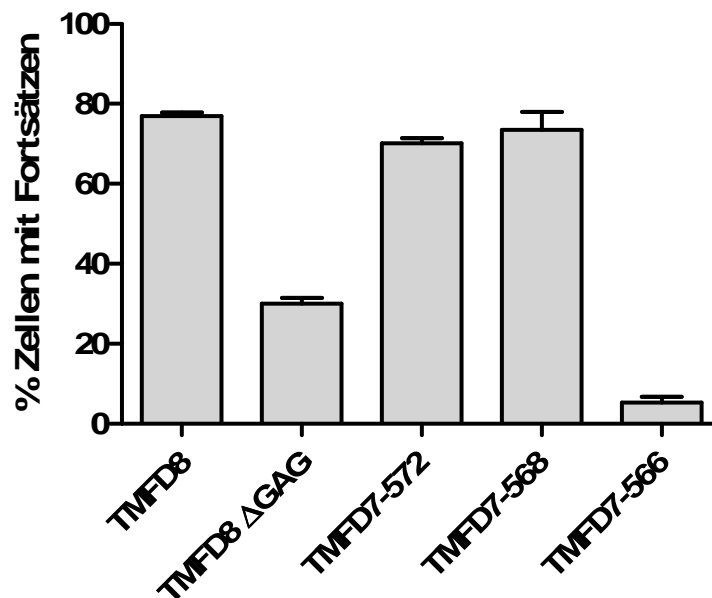
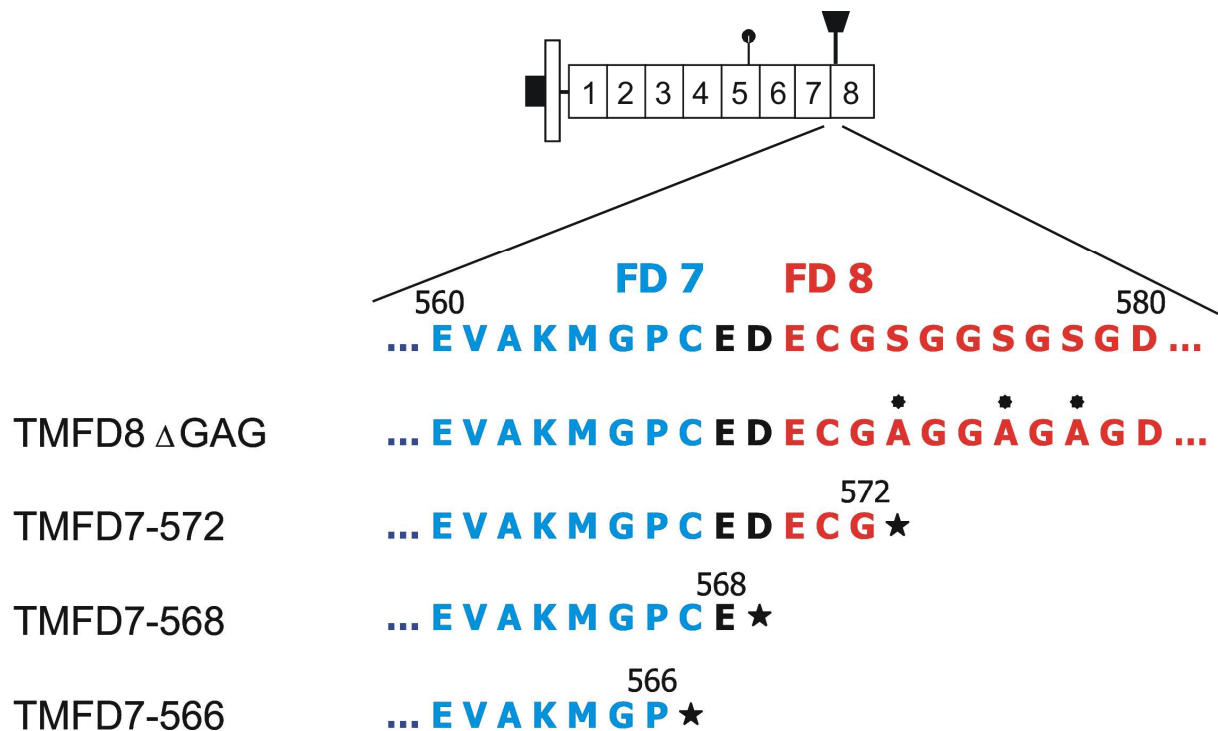
#### 4.2.2 Einfluss der Glycosaminoglycan-Seitenketten auf die Bildung der Fortsätze

Die 8. Follistatin-Domäne von TM-Agrin unterscheidet sich von den übrigen Follistatin-Domänen. An ihrem N-Terminus befindet sich ein Serin-Glycin-Cluster, der als Bindungsstelle für Glycosaminoglycan-(GAG) Seitenketten fungiert. Eine weitere Bindungsstelle befindet sich in der ersten Serin-Threonin-reichen Region (Abb. 1). An die drei Serine 573, 576 und 578 lagern sich insgesamt zwei Heparansulfat-Seitenketten an (Winzen et al., 2003). Um den Einfluss dieser Glycosaminoglycan-Seitenketten am N-Terminus der 8. Follistatin-ähnlichen Domäne auf die Bildung der Fortsätze zu untersuchen, wurden an diesen drei Positionen Serin zu Alanin mutiert. Das Protein dieses Konstruktes (TMFD8  $\Delta$ GAG), welches keine GAG-Seitenketten mehr binden kann, wurde nach Transfektion in HEK 293T-Zellen exprimiert. Die Anzahl der Fortsätze tragenden Zellen reduzierte sich auf etwa 30 % aller transfizierten Zellen (Abb. 8). Dies deutet auf einen Einfluss der GAG-Seitenketten auf die Bildung der filopodienartigen Fortsätze hin.

In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten (Winzen et al., 2003; Baerwald-De La Torre et al., 2004) führte die Einzel- oder Doppelmutation der Serine 573 und 576 zu Alanin zu keinem Verlust bei der Induzierung der Fortsätze (Daten nicht gezeigt), da alle Serine funktionell gleichwertig sind und der Verlust von ein oder zwei Serinen als Anlagerungsstelle für GAG-Seitenketten durch das verbleibende Serin kompensiert werden kann.

Die vollständige Deletion der GAG-Seitenketten-Anlagerungsstelle hingegen führte zu einer Wiederherstellung der Fortsatz-induzierenden Aktivität (Konstrukte TMFD7-572 und TMFD7-568, Abb. 8). Damit zeigt sich, dass Punktmutation der Serine, die als GAG-Seitenketten-Akzeptoren dienen, zu einem Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität führt, die Deletion der gesamten Region aber nicht. Eine Erklärung wäre, dass die Mutation der drei Serine und der damit verbundene Verlust der Heparansulfat-Seitenketten möglicherweise zu einer Änderung der dreidimensionalen Struktur des Proteins und dadurch zu einer Reduzierung der Fortsatz-induzierenden Aktivität führt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Heparansulfat-Seitenketten für die Fortsatz-induzierende Aktivität von TM-Agrin entbehrlich sind.



**Abb. 8: Die GAG-Seitenketten sind nicht notwendig für die Induzierung der Fortsätze.** Die Mutation der Serine 573, 576 und 578 zu Alanin ergab ein Konstrukt ohne GAG-Seitenketten (TMFD8 ΔGAG). Die Expression in HEK293T-Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion der Fortsatz-Induzierung auf nur noch ca. 30 % der transfizierten Zellen. Die vollständige Deletion der GAG-Seitenketten-Anlagerungsstelle (Konstrukte TMFD7-572 und TMFD7-568) hingegen führt zu einer Wiederherstellung der Fortsatz-induzierenden Aktivität. Dies deutet auf einen vernachlässigbaren Einfluss der GAG-Seitenketten auf diesen Effekt hin. Die Deletion zweier weiterer Aminosäuren (Glutaminsäure 568 und Cystein 567) führt zu einem nahezu vollständigen Verlust der Fortsatz-Induzierung (Konstrukt TMFD7-566). Der Fehlerbalken entspricht +/- SEM mit n = 3.

### 4.2.3 Einfluss der Disulfidbrücke C535-C567 auf den Fortsatz-induzierenden Effekt

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die Heparansulfat-Seitenketten in der 8. Follistatin-Domäne keinen Einfluss auf die Fortsatz-induzierende Aktivität von TM-Agrin haben, wurde die 7. Follistatin-Domäne näher betrachtet. Nachdem sich nach Transfektion mit dem Konstrukt TMFD7-568 Fortsätze bildeten, wurden im nächsten Schritt zwei weitere Aminosäuren deletiert (Konstrukt TMFD7-566). Dieses Konstrukt wies nach Transfektion in HEK 293T-Zellen einen vollständigen Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität auf (Abb. 8). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass entweder Glutaminsäure 568 oder Cystein 567 an der Fortsatz-induzierenden Aktivität beteiligt ist.

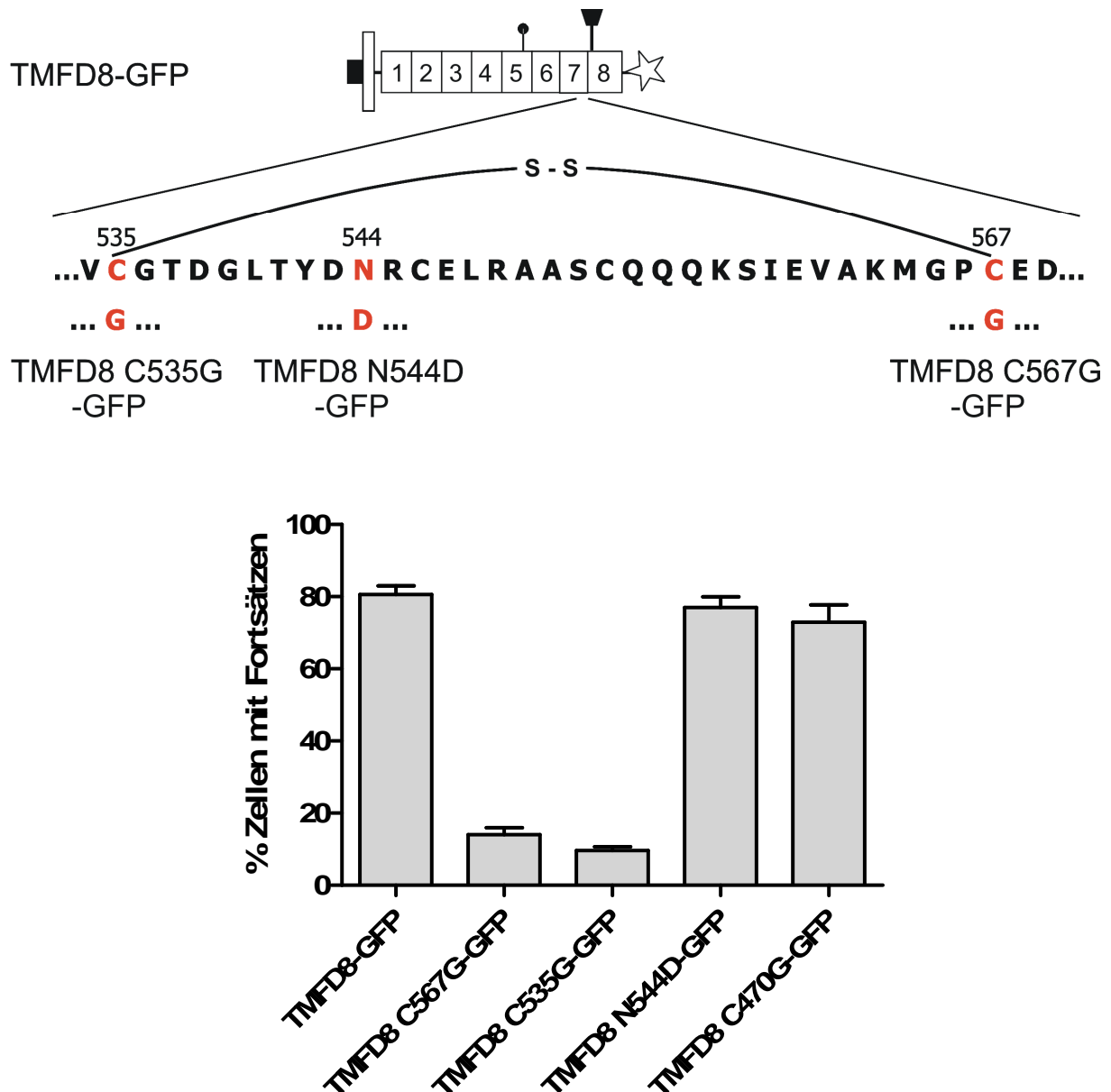
Daraufhin wurde Cystein 567 mittels ortsspezifischer Mutagenese (Strategene) zu Glycin mutiert (Konstrukt TMFD8 C567G-GFP, Abb. 9). Die Transfektion mit diesem Konstrukt ergab einen fast vollständigen Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität. Somit wurde gezeigt, dass das Cystein 567 in der 7. Follistatin-Domäne für diesen Effekt benötigt wird. Ein C-terminal angehängtes GFP-Tag diente zur Kontrolle der korrekten Membran-Orientierung (siehe Kap 4.3.). Das nichtmutierte Kontroll-Konstrukt TMFD8-GFP zeigte eine gleich starke Fortsatz-induzierende Aktivität wie Vollängen-TM-Agrin (etwa 80 % der transfizierten Zellen haben Fortsätze), der Leervektor pEGFP-N1 jedoch gar keine (nicht gezeigt). Damit ist ausgeschlossen, dass das GFP-Tag selbst einen Einfluss auf den fortsatz-induzierenden Effekt hat.

Die Struktur der Follistatin-Domäne wurde beim Glykoprotein BM-40 bereits mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse ermittelt (Hohenester et al., 1997), und die Ergebnisse weisen auf eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C567 und C535 hin. Um die essentielle Rolle dieser Disulfidbrücke auf die Fortsatz-induzierende Aktivität zu bestätigen, wurde im nächsten Schritt das Cystein an Position 535 mutiert (Konstrukt TMFD8 C535G-GFP). Die Transfektion von 293HEK-Zellen mit diesem Konstrukt ergab ebenfalls nur noch wenige Zellen mit Fortsätzen, was auf eine wichtige Funktion der Disulfidbrücke C567-C535 bei der Fortsatz-induzierenden Aktivität von Transmembran-Agrin schließen lässt und das vorherige Ergebnis bestätigt (Abb. 9).

Im Gegensatz dazu hatte die Mutation des zu C535 homologen Cysteins in der 6. Follistatin-Domäne (TMFD8 C470G-GFP) keinen Einfluss auf die Induzierung der Fortsätze. Ebenso führte die Mutation der zwischen den beiden Cysteinen liegenden potentiellen Glykosylierungsstelle Asparagin 544 zu Asparaginsäure (TMFD8 N544D-GFP) zu keiner Abnahme

der Fortsatz-induzierenden Aktivität (Abb. 9). Dies zeigt, dass diese beiden untersuchten Bereiche von TM-Agrin keinen Einfluss auf den Effekt haben.

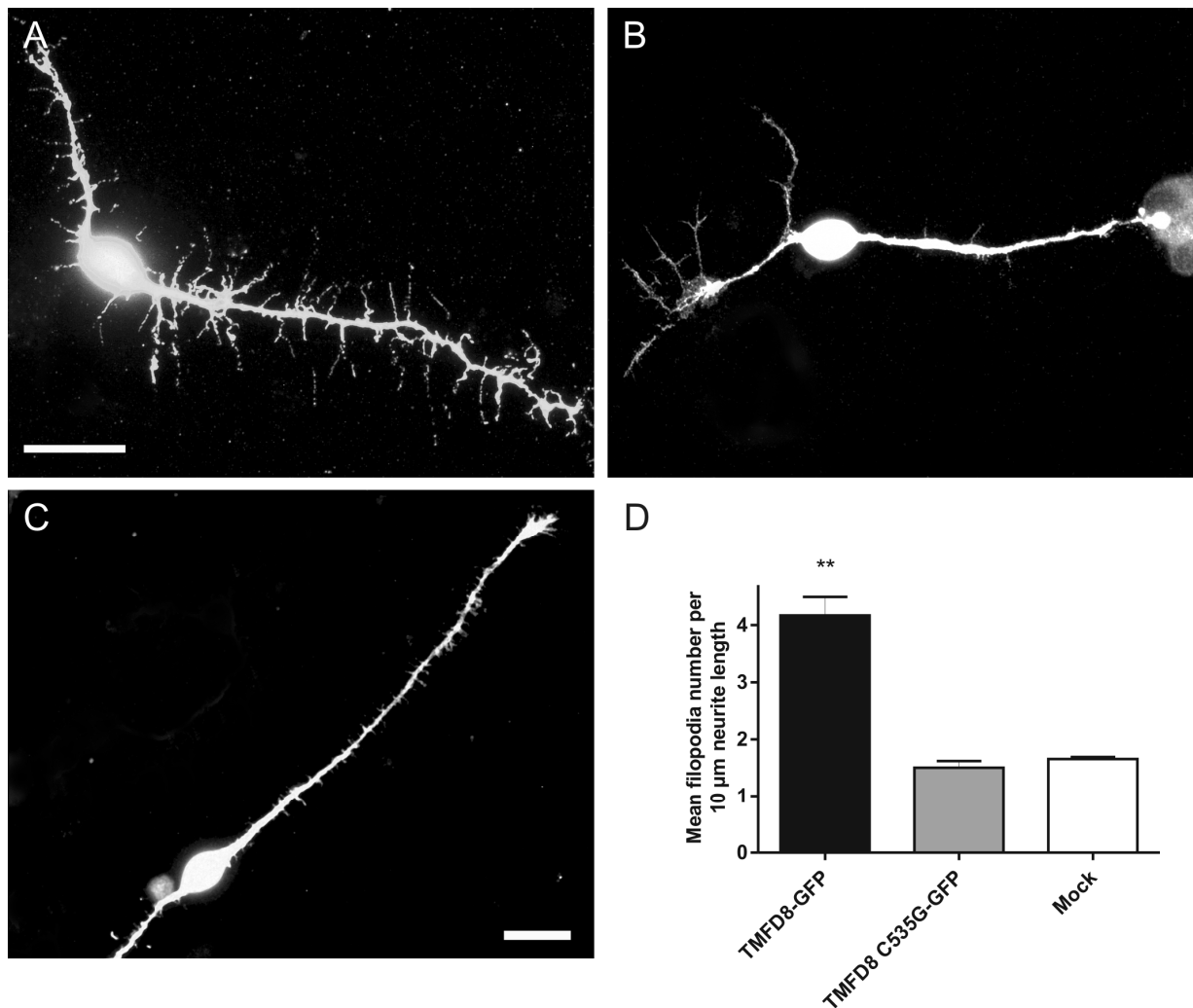
Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die durch die Disulfidbrücke C535-C567 gebildete Proteinstruktur in der 7. Follistatin-ähnliche Domäne für die Fortsatz-induzierende Aktivität von Transmembran-Agrin von entscheidender Bedeutung ist.



**Abb. 9:** Die Unterbrechung der Disulfidbrücke C535-C567 in der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne hebt die Fortsatz-induzierende Aktivität von TM-Agrin auf. Die Cysteine C535 und C567 wurden zu Glycin mutiert (TMFD8 C535G-GFP und TMFD8 C567G-GFP), was nach Transfektion zu einem vollständigen Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität von TM-Agrin führt. Die Mutation einer potentiellen Glykosylierungsstelle zwischen beiden Cysteinen (TMFD8 N544D-GFP) und eines homologen Cysteins der 6. Follistatin-ähnlichen Domäne (TMFD8 C470G-GFP) hat keinen Einfluss auf die Fortsatz-induzierende Aktivität. Fehlerbalken entspricht +/- SEM mit n = 3.

#### 4.2.4 Überexpression von TM-Agrin-Mutationskonstrukten in primären Neuronen

Um zu zeigen, dass dieselbe Region von TM-Agrin auch für die filopodienartigen Fortsätze in Neuronen verantwortlich ist, wurden tektale Neurone aus dem Hühnerembryo transfiziert. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass diese Neurone prinzipiell in der Lage sind, nach dem Clustern von TM-Agrin mittels polyklonaler Antikörper filopodienartige Ausläufer zu bilden (Annie et al., 2006). Sie eignen sich also gut für die Untersuchung der Fortsatz-induzierenden Aktivität der verschiedenen TM-Agrin-Konstrukte.



**Abb. 10: Transfektion der TM-Agrin-Mutationskonstrukte in Neurone bestätigt, dass die Disulfidbrücke C535 – C567 die für den Fortsatz-induzierenden Aktivität verantwortliche Region von TM-Agrin ist.** Primäre tektale Neurone aus Huhn (E7) wurden mit TMFD8-GFP (A), TMFD8 C535G-GFP (B) und dem Leervektor pEGFP-N1 (Mock) (C) transfiziert und nach 3 Tagen fixiert und mit GFP-Antiserum gefärbt. TMFD8-GFP-transfizierte Neurone zeigen eine 2,5-fache Erhöhung der Filopodienzahl im Bezug auf das mutierte Konstrukt bzw. die Kontrolle ( $p < 0,01$ ) (D). Fehlerbalken entspricht  $\pm$  SEM mit  $n = 3$  (mit je 10 ausgewerteten Neuronen), Skalierung 20  $\mu\text{m}$ .

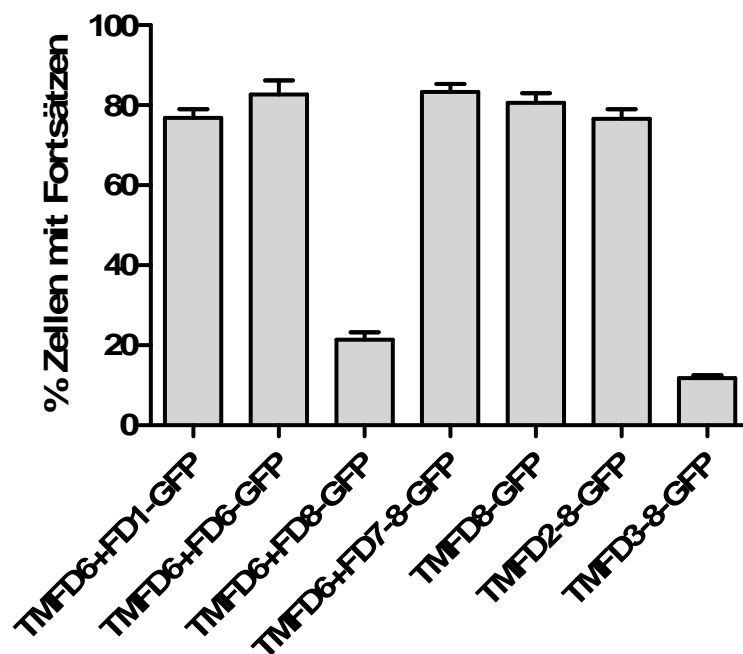
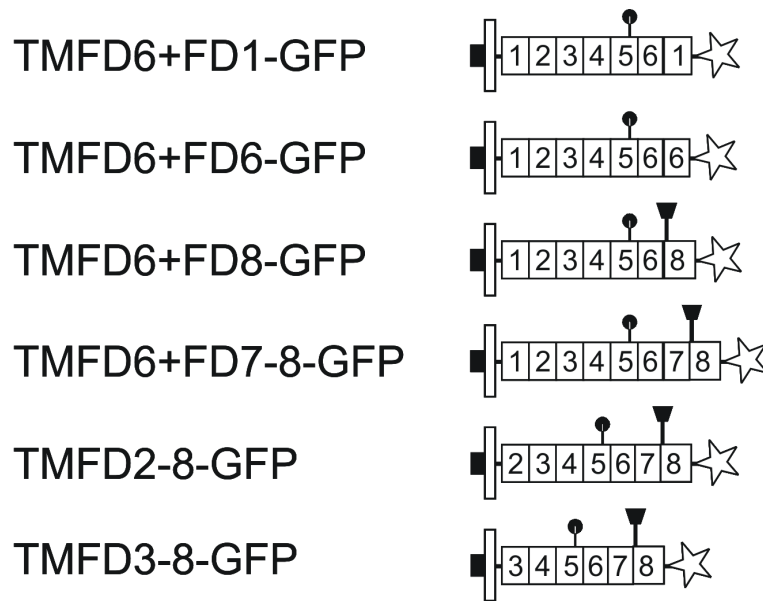
Mit Hilfe der Nukleofector<sup>®</sup>-Methode von Amaxa (siehe Kap. 3.2.2) wurden primäre tektale Neurone des Hühnerembryos (isoliert am Embryonaltag 7) mit cDNA der Konstrukte TMFD8-GFP, TMFD8 C535G-GFP und als Kontrolle mit dem Leervektor pEGFP-N1 transfiziert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit GFP-Antiserum sowie mit anti- $\beta$ -Tubulin-Antikörpern als Neuronmarker gefärbt. Die Anzahl der Fortsätze bezogen auf 10  $\mu$ m Neuritenlänge wurde bestimmt. Hierbei wurden durch das Konstrukt TMFD8-GFP etwa 2,5-mal so viele Fortsätze wie durch TMFD8 C535G-GFP bzw. die Negativkontrolle pEGFP-N1 induziert (Abb. 10).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse aus den Transfektionsexperimenten in HEK 293T-Zellen auch auf primäre tektale Neurone übertragbar sind.

#### **4.2.5 Funktioneller Ersatz der 7. Follistatin-Domäne**

Um die Spezifität des Fortsatz-induzierenden Effektes von TM-Agrin näher zu untersuchen, wurde die 7. Follistatin-Domäne durch andere Follistatin-Domänen Agrins ersetzt. Dabei zeigte sich, dass ein Ersatz der 7. Follistatin-Domäne durch die 1. bzw. 6. Follistatin-Domäne keinen Einfluss auf die Fortsatz-induzierende Aktivität hat. Das bedeutet, dass sich diese Follistatin-Domänen so sehr ähneln, dass sie alle in der Lage sind, filopodienartige Ausläufer zu induzieren. Im Gegensatz dazu führte ein Ersatz der 7. durch die 8. Follistatin-Domäne zu einer Abnahme der Fortsatzbildung auf etwa 20 % der transfizierten HEK 293T-Zellen. Diese Heterogenität der verschiedenen Domänen liegt wohl in erster Linie an den Glycosaminoglycan-Seitenketten am N-Terminus der 8. Follistatin-ähnlichen Domäne, die die Fortsatz-induzierende Aktivität, möglicherweise aus sterischen Gründen, beeinflussen (Abb. 11).

Des Weiteren wurde die Frage untersucht, ob der Abstand der induzierenden Region zur Plasmamembran Auswirkungen auf die Bildung der Fortsätze hat. Hierzu wurde die 1. Follistatin-Domäne des TMFD8-GFP-Konstruktes deletiert, was keinen Einfluss auf die Aktivität hatte. Eine Deletion der 1. und 2. Follistatin-Domäne führte jedoch zu einem nahezu vollständigen Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität (Abb. 11). Dieses Ergebnis zeigt, dass neben der Membranassoziiierung von Agrin ein bestimmter Abstand der 7. Follistatin-Domäne zur Membran wichtig für die Bildung der filopodienartigen Fortsätze ist.



**Abb. 11: Spezifität der Fortsatz-induzierende Aktivität der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne.**

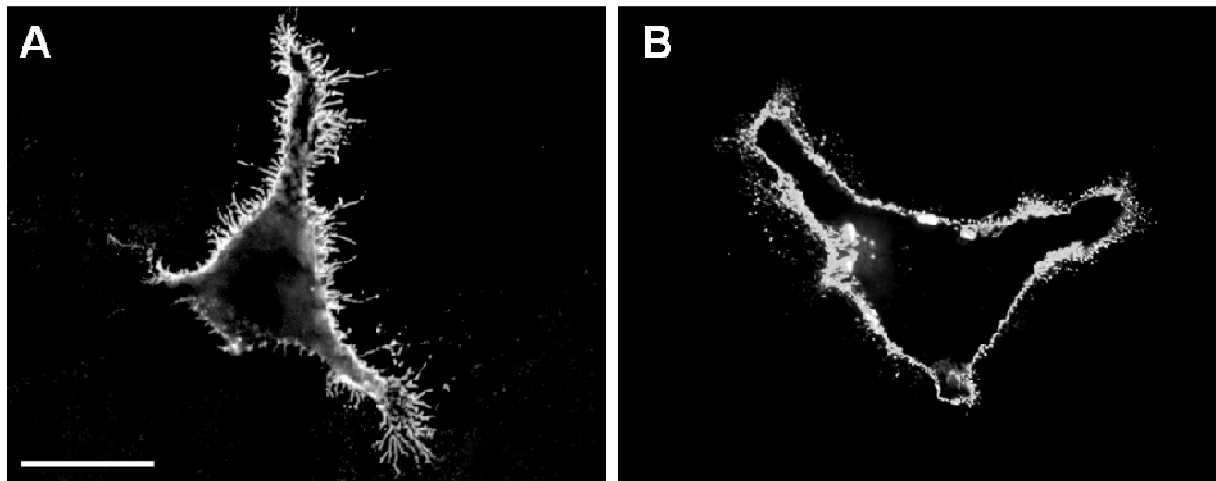
Ein Ersatz der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne durch die 1. bzw. 6. Follistatin-ähnliche Domäne hat keinen Einfluss auf die Fortsatz-induzierende Aktivität. Ersetzt man sie allerdings mit der 8. Follistatin-ähnlichen Domäne, so werden keine Fortsätze induziert. Aus technischen Gründen wurde bei der Klonierung der Konstrukte eine Insertion (N504) am C-Terminus der 6. Follistatin-ähnlichen Domäne vorgenommen, was aber keinen Einfluss auf die Fortsatz-induzierende Aktivität hatte (vgl. TMFD6+FD7-8-GFP mit TMFD8-GFP). Der Abstand der Fortsatz-induzierenden Region von TM-Agrin zur Plasmamembran ist hingegen wichtig für den Effekt. Die Deletion der ersten beiden Follistatin-ähnlichen Domänen führt zu einem Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität. Fehlerbalken entspricht +/- SEM mit n = 3.

### 4.3 Integration der TM-Agrin-Konstrukte in die Zellmembran

Die fehlende Fortsatz-induzierende Aktivität der TM-Agrin-Mutationskonstrukte TMFD8 C535G-GFP bzw. TMFD8 C567G-GFP könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Proteine nicht in der richtigen Orientierung in die Plasmamembran integriert werden oder schwächer exprimiert werden als das Fortsatz-induzierende Konstrukt TMFD8-GFP. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde eine sogenannte Lebendfärbung durchgeführt.

Dazu wurden HEK 293T-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion 2 Stunden lang mit normalem DMEM-Kulturmedium inkubiert, dem anti-GFP-Antiserum zugefügt wurde. Anschließend wurden die Zellen fixiert und unter nicht-permeabilisierenden Bedingungen mit einem sekundären Alexa 594-Antikörper inkubiert. Hierbei wurde nur das extrazelluläre GFP-Tag rot angefärbt, die GFP-Eigenfluoreszenz erscheint im Fluoreszenzmikroskop bei einer anderen Wellenlänge im grünen Bereich und wurde nicht detektiert.

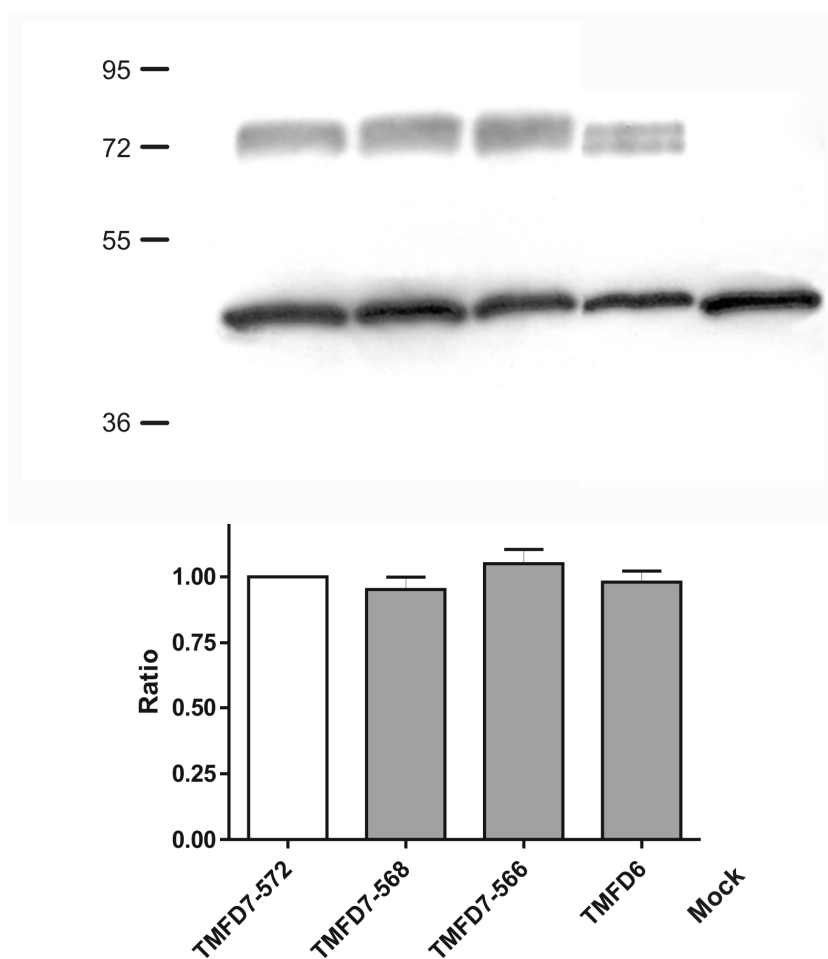
Es zeigte sich, dass die TM-Agrin-Mutationskonstrukte ohne Fortsatz-induzierende Aktivität ebenso stark wie Fortsatz-induzierende Konstrukte exprimiert werden (siehe auch Kap. 4.4) und auch in der richtigen Orientierung in die Plasmamembran integriert werden (Abb. 12).



**Abb. 12: Integration der TM-Agrin-Mutationskonstrukte in die Plasmamembran.** Die cDNA der Konstrukte TMFD8-GFP (A) und TMFD8 C535G-GFP (B) wurde in HEK 293T-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für 2 Stunden mit dem normalen Kulturmedium versetzt, dem anti-GFP-Antiserum zugefügt wurde, anschließend fixiert und mit einem sekundären Alexa 594-Antikörper gefärbt. Beide Konstrukte wurden gleichmäßig exprimiert (siehe auch Kap. 4.4) und in die Plasmamembran eingebaut, auch wenn nur TMFD8-GFP in der Lage ist, Fortsätze zu induzieren (A). Skalierbalken in A 20µm.

## 4.4 Expression der TM-Agrin-Konstrukte

Die fehlende Fortsatz-induzierende Aktivität einiger Konstrukte könnte darin begründet sein, dass das Protein nach der Transfektion geringer exprimiert und/oder wieder abgebaut wird. Um dies auszuschließen, wurden gleich große Ansätze von HEK 293T-Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Das homogenisierte Zelllysate wurde mittels SDS-PAGE / Western Blot aufgetrennt und analysiert (siehe Kap. 3.2.4).

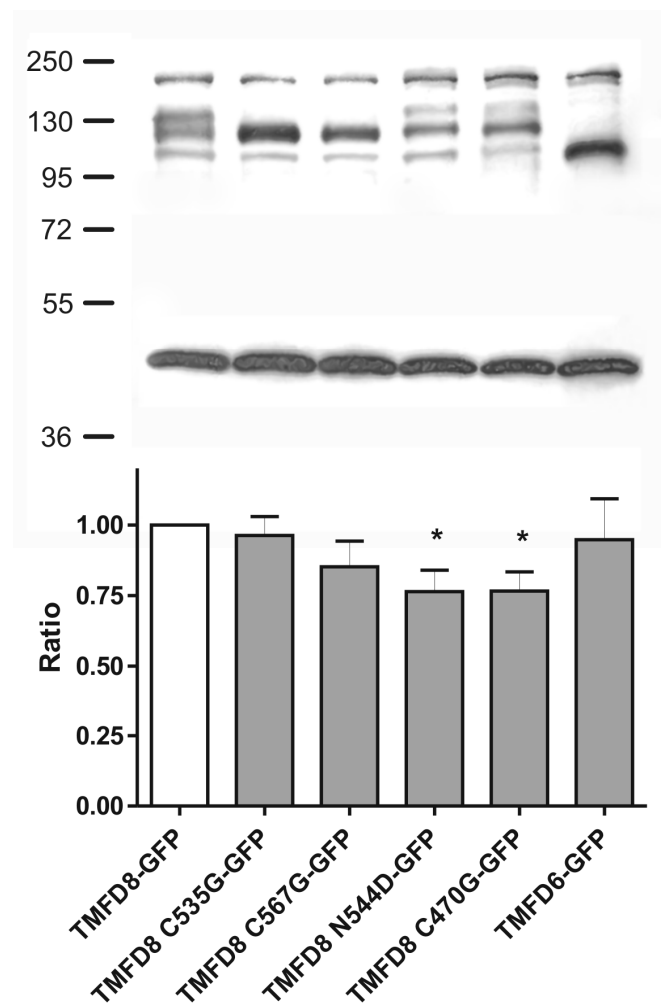


**Abb. 13: Gleiche Expressionsrate der TM-Agrin-Deletionskonstrukte.** SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot von transfizierten HEK293T-Zelllysaten. Die Fortsatz-induzierenden Konstrukte TMFD7-572 und TMFD7-568 sowie die Deletionskonstrukte ohne Fortsatz-induzierende Aktivität TMFD7-566 und TMFD6 ergaben im Western Blot nach Detektion mit TM-Agrin-Antiserum eine breite Bande bei etwa 75 kDa. Ein Zelllysate nach Transfektion mit dem pcDNA4/TO-Vektor ergab keine Bande (Mock). Zur Quantifizierung wurde Aktin (Bande bei 43 kDa) codetektiert. Die Expression wurde densitometrisch quantifiziert und auf die Kontrolle bezogen (heller Balken). Alle Konstrukte wurden gleichmäßig exprimiert. Fehlerbalken entspricht +/- SEM mit n = 5.

Zur Detektion der exprimierten Konstrukte wurden das anti-TM-Agrin- sowie das anti-GFP-Antiserum eingesetzt. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung wurde Aktin mit Hilfe

von anti-Aktin-Antikörpern codetektiert. Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch durch Normalisierung der Intensitäten der TM-Agrin-Banden auf die Aktin-Bande. Die Expressionsrate des Fortsatz-induzierenden Konstruktes TMFD7-572 wurde als Referenzwert festgelegt und die Expressionsrate der anderen Proteine hierauf bezogen.

Hierbei zeigte sich, dass die Konstrukte TMFD7-566 und TMFD6, die keine Fortsatz-induzierende Aktivität aufweisen, ebenso stark exprimiert werden wie die Fortsatz-induzierenden Konstrukte TMFD7-572 und TMFD7-568 (Abb. 13).



**Abb. 14: Gleiche Expressionsrate bei TM-Agrin-Mutationskonstrukten.** SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot von transfizierten HEK 293T-Zelllysaten. Die TMFD8-GFP-Mutationskonstrukte zeigten im Western Blot nach Detektion mit GFP-Antiserum eine breite Einzelbande bzw. eine Doppelbande im Bereich von 120-135 kDa, TMFD6-GFP von etwa 100 kDa. Aktin (Bande bei 43 kDa) wurde zur Quantifizierung codetektiert. Die Expression wurde densitometrisch quantifiziert und auf die Kontrolle TMFD8-GFP bezogen (heller Balken). Nur die beiden Fortsatz-induzierenden Mutationskonstrukten TMFD8 N544D-GFP und TMFD8 C470G-GFP wurden signifikant geringer exprimiert (~ 25 %,  $p < 0,05$ ) als die Kontrolle TMFD8-GFP. Fehlerbalken entspricht +/- SEM mit  $n = 5$ .

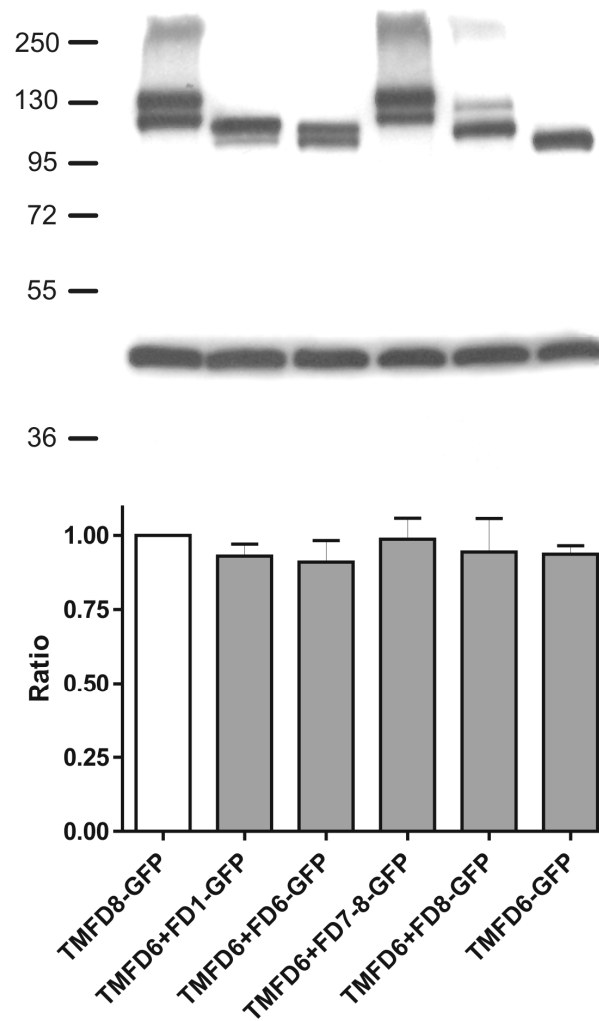
Im Gegensatz zu den TM-Agrin-Deletionskonstrukten (Abb. 13) zeigt die Expression der TMFD8-GFP-Mutationskonstrukte im Western Blot mehrere verschiedene Banden. In die Auswertung einbezogen wurden hierbei entweder eine breite Einzelbande bzw. eine Doppelbande im Bereich von 120-130 kDa (beim Konstrukt TMFD6-GFP die Einzelbande bei etwa 100 kDa). Eine mögliche Erklärung für die Doppelbanden könnten Unterschiede in der Glykosylierung sein. Die Bande oberhalb von 200 kDa deutet auf Dimerisierung hin und wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Wie bei den TM-Agrin-Deletionskonstrukten wurden die Intensitäten der Banden der TM-Agrin-Mutationskonstrukte auf die Aktin-Bande normalisiert. Die Expressionsrate des Fortsatz-induzierenden Konstruktes TMFD8-GFP wurde als 100% gesetzt und die Expressionsrate der anderen Proteine hierauf bezogen.

Hierbei zeigte sich, dass die nicht-Fortsatz-induzierenden Konstrukte TMFD8 C535G-GFP und TMFD8 C567G-GFP ebenso stark exprimiert wurden wie die Kontrolle TMFD8-GFP, wohingegen die Konstrukte TMFD8 N544D-GFP (76 %  $\pm$  8 %) und TMFD8 C470G-GFP (77 %  $\pm$  7 %) signifikant schwächer exprimiert wurden ( $p < 0,05$ , Abb. 14). Allerdings sind diese beiden Konstrukte in der Lage, Fortsätze zu induzieren (Abb. 9). Die geringere Expression hat darauf keinen signifikanten Einfluss.

Die fehlende Fortsatz-induzierende Aktivität der Konstrukte TMFD8 C535G-GFP und TMFD8 C567G-GFP kann somit nicht auf eine geringere Expression zurückgeführt werden. Der Austausch der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne mit anderen Follistatin-Domänen von TM-Agrin hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Expressionsrate der Proteine (Abb. 15). Auch das Konstrukt TMFD6+FD8-GFP, dessen Fortsatz-induzierende Aktivität stark vermindert ist (siehe Abb. 11), wird ebenso stark exprimiert wie die Positivkontrolle TMFD8-GFP bzw. wie das Konstrukt TMFD6-GFP, welches nicht in der Lage ist, Fortsätze zu induzieren.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Western Blots zeigen somit, dass die Expressionsrate der Konstrukte, die keine Fortsatz-induzierende Aktivität aufweisen, ebenso hoch ist wie die der Konstrukte mit Fortsatz-induzierender Aktivität. Die etwas geringere Expression der Konstrukte TMFD8 N544D-GFP und TMFD8 C470G-GFP hat keinen Einfluss auf ihre Fähigkeit, filopodienartige Fortsätze zu induzieren.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass der Verlust der Fortsatzbildung ursächlich auf die Mutationen zurückzuführen ist und nicht auf einer geringeren Proteinsyntheserate, einer erhöhten proteolytische Abbaurate oder auf eine fehlende Expression der Proteine auf der Zelloberfläche beruht.



**Abb. 15: Gleiche Expressionsrate nach Austausch der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne.** SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot von transfizierten HEK 293T-Zelllysaten. Die TMFD8-GFP-Mutationskonstrukte zeigten im Western Blot nach Detektion mit GFP-Antiserum Doppelbanden im Bereich von 110-135 kDa, TMFD6-GFP eine Einzelbande bei etwa 105 kDa. Aktin (Bande bei 43 kDa) wurde zur Quantifizierung codetektiert. Die Expression wurde densitometrisch quantifiziert und auf die Kontrolle bezogen (heller Balken). Alle Konstrukte wurden gleichmäßig exprimiert. Fehlerbalken entspricht +/- SEM mit n = 3.

## 5 Diskussion

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war es, den Bereich von Agrin zu identifizieren und zu charakterisieren, der für die Bildung der filopodienartigen Fortsätze verantwortlich ist. Mit Hilfe verschiedener Deletions- und Mutationskonstrukte wurde gezeigt, dass der Bereich zwischen den Cysteinen C535 und C567 der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne von Agrin wichtig für die Bildung filopodienartiger Ausläufer ist. Aufgrund der großen Sequenzhomologie der verschiedenen Follistatin-ähnlichen Domänen Agrins hat ein Austausch dieser 7. Follistatin-Domäne mit einer anderen Agrin-Follistatin-Domäne keine Verminderung der Ausläuferanzahl zur Folge. Die Bildung der Ausläufer konnte mittels Überexpression sowohl in Neuronen als auch in nicht-neuronalen Zellen induziert werden.

### 5.1 TM-Agrin Mutationskonstrukte werden gleichmäßig exprimiert und in die Zellmembran integriert

Die unterschiedliche Induzierung von filopodienartigen Fortsätzen durch verschiedene Mutationen und Deletionen an TM-Agrin könnte dadurch erklärt werden, dass die verschiedenen Mutationskonstrukte unterschiedlich stark exprimiert oder unterschiedlich effizient in die Zellmembran eingebaut werden. Der Einbau in die Zellmembran ist essentiell für die Bildung der Fortsätze, da die sekretierte NtA-Isoform, die sich nur im N-terminalen Bereich und der damit verbundenen Membraneinbindung von TM-Agrin unterscheidet, nicht in der Lage ist, die filopodienartigen Fortsätze zu induzieren.

So genannte „Lebendfärbungen“, bei denen der Erstantikörper vor der Fixierung und Permeabilisierung der transfizierten 293HEK-Zellen zugegeben wird, zeigten, dass die untersuchten Konstrukte TMFD8-GFP und TMFD8 C535G-GFP beide in die Zellmembran integriert werden (Abb. 12). TMFD8-GFP ist in der Lage, Fortsätze zu induzieren, das Mutationskonstrukt TMFD8 C535G-GFP ist dazu jedoch nicht fähig. Die unterschiedliche fortsatzinduzierende Aktivität kann also nicht mit einer unterschiedlichen Effizienz beim Transport auf die Zelloberfläche erklärt werden.

Alle untersuchten TM-Agrin-Mutations- und Deletionskonstrukte wurden mit vergleichbarer Proteinsyntheserate nach Transfektion in 293HEK-Zellen exprimiert (Kap. 4.4). Einzige Ausnahmen bildeten die Mutationskonstrukte TMFD8 N544D-GFP und TMFD8 C470G-GFP, deren Expression um etwa 25 % verringert war. Das hatte aber keinerlei Einfluss auf ihre Fähigkeit, Fortsätze zu induzieren.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es keinen wesentlichen Unterschied in der Expressionsrate bzw. beim Einbau der Proteine in die Zellmembran zwischen Fortsatz-induzierenden und nicht-induzierenden Konstrukten gibt. Der Verlust der induzierenden Aktivität beruht ursächlich auf den Mutationen und nicht auf sekundären Effekten.

## 5.2 Die Funktion von TM-Agrin während der frühen ZNS-Entwicklung

Um die vorliegenden Ergebnisse besser diskutieren zu können, soll zunächst die Rolle von Agrin bei der ZNS-Entwicklung dargestellt werden.

Agrin kommt in Neuronen des ZNS überwiegend in der zellmembrangebundenen Isoform vor (TM-Agrin) (Burgess et al., 2000; Neumann et al., 2001), wohingegen die längere NtA-Form sekretiert wird und an der Basalmembran an Laminin (Denzer et al., 1995; Denzer et al., 1997) und Dystroglycan (Gesemann et al., 1996; Campanelli et al., 1996; Otoole et al., 1996) bindet. Im Gegensatz zu NtA-Agrin, dessen Funktion an der neuromuskulären Endplatte bereits gut charakterisiert wurde, ist die Rolle von TM-Agrin im Zentralnervensystem weitgehend ungeklärt.

Die Transmembran-Isoform von Agrin wird in Neuronen exprimiert und findet sich auf Axonen und Dendriten angereichert. Die maximale Expressionsrate von Agrin im ZNS während des axonalen Wachstums und der Bildung von Synapsen sowie seine anschließende Herunterregulierung, lässt auf eine Rolle von Agrin während des Neuritenwachstums und der Synaptogenese schließen (siehe Review Kröger und Schröder, 2002; Kröger und Pfister, 2009). Jedoch zeigt sich bei kultivierten hippocampalen und corticalen Neuronen aus Agrin<sup>-/-</sup>-Mäusen bei Neuritenwachstum und Synapsenstruktur kein Unterschied zum Wildtyp (Li et al., 1999; Serpinskaya et al., 1999). Eine Erklärung für diesen Befund sind mögliche kompensatorische Mechanismen während der frühen Neuronalentwicklung. Denn die akute Inhibierung der Agrin-Expression mittels Verwendung von antisense-Oligonukleotiden bzw. die Blockierung der Funktion von Agrin mittels Antikörperpräinkubation führt *in-vitro* zu einer Reduzierung der axonalen Verzweigungen sowie der Anzahl der gebildeten Synapsen. Die Länge der Axone bleibt davon jedoch unbeeinflusst (Ferreira, 1999; Bose et al., 2000). Die Zugabe von rekombinantem Agrin auf kultivierte hippocampale Neurone hingegen führt zu einem verminderten Axonwachstum, jedoch auch zu einer stärkeren Verzweigung. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung mit antisense-Oligonukleotiden zu längeren und unverzweigten Axonen (Mantych und Ferreira, 2001). Diese Befunde, sowie die Induktion

filopodienartiger Fortsätze durch Zugabe von anti-Agrin Antikörpern auf TM-Agrin exprimierende Neurone (Annie et al., 2006) oder - wie die in dieser Arbeit gezeigt - durch Überexpression nach Transfektion, führen zu dem Schluss, dass Agrin eine Funktion bei der neuronalen Entwicklung haben könnte.

Die hohe Expression von Agrin in der ventrikulären Zone während der frühen Cortex-Entwicklung deutet auf eine mögliche Rolle Agrins während der Zellproliferation und Migration hin (Stone und Nikolics, 1995; Cohen et al., 1997b). Eine Reihe von Wachstumsfaktoren finden sich ebenfalls in der ventrikulären Zone während dieser Entwicklungsphase, wie beispielsweise Activin und andere Vertreter der TGF- $\beta$ -Familie (Cameron et al., 1998). Die Regulation dieser Wachstumsfaktoren erfolgt mit Hilfe von Antagonisten, und der natürliche Antagonist von Activin ist Follistatin. Die Follistatin-ähnlichen Domänen am N-Terminus von Agrin könnten ein Hinweis darauf sein, dass Agrin eine Rolle bei der Regulation von Activin oder anderen TGF- $\beta$ -Wachstumsfaktoren spielt. Jedoch unterscheiden sich die Bereiche von Follistatin, die verantwortlich für die Bindung und Neutralisierung von Activin sind, stark von den Follistatin-ähnlichen-Domänen von Agrin, sodass eine Wechselwirkung zwischen Agrin und Activin unwahrscheinlich ist (Sidis et al., 2001).

### **5.3 Follistatin-Domänen**

Das sekretierte Protein Follistatin reguliert zell- und gewebespezifisch mehrere Signalübertragungswege mittels Inaktivierung von TGF- $\beta$ -Wachstumsfaktoren (de Winter et al., 1996; Phillips und de Kretser, 1998) und spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und Differenzierung (Tashiro et al., 1991; Hemmati-Brivanlou et al., 1994; Iemura et al., 1998). So weisen Follistatin-defiziente-Mäuse, die in der Regel wenige Stunden nach der Geburt aufgrund von Atmungsversagen sterben, multiple Skelett- und Hautabnormitäten auf (Matzuk et al., 1995).

Die Entdeckung Follistatins ging mit der Beobachtung einher, dass es der Sekretion des Follikel-Stimulierenden Hormons (FSH), die durch Activin induziert wird, entgegenwirkt (Esch et al., 1987; Robertson et al., 1987). Diese Hemmung beruht auf der hohen Bindungsaffinität von Follistatin an Activin (Nakamura et al., 1990) und die dadurch verhinderte Bindung von Activin an seinen Rezeptor (Thompson et al., 2005). Die Interaktion zwischen Follistatin und Activin wird durch Heparin potenziert (Sumitomo et al., 1995).

Alternatives Spleißen führt zu drei Follistatin-Isoformen (FS-288, FS-303 und FS-315), die sich in ihrer Bindungsfähigkeit bezüglich Heparins deutlich unterscheiden. Die kürzeste

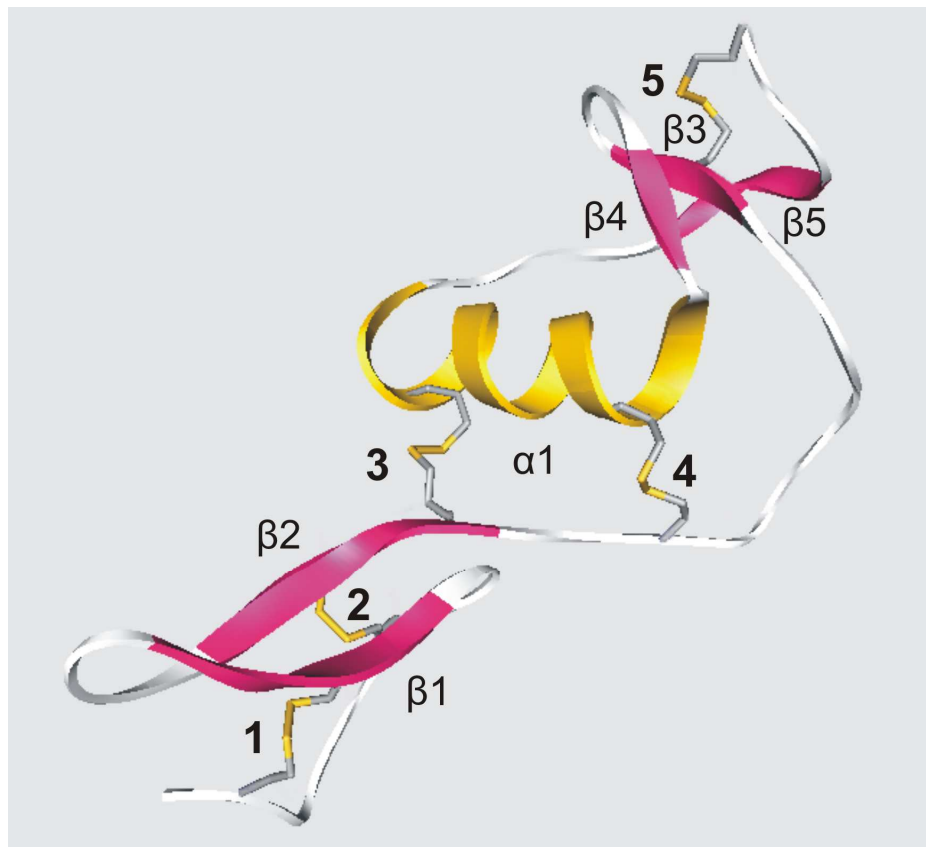
Isoform mit 288 Aminosäuren hat die höchste Affinität zu Heparin, die längste Isoform mit 315 Aminosäuren ist aufgrund eines sauren, Glutaminsäure-reichen C-Terminus nicht mehr in der Lage, Heparin zu binden (Sugino et al., 1993). Die Bindungsstelle für Heparin befindet sich in der stark basischen Region der EGF-ähnlichen Untereinheit (siehe [Abb. 17](#)) in der ersten von drei Follistatin-Domänen (Inouye et al., 1992; Innis und Hyvonen, 2003). Auch Agrin bindet an Heparin, jedoch ist hierbei die Bindungsstelle an der Laminin G2-Domäne und nicht an einer der Follistatin-Domänen lokalisiert.

Follistatin besteht aus 3 homologen Follistatin-Domänen von 73 bis 75 Aminosäuren Länge, denen ein 63 Aminosäuren großes N-terminales Segment vorgelagert ist, das keine bekannte Sequenzhomologie aufweist (Shimasaki et al., 1989). Dieses N-terminale Segment sowie die beiden ersten Follistatin-Domänen sind für die Bindung an Activin und die damit verbundene Inaktivierung notwendig (Sidis et al., 2001; Keutmann et al., 2004).

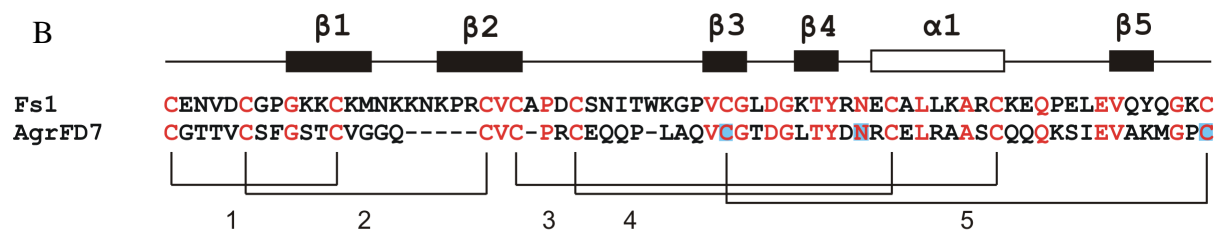
Kristallstrukturanalysen der Follistatin-Domäne von SPARC/BM-40 (Hohenester et al., 1997) und der ersten FS-Domäne von Follistatin selbst (Innis und Hyvonen, 2003) zeigen, dass die für Follistatin-Domänen charakteristischen 10 Cysteine ausschließlich innerhalb der Domäne Disulfidbrücken bilden und Follistatin-Domänen somit autonome Einheiten darstellen (siehe [Abb. 16](#)). Diese lassen sich aufgrund der Position der Disulfidbrücken (Verknüpfung der Cysteine 1-3, 2-4 sowie 5-9, 6-8, 7-10) grob in zwei separate strukturelle Untereinheiten einteilen, die kaum miteinander interagieren (Hohenester et al., 1997; Innis und Hyvonen, 2003). Die N-terminale Untereinheit ist durch eine stark verdrehte  $\beta$ -Haarnadel-Struktur charakterisiert ( $\beta 1$  und  $\beta 2$ ) und wird aufgrund ihrer Sequenzhomologie auch als EGF-ähnliche Untereinheit bezeichnet (Hohenester et al., 1997). Die C-terminale Untereinheit besteht aus einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha 1$ ), an die sich drei kurze, antiparallel ausgerichtete  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta 3$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 5$ ) anschließen ([Abb. 16](#)) (Hohenester et al., 1997; Innis und Hyvonen, 2003). Die Sequenz ähnelt Protease-Inhibitoren der Kazal-Familie und wird daher auch als Kazal-ähnliche Untereinheit bezeichnet (Hohenester et al., 1997).

Follistatin-Domänen wurden neben Agrin (Rupp et al., 1991) auch bei weiteren extrazellulären Matrixproteinen gefunden wie z.B. bei Osteonektin/ BM-40 (Murphy-Ullrich et al., 1995), den Komplement-Proteinen C6 und C7 (Ullman und Perkins, 1997) und Tomoregulin (Uchida et al., 1999). Sequenzvergleiche zeigen eine hohe, spezieübergreifende Homologie (siehe auch [Abb. 17](#)); die spezifischen Liganden dieser Follistatin-Domänen sind allerdings bisher nicht identifiziert worden. Aufgrund der unterschiedlichen Proteine, in denen Follistatin-Domänen vorkommen, sind weitere Funktionen und Bindungspartner für Follistatin-Domänen wahrscheinlich.

A



B



**Abb. 16:** Darstellung der Follistatin-Domäne 1 (Fs1) aus Follistatin (Huhn) und seiner sekundären Strukturelemente (aus (Innis und Hyvonen, 2003) modifiziert). Die Disulfidbrücken (gelb) sind nummeriert. Alle Disulfidbrücken sowie die wesentlichen Strukturelemente sind auch in den Follistatin-Domänen von TM-Agrin (Huhn) vorhanden.

## 5.4 Die siebte Follistatin-Domäne von TM-Agrin ist für die Bildung der Fortsätze verantwortlich

Die Identifikation der membranständigen Isoform von Agrin führte zu der Hypothese, dass es sich bei TM-Agrin um einen Rezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften handeln könnte. Rezeptoren mit einer einzelnen Transmembrandomäne, wie sie auch bei TM-Agrin vorkommt, können in der Regel durch einen Liganden multimerisiert und dadurch aktiviert werden (Heldin, 1995; Weiss und Schlessinger, 1998). Der physiologische Ligand von TM-Agrin ist bis dato noch unbekannt, jedoch kann die Multimerisierung auch durch Kreuzvernetzung mittels polyklonaler Antikörper erfolgen (Annie et al., 2006). Des Weiteren kann es durch Überexpression nach einer Transfektion zur Automultimerisierung von TM-Agrin kommen. Beide Wege führen über eine Signalkaskade zur Reorganisation des Zytoskeletts und zur Ausbildung filopodienartiger Fortsätze (Ramseger et al., 2009). Die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade ist konsistent mit einer Rezeptorfunktion von TM-Agrin.

Ziel dieser Arbeit war es, den Bereich von Agrin zu identifizieren, der für die Induzierung der filopodienartigen Fortsätze verantwortlich ist. Von den beiden Isoformen, NtA-Agrin und TM-Agrin, ist trotz ihrer großen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz nur die letztgenannte in der Lage, diese Fortsätze zu induzieren. Für die Bildung der Fortsätze ist die Verankerung von Agrin in der Membran somit unbedingt erforderlich, was für die Theorie der Signalübertragung durch einen Rezeptor TM-Agrin spricht.

Die Verankerung erfolgt durch eine einzelne, 23 Aminosäuren lange  $\alpha$ -helikale Transmembran-Domäne. Transfektionsexperimente mit TM-Agrin-Deletions- und Mutationskonstrukten zeigten, dass die 34 Aminosäuren große intrazelluläre Domäne von TM-Agrin für die Induzierung der Fortsätze entbehrlich ist (Ramseger, 2004; McCroskery et al., 2006). Ebenso kann die G3-Domäne am C-Terminus, die für die synaptogene Wirkung von NtA-Agrin an der neuromuskulären Endplatte verantwortlich ist (Gesemann et al., 1995), ohne Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität deletiert werden.

Weitere Deletionen am etwa 1900 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Teil von TM-Agrin zeigten, dass die 7. Follistatin-Domäne entscheidend für die Fortsatzbildung ist, insbesondere der Bereich zwischen den beiden Cysteinen C535 und C567, die die letzte Disulfidbrücke der 7. Follistatin-Domäne bilden. Mutationen an diesen beiden Positionen (Mutationskonstrukte TMFD8 C535G-GFP und TMFD8 C567G-GFP, Abb. 9) führen zu einem vollständigen Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität von TM-Agrin. Die Disulfidbrücke verbindet die 3.  $\beta$ -Faltblattstruktur mit dem C-Terminus der Domäne. Sie umschließt eine Domänen-Schleife, die noch zwei weitere  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta$ 4 und  $\beta$ 5)

sowie eine  $\alpha$ -Helix beinhaltet (Abb. 16). Eine Unterbrechung dieser Disulfidbrücke führt zu einer starken Veränderung der räumlichen Struktur innerhalb der Follistatin-Domäne, sodass wahrscheinlich die Di- bzw. Multimerisierung oder die Bindung eines Liganden an TM-Agrin verhindert wird.

Zur genaueren Lokalisierung wurden in unserer Arbeitsgruppe weitere Aminosäuren im Bereich der 5. Disulfidbrückenbindung innerhalb der 7. Follistatin-Domäne mutiert. Jedoch hatte weder die Mutation der Cysteine an Position 553 bzw. 546 zu Alanin, oder Prolin 530 zu Alanin noch die Doppelmutation der Glutamin-Seitenketten 555 und 556 zu Glutaminsäure eine Reduzierung der Fortsatzbildung zur Folge (Seliger, 2008; Porten et al., 2010). Dies spricht für eine hohe strukturelle Stabilität der Follistatin-Domäne. Im Gegensatz dazu führte die Mutation von Aspartat 538 zu Glycin in einem Loop-Bereich zwischen der 3. und 4.  $\beta$ -Faltblattstruktur (Abb. 16) zu einem vollständigen Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität. Die Unterbrechung des Loops durch Mutation des benachbarten Glycins 539 zu Prolin, führte ebenfalls zu einer Reduktion der Fortsatzbildung (Seliger, 2008; Porten et al., 2010). Somit ist die Integrität der Kazal-ähnlichen Untereinheit der 7. Follistatin-Domäne, insbesondere der Loop-Bereich zwischen der 3. und 4.  $\beta$ -Faltblattstruktur, für die Induzierung der filopodienartigen Fortsätze verantwortlich.

AgrFD7 (503)	CG-----TTVCSFGSTCVGG-----QCV	CPR---CEQ--QPLAQVCGTDGLTYDNRCELRAASCQQQKS-----IEVAKMGPC	(567)
AgrFD1 (72)	CR-----GMLCGFGAVCERSPTDPS---QASCV	CKKTA-CP--VVVAVPVCSDYSTYSNECELEKAQCNNQRR-----IKVISKGPC	(144)
AgrFD6 (438)	CG-----KCQFGAICEAETG-----RCV	CP-TE-CV--PSSQPVCGTDGNTYGSCELEHVRACQQKN-----ILVAAQGDG	(502)
AgrFD8 (570)	CGSGGSGSGDGSECEQDR-CRHYGGWDEDAEDDRCV	CDFT--CLA--VPRS P VCGSDDVITYANECELKKTREKQRN-----LYVTSQGAC	(652)
Fs1 (94)	CEN-----VDCGPGKCKMKNKKNP-----RCV	CAPD--CSNI-TWKG P VCGLDGKTYRNECALLKARCKE QPE-----LEVQYQGKC	(163)
Fs2 (167)	CR-----DVLCPGSSSTCVVDQTNN-----AYCVI	CNRI--CPEPTSPEQYLCGNDGITYASACHLRKATCLLGRS-----IGLAYEGKC	(238)
Fs3 (238)	CED-----IQCSAGKCLWDFKVGR-----GRCAI	CDEL--CPES-KSDEAVCASDNTTYPSECAMKEAACSMGVL-----LEVKHS GSC	(315)
BM-40 (67)	CQN-----HHCKHGVKVEVDDNNSP-----MCV	CQDPSSCPAHSGVFEKVCCTDNKTYDSSCHFFATKCTLEGTKKGHLHLDYIGPC	(144)

EGF-ähnliche Untereinheit

Kazal-ähnliche Untereinheit

**Abb. 17:** Vergleich der Proteinsequenz der Follistatin-Domänen 1, 6, 7 und 8 aus TM-Agrin, der Follistatin-Domänen 1 bis 3 aus Follistatin, sowie der Follistatin-ähnlichen Domäne aus BM-40 (alle aus Huhn). Identische Aminosäuren sind rot, konservierte Aminosäuren blau bzw. grün markiert. Alle Cysteine sind konserviert.

Bemerkenswert ist zudem die Tatsache, dass die Aminosäure Aspartat 538 hochkonserviert ist und bei allen Follistatin-ähnlichen Domänen von Agrin vorkommt (Abb. 17). Der Austausch der 7. Follistatin-Domäne zeigt, dass die Induzierung der Fortsätze auch durch andere Follistatin-Domänen Agrins hervorgerufen werden kann (Abb. 11).

Die Follistatin-Domänen 1, 6, 7 und 8 der insgesamt neun Follistatin-Domänen von TM-Agrin zeigen neben Aspartat 538 insgesamt eine hohe Sequenzhomologie, insbesondere in der Kazal-ähnlichen Untereinheit der Domäne (Abb. 17). Die N-terminale EGF-ähnliche

Untereinheit weist hingegen eine deutlich geringere Sequenzhomologie auf, insbesondere bei der 8. Follistatin-ähnliche Domäne. Hier befindet sich ein Serin-Glycin-Cluster, der eine Bindungsstelle für Glycosaminoglycan-Seitenketten darstellt (Winzen et al., 2003). Der sterische Einfluss dieser Heparansulfat-Seitenketten, deren Länge bis zu 40 nm betragen kann (Denzer et al., 1998) oder die negative Ladung durch die Sulfatierung der Glucosaminreste könnte der Grund dafür sein, dass bei dem Konstrukt TMFD6+FD8-GFP die Bildung filopodienartiger Fortsätze stark vermindert ist (Abb. 11).

Da die Deletion der 1. und 2. Follistatin-Domäne einen vollständigen Verlust der Fortsatz-induzierenden Aktivität zur Folge hat, scheint ein bestimmter Abstand des induzierenden Bereichs der 7. Follistatin-Domäne zur Zellmembran wichtig zu sein. Dieser Abstand wird durch das repetitive Vorkommen der Follistatin-Domänen reguliert. Die Kristallstrukturanalyse des Follistatin-Domänenpaares in BM-40 ergibt eine Länge von etwa 7 nm, also ca. 3,5 nm pro Follistatin-Domäne (Hohenester et al., 1997). Durch Rotationsbedampfung zeigt sich die langgestreckte kettenartige Struktur der Follistatin-Domänen in Agrin (Denzer et al., 1998). Dies lässt auf einen Abstand des Fortsatz-induzierenden Bereichs der 7. Follistatin-Domäne zur Zellmembran von etwa 24 nm bei gerader und nicht geknickter Struktur der Follistatin-Domänenkette schließen. Beim Konstrukt TMFD2-8-GFP ist dieser Abstand zur Zellmembran nach Deletion der 1. Follistatin-Domäne auf ca. 21 nm verkürzt, jedoch werden nach wie vor Fortsätze induziert. Eine weitere Verkürzung der Follistatin-Domänenkette auf etwa 17 nm (Konstrukt TMFD3-8-GFP) führt jedoch zum fast vollständigen Verlust der fortsatzinduzierenden Aktivität (Abb. 11). Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein sterischer Einfluss auf einen potentiellen Liganden durch die Annäherung der Bindungsstelle innerhalb der 7. Follistatin-Domäne an die Zellmembran, sodass die Fortsätze nicht mehr induziert werden können.

## 5.5 Die Induktion filopodienartiger Fortsätze durch TM-Agrin erfolgt über eine Signalkaskade

Die Entdeckung der Transmembran-Isoform des Proteoglycans Agrin führte zu der Hypothese, dass TM-Agrin ein Rezeptor oder Co-Rezeptor mit signaltransduzierenden Eigenschaften sein könnte. Die Beobachtung, dass die Bildung der filopodienartigen Fortsätze mittels Antikörper-Induktion die Folge einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts darstellt, unterstützt diese Hypothese (Annie et al., 2006).

Wie könnte diese Signalkaskade genau ablaufen? Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten als einen der ersten Schritte nach der Aktivierung durch Zugabe polyklonaler Antikörper die Relokalisation von TM-Agrin in glykosphingolipid- und cholesterolreiche Mikrodomänen der Plasmamembran, sogenannte „lipid rafts“ (Ramseger et al., 2009). Lipid rafts sind weitverbreitet und wurden, neben vielen anderen Zelltypen, auch in hippocampalen und cortikalen Neuronen detektiert (Hering et al., 2003; Butchbach et al., 2004; Ko et al., 2005). Diese Verschiebung innerhalb der Zellmembran ist ein weitverbreiteter Initiations-schritt bei vielen Signaltransduktionswegen (Simons und Toomre, 2000).

In den lipid rafts finden sich auch einige Proteine, die bei Signalkaskaden eine wichtige Rolle spielen, wie beispielsweise GPI-verankerte Proteine - Proteine, die über einen an Glykosylphosphatidylinositol gekoppelten Lipidrest in der Plasmamembran verankert sind - (Hooper, 1999; Tansey et al., 2000) sowie Kinasen der Src-Familie (Resh, 1998). Ein Mitglied dieser Src-Kinasen, nämlich Fyn, wurde als weiteres Glied in der Signalkette identifiziert. Die Zugabe von polyklonalen Antikörpern und die damit verbundenen Aggregation von TM-Agrin sowie die Relokalisation in lipid rafts führen zur Phosphorylierung von Fyn. Ein weiteres Protein, die 44/42 MAP-Kinase, wird hierbei ebenfalls phosphoryliert. Die chemische Inhibierung der Phosphorylierung dieser beiden Proteine resultiert in einer signifikanten Abnahme der durch TM-Agrin induzierten filopodienartigen Ausläufer. Die Hemmung von Fyn zeigt auch, dass phosphoryliertes Fyn notwendig für die Aktivierung von 44/42 MAPK ist, diese also wohl direkt oder indirekt von Fyn downstream in der Signalkaskade phosphoryliert wird (Ramseger et al., 2009).

Die Tatsache, dass die intrazelluläre Domäne von TM-Agrin keinen Einfluss auf die Bildung filopodienartiger Ausläufer hat (Ramseger, 2004; McCroskery et al., 2006), führt zu dem Schluss, dass TM-Agrin nicht als direkter Rezeptor bei der Phosphorylierung von Fyn fungiert, sondern vielmehr als Co-Rezeptor, der mit dem eigentlichen Rezeptorprotein interagiert. Ein Beispiel für Heparansulfat-Proteoglycane mit Corezeptorfunktion sind die Syndecane. Zusammen mit Mitgliedern der Integrin-Proteinfamilie bilden sie adhäsive

Rezeptor-Signalkomplexe, die unter anderem bei der Anordnung des Zytoskeletts und der Zellmorphologie eine wichtige Rolle spielen (Couchman et al., 2001; Woods und Couchman, 2001; Thodeti et al., 2003). So reguliert Syndecan 1 in Brustkarzinomzellen die Aktivität von  $\alpha_v\beta_3$  Integrin, was für die Ausbreitung der Tumorzellen von großer Bedeutung ist (McQuade und Rapraeger, 2003; Beauvais und Rapraeger, 2003; Beauvais et al., 2004). Ähnliche Mechanismen finden sich für die Signalübertragung von Syndecan 1 mit  $\alpha_v\beta_5$  Integrin in Mäuse-Fibroblasten. Es wurde nachgewiesen, dass für eine Signalübertragung, analog zu TM-Agrin, der extrazelluläre Teil von Syndecan 1 essentiell, die intrazelluläre Domäne jedoch nicht notwendig ist (McQuade et al., 2006). Analog zu den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an TM-Agrin (Annie et al., 2006) wurde die Signalkaskade durch Syndecan 1-spezifische Antikörper induziert, was ebenfalls zu einem Umbau des Zytoskeletts und zur Ausbildung von filopodienartigen Ausläufern führt (Beauvais und Rapraeger, 2003; Beauvais et al., 2004; McQuade et al., 2006).

Das Rezeptor-Protein, das für die TM-Agrin-Signalübertragung und die dadurch induzierten filopodienartigen Ausläufer notwendig ist, könnte CAR (Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor) sein. In der Arbeitsgruppe von F.G. Rathjen konnte in Coimmunopräzipitationsstudien gezeigt werden, dass TM-Agrin an CAR bindet (unveröffentlichte Beobachtung). CAR ist ein Typ I Transmembranrezeptor und zählt zur Immunoglobulin-Superfamilie (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1997). Während der Embryonalentwicklung wird CAR im ZNS in hohem Maße exprimiert (Tomko et al., 2000; Honda et al., 2000; Hotta et al., 2003), und es wird postuliert, dass CAR als Adhäsionsmolekül an der Quervernetzung von Neuronen beteiligt ist (Honda et al., 2000). Neuere Studien zeigen eine direkte Interaktion der intrazellulären Domäne von CAR mit Tubulin (Fok et al., 2007) und auch Aktin (Huang et al., 2007), was im Zusammenhang mit den Auswirkungen der TM-Agrin-Induktion auf das Zytoskelett besonders interessant ist und auf eine mögliche Funktion von CAR bei Neuritenwachstum und Zellmigration hindeutet.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass CAR wie TM-Agrin ebenfalls in lipid rafts von ausläuferbildenden RGC oder 293HEK zu finden ist (Ramseger, 2007). Weiterhin sind beide Proteine auf den Ausläufern sowie auf dem Axonschaft von retinalen Ganglienzellen kolokalisiert. Die Überexpression von CAR in neuronalen sowie nicht-neuronalen Zellen wie 293HEK führt zur Bildung zahlreicher, aktinhaltiger Ausläufer, ähnlich viele wie bei der TM-Agrin-Überexpression. Der deutlichste Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen CAR und der durch TM-Agrin induzierten Fortsätze ist die konzentrationsabhängige Hemmung dieser Ausläufer durch spezifische anti-CAR Fab-Fragmente

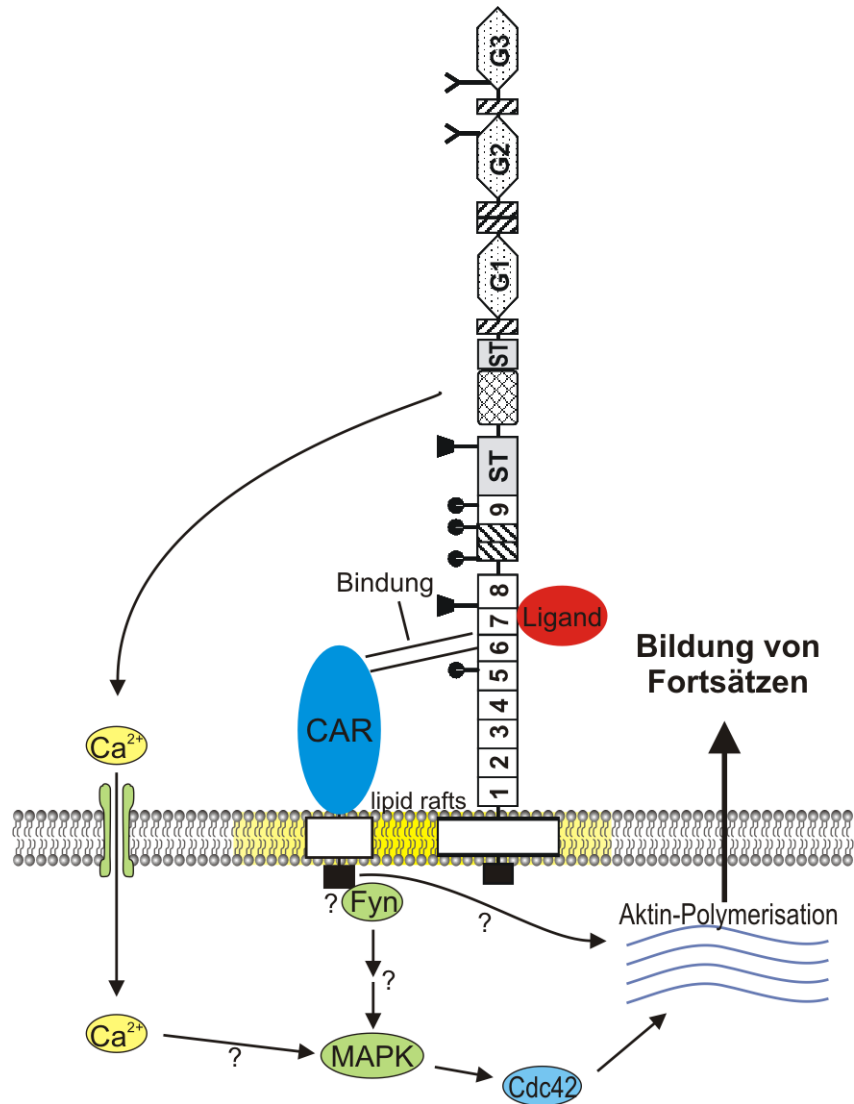
(Ramseger, 2007). Weitere Untersuchungen über die genaue Interaktion von CAR mit TM-Agrin sind jedoch notwendig, beispielsweise inwiefern die 7. Follistatin-Domäne an der Interaktion beteiligt ist.

Calcium spielt ebenfalls eine Rolle bei der Ausläuferbildung und Signalübertragung. Calcium ist, neben vielen anderen Funktionen, auch notwendig für die Bildung, das Wachstum und die Stabilität von dendritischen Dornen und Filopodien (Engert und Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999). Lokal erhöhte Calciumkonzentrationen beeinflussen die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und somit die Bildung von Filopodien und dendritischen Dornen (Fischer et al., 1998; Richards et al., 2004). Die Bildung der durch TM-Agrin induzierten filopodienartigen Ausläufer ist ebenfalls calciumabhängig, da Zugabe von BAPTA-AM, einem Calcium-Chelator, die Ausläuferbildung konzentrationsabhängig hemmt (Annies et al., 2006).

Ein mögliches Zielmolekül für Calcium könnte in diesem Zusammenhang die bereits erwähnte 44/42 MAP-Kinase sein, da Calcium auf den MAP-Kinase-Weg einwirkt (Konur und Ghosh, 2005). So konnte gezeigt werden, dass Zugabe von NtA-Agrin in cortikalen Neuronen zu einem Anstieg von Calcium führt, das überwiegend aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Dies führt zur Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMKII) sowie MAP-Kinase und letztlich zur Expression des Transkriptionsfaktors *c-fos* (Hilgenberg et al., 1999; Hilgenberg und Smith, 2004). Auch wenn in diesem Versuch NtA-Agrin und nicht TM-Agrin verwendet wurde, so ist die Aktivierung von 44/42 MAP-Kinase durch Calcium nicht auszuschließen.

Die Rho GTPase Cdc42 könnte die mögliche Verbindung zwischen der MAP-Kinase und der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts darstellen. MAP-Kinasen interagieren mit Cdc42 (Szczur et al., 2006), und Cdc42 ist wichtig für die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Kaverina et al., 2002; Meyer und Feldman, 2002). Ferner wurde die Phosphorylierung von Cdc42 mittels TM-Agrin-Überexpression nachgewiesen (McCroskery et al., 2006), was für eine Funktion dieses Proteins innerhalb der Signalkaskade und bei der Bildung filopodienartiger Ausläufer spricht ([Abb. 18](#)).

Die Theorie der Induktion der Fortsätze über eine Signalkaskade wird durch all diese Ergebnisse unterstützt. Weitere Untersuchungen, insbesondere über die genaue Interaktion von CAR mit TM-Agrin sowie die Identifizierung des potentiellen Liganden, sind jedoch notwendig.



**Abb. 18: Schematische Modell-Darstellung der durch TM-Agrin induzierten Bildung von Fortsätzen.** Die Multimerisierung einzelner TM-Agrin Moleküle durch polyklonale Antikörper bzw. durch Bindung des physiologischen Liganden im Bereich der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne, führt innerhalb von lipid rafts zur Bindung TM-Agrins an den Transmembranrezeptor CAR und veranlasst den Einstrom von Calcium in das Cytosol. Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration beeinflusst vermutlich die Aktivität der MAP-Kinase (MAPK). TM-Agrin gebundenes CAR könnte an Fyn binden bzw. aktivieren, was über Zwischenschritte zur Aktivierung von MAPK führt. Die durch Calcium und Fyn aktivierte MAPK interagiert mit der GTPase Cdc42, die die Polymerisation von Aktin-Filamenten beeinflusst und somit letztlich zur Bildung der Fortsätze führt. Eine weitere Möglichkeit ist die direkte Interaktion von Fyn mit Aktin-Filamenten. Die mit Fragezeichen versehenen Zwischenschritte sind Hypothesen und bedürfen noch weiterer detaillierter Untersuchungen.

## 5.6 Physiologische Bedeutung der Fortsätze

Die Bildung der filopodienartigen Fortsätze beruht auf einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Sowohl in ZNS- als auch in PNS-Axonon und Dendriten tritt der durch polyklonale Agrin-Antikörper induzierte Effekt auf (Annies et al., 2006). Die Überexpression durch Transfektion von TM-Agrin cDNA in ZNS-Neuronen führt ebenfalls zur Bildung zahlreicher Ausläufer auf Dendriten und Axonen, wohingegen die Unterdrückung der TM-Agrin Expression mittels RNAi deren Anzahl deutlich reduziert (McCroskery et al., 2006). Weitere Experimente, unter anderem in der vorliegenden Arbeit, konnten zeigen, dass dieser Effekt ebenfalls in anderen, nicht-neuronalen Zellen wie 293HEK (humane, embryonale Nierenzelllinie), COS-7 (Affennierenzellen), PC-12 (Tumorzelllinie aus der Nebenniere der Ratte), CHO-Zellen (chinesische Hamsteroovarienzellen) und primären Myoblasten (Huhn) auftritt (Annies et al., 2006; Ramseger, 2007). Die Überexpression in der humanen Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y führt ebenfalls zur Bildung von Ausläufern (McCroskery et al., 2006).

Der Mechanismus der durch TM-Agrin induzierten Fortsatzbildung scheint also ubiquitär in allen Gewebetypen und evolutionär zwischen verschiedenen Spezies konserviert zu sein. Die Tatsache, dass die weitverbreiteten Lipid rafts bei der Fortsatzbildung eine wichtige Rolle spielen (Ramseger et al., 2009), ist womöglich der Grund, dass die durch TM-Agrin induzierten Fortsätze in vielen unterschiedlichen Zelltypen verschiedener Spezies auftreten. Lipid rafts könnten auch bei der Entstehung filopodienartiger Fortsätze beteiligt sein, die durch die Überexpression anderer Proteine hervorgerufen werden, wie z. B. das Transmembran-Proteoglykan Syndecan (Yoneda und Couchman, 2003), Tenascin-R (Zacharias et al., 2002) oder Thrombospondin (Adams und Schwartz, 2000).

Allerdings unterscheiden sich die Ausläufer neuronaler und nicht-neuronaler Zellen. So konnte auf Axonen retinaler Ganglienzellen mittels Zeitraffer-Videoaufnahmen gezeigt werden, dass nach Zugabe polyklonaler Antikörper gegen TM-Agrin und der dadurch bedingten Quervernetzung des Transmembranproteins nach wenigen Minuten hochdynamische Ausläufer entstanden. Diese bildeten jedoch im Gegensatz zu den nicht-neuronalen Zellen einen Wachstumskegel aus und kollabierten nach wenigen Minuten wieder (Annies et al., 2006). In nicht-neuronalen Zellen wurden die Ausläufer immer länger und überwucherten mit der Zeit das gesamte Substrat, auf dem sie kultiviert wurden. Dieser Unterschied lässt sich durch die stark unterschiedliche Ausstattung an Zytoskelettproteinen in Nervenzellen während der Wachstumsphase und stationären Zelllinien erklären, in denen außer Zellteilung kaum noch dynamische Prozesse ablaufen. Eine Gemeinsamkeit aller unter-

suchten Zelltypen, ob neuronal oder nicht-neuronal, war das Zytoskelettprotein Aktin, das bis in die Spitzen aller Fortsätze nachweisbar war.

Die entscheidende Frage ist, welche physiologische Funktion die filopodienartigen Ausläufer *in vivo* haben könnten?

Filopodien sind Aktinfilamente enthaltende, hochdynamische Zellausläufer und wurden in vielen unterschiedlichen Zelltypen wie z. B. Fibroblasten, Keratinozyten und auch Neuronen nachgewiesen (Wood und Martin, 2002; Mattila und Lappalainen, 2008). Sie spielen eine wichtige Rolle bei Zellmigration und –adhäsion, und kommen in Neuronen sowohl in Wachstumskegeln von Axonen als auch in dendritischen Dornfortsätzen vor (Jontes und Smith, 2000; Chang und De Camilli, 2001). Im Wachstumskegel sind Filopodien mitverantwortlich für die Ausrichtung des Axons hin zur Zielregion, indem sie in ihrer Umgebung als Sensoren für Gradienten sogenannter Leitsignalstoffe („guidance cues“) dienen (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Luo, 2002; Dent und Gertler, 2003).

In Axonen spielen Filopodien eine wichtige Rolle bei der Bildung neuer axonaler Verzweigungen und dienen als Vorläufer von Präsynapsen (Nikonenko et al., 2003; Dent et al., 2004). Axone hippocampaler Ratten-Neurone, die auf transfizierten und deshalb Agrin sekretierenden Astrozyten kultiviert werden, bildeten zudem in einer Studie einen größeren Wachstumskegel aus. Hierbei war jedoch die C-terminale Hälfte des extrazellulären Teils von Agrin für den Effekt verantwortlich (Bergstrom et al., 2007). Somit liegt dieser Beobachtung wohl ein anderer Mechanismus zu Grunde als bei den durch TM-Agrin induzierten filopodienartigen Ausläufern.

Auf Dendriten sind filopodienartige Ausläufer ein Ausgangspunkt für die Bildung von Dornensynapsen (Fiala et al., 1998; Engert und Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; siehe Review Sekino et al., 2007). Filopodien aus Dendriten reifen zu Dornensynapsen heran, wenn sie auf eine präsynaptische Verdickung eines Axons treffen (Ziv und Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Knott und Holtmaat, 2008), ansonsten bilden sie sich wieder zurück (Lohmann und Bonhoeffer, 2008). Die dendritischen Filopodien und die durch TM-Agrin induzierten filopodienartigen Ausläufer haben einige Gemeinsamkeiten, wie z. B. die Länge und ein vergleichbarer zeitlicher Ablauf bei Bildung und Rückzug der Ausläufer (Ziv und Smith, 1996; Dailey und Smith, 1996; Fiala et al., 1998; Annies et al., 2006; Knott et al., 2006). Beide Ausläuferarten bestehen zudem überwiegend aus Aktin-Filamenten (Fiala et al., 1998; Annies et al., 2006) Diese Beobachtungen führen zu der Überlegung, dass TM-Agrin bei der Entstehung der Dornensynapsen im ZNS beteiligt ist, indem es die Bildung filopodienartiger Ausläufer auf Dendriten initiiert.

Für diese Hypothese sprechen mehrere Untersuchungen: In kultivierten hippocampalen Neuronen zeigte sich nach Behandlung mit Agrin-antisense-Oligonukleotiden eine Reduktion in der Anzahl der Synapsen (Bose et al., 2000). Bei cervikalen Ganglienzellen im PNS von Agrin-null-Mäusen (AGD<sup>-/-</sup>) ist die Anzahl interneuroner Synapsen sowie die Transmission im Verhältnis zum Wildtyp um etwa 50 % vermindert (Gingras et al., 2007). Bei Agrin-defizienten Mäusen, die Agrin nicht im ZNS sondern ausschließlich nur in Motoneuronen exprimieren, wurde beobachtet, dass im Vergleich zum Wildtyp die Anzahl der glutamatergen Dornensynapsen im ZNS bei gleich bleibender Anzahl der Neuronen um etwa 30 % reduziert ist. Des Weiteren fand man im Cortex dieser Mäuse neben deutlich verkürzten Dendriten eine Reduktion der dendritischen Dornen, sowie eine Reduktion von MKK7, einem Bestandteil des MAP-Kinase-Signalweges (Ksiazek et al., 2007). Dieser Signalweg ist, wie bereits erwähnt, auch an der Signalübertragung der durch TM-Agrin induzierten Ausläufer beteiligt (Ramseger et al., 2009).

In einer aktuellen Studie (McCroskery et al., 2009) wurde nun der Zusammenhang zwischen Transmembran-Agrin, dendritischen Filopodien und Synaptogenese hergestellt. In kultivierten Hippocampus-Neuronen wurde TM-Agrin durch Lentivirus vermittelte RNA-Interferenz während der Phase der Synapsenbildung selektiv deletiert. Das führte sowohl zu einer deutlichen Reduzierung der dendritischen Filopodien als auch der Synapsen (McCroskery et al., 2009).

In ausgereiften Synapsen wurde gezeigt, dass Neurotrypsin, eine Serin-Protease, die in der aktiven Zone der Präsynapse sowie im synaptischen Spalt konzentriert vorkommt, in der Lage ist, TM-Agrin zu spalten (Stephan et al., 2008). Die Spaltung erfolgt an zwei konservierten Stellen, und zwar vor der Laminin G3-Domäne und zwischen der ersten Serin/Threoninreichen Region und der SEA-Domäne (siehe [Abb. 1](#)), was zu einem verkürzten, plasmamembrangebundenen TM-Agrin-Konstrukt und zwei löslichen Fragmenten von 22 bzw. 90 kDa führt (Reif et al., 2007). Die Ausschüttung von Neurotrypsin in den synaptischen Spalt erfordert präsynaptische Aktivität, wohingegen die Spaltung von Agrin zusätzlich von der postsynaptischen Aktivierung von NMDA-Rezeptoren abhängig ist (Frischknecht et al., 2008; Matsumoto-Miyai et al., 2009). Interessanterweise bilden Neurotrypsin-defizitäre Mäuse weniger LTP-assoziierte dendritische filopodienartige Fortsätze aus, was einen Zusammenhang zwischen der Spaltung von Agrin durch Neurotrypsin und der Bildung dendritischer Fortsätze zeigt (Matsumoto-Miyai et al., 2009). Das durch die Neurotrypsin abhängige Spaltung von Agrin generierte 22 kDa-Fragment ist jedoch in der Lage, diesen Rückgang der LTP-assoziierten dendritischen Fortsätze bei Neurotrypsin-defizitären Mäusen

wieder auszugleichen und auch ausgereifte hippocampale Wildtyp-Neurone bilden nach Zusatz des 22 kDa-Fragments mehr filopodienartige Fortsätze auf den Dendriten aus (Matsumoto-Miyai et al., 2009).

Somit führen sowohl die Überexpression von TM-Agrin als auch die Zugabe des löslichen 22 kDa-Fragments von Agrin zur Ausbildung filopodienartiger Fortsätze. TM-Agrin und Neurotrypsin könnten also bei der Induzierung der Fortsätze und der Entstehung inter-neuronaler Synapsen synergistisch zusammenwirken. Denkbar ist aber auch eine direkte Interaktion, indem die proteolytische Spaltung TM-Agrins durch Neurotrypsin zur Dimerisierung TM-Agrins und zur Auslösung der Signalkaskade nach Relokalisation in Lipid rafts führt. Oder TM-Agrin ist der Rezeptor oder Co-Rezeptor für das durch Neurotrypsin abgespaltene 22 kDa-Agrin-Fragment.

Inwiefern weitere mit Agrin interagierende und im ZNS exprimierte Faktoren wie die Tyrosinkinase MuSK (Ksiazek et al., 2007), der Agrin-Rezeptor LRP4 (Kim et al., 2008; Zhang et al., 2008) oder Na/K-ATPase (Hilgenberg et al., 2006) bei der Induzierung der filopodienartigen Fortsätze eine Rolle spielen, muss noch experimentell untersucht werden. Die in dieser Doktorarbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen jedenfalls, dass die 7. Follistatin-ähnliche Domäne von Transmembran-Agrin entscheidend an der Bildung der filopodienartigen Fortsätze beteiligt ist.

## 6 Zusammenfassung

Überexpression des Heparansulfat-Proteoglycans Agrin oder alternativ die Aggregation von TM-Agrin mittels polyklonaler Antikörper führt in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen zur Bildung filopodienartiger Fortsätze. Eine intrazelluläre Signalkaskade, die durch die Konzentration von TM-Agrin und Interaktion mit CAR in lipid rafts ausgelöst wird, und eine Aktivierung von Fyn und der MAP-Kinase benötigt, sorgt für eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und damit für die Bildung der hochdynamischen Fortsätze. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Region von TM-Agrin zu charakterisieren, die für diesen Effekt und die Initiierung der Signalkaskade verantwortlich ist.

Mit Hilfe verschiedener Deletions- und Mutationskonstrukte konnte der Bereich zwischen den Cysteinen C535 und C567 der 7. Follistatin-ähnlichen Domäne von Agrin als essentiell für die Bildung der filopodienartigen Fortsätze identifiziert werden. Aufgrund der großen Sequenzhomologie der verschiedenen Follistatin-ähnlichen Domänen Agrins hatte ein Austausch dieser 7. Follistatin-Domäne mit einer anderen Agrin-Follistatin-Domäne keine Verminderung der Ausläuferanzahl zur Folge. Die Aktivität von TM-Agrin ist also in mehreren Follistatindomänen konserviert. Alle untersuchten Konstrukte wurden gleichermaßen exprimiert und in die Zellmembran integriert. Die Tatsache, dass die Ausläuferbildung sowohl in Zelllinien verschiedener Spezies als auch in primären tektalen Neuronen mittels Überexpression induziert werden kann zeigt, dass der Mechanismus der Fortsatzbildung konserviert ist.

Die Assoziation von TM-Agrin mit der Zellmembran ist für die Bildung der filopodienähnlichen Fortsätze unerlässlich; da die sekretierte Isoform NtA-Agrin nicht in der Lage, diese Ausläufer zu induzieren. Das lässt vermuten, dass ein definierter Abstand der Follistatindomäne zur Membran für die Fortsatzbildung wichtig ist. Übereinstimmend mit dieser Hypothese bewirkt die Deletion der juxtamembranen Follistatindomänen und somit eine Verkürzung des Abstandes der 7. Follistatindomäne zur Zellmembran den Verlust der Fortsatzinduzierenden Aktivität von TM-Agrin. Da die intrazelluläre Domäne von TM-Agrin für den Fortsatz-induzierenden Effekt entbehrlich ist, kommt TM-Agrin eher als Co-Rezeptor anstatt als direkter Rezeptor bei der Fortsatzbildung in Frage.

Die durch TM-Agrin induzierten filopodienartigen Fortsätze sind physiologisch relevant. In hippocampalen Neuronen sind sie wichtig für die synaptische Verknüpfung zwischen Dendriten und Axonen und stellen somit wohl eine Vorläuferform der Dornensynapsen dar.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AChR	Acetylcholinrezeptor
APS	Ammoniumperoxosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA-AM	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure-tetrakis-(acetoxymethyl)-ester
bp	Basenpaare
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CAR	<u>C</u> oxsackie- <u>A</u> denovirus <u>R</u> ezeptor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CREB	<u>c</u> AMP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement <u>b</u> inding <u>P</u> rotein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
Fab	Fragment a und b des Antikörpers (monovalent)
FCS	fetales Kälberserum ( <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor ( <u>f</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	Green fluorescent protein
HEK	human embryonic kidney
HRP	Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LRP4	Low density lipoprotein receptor related protein 4
LTP	<u>L</u> ong <u>t</u> erm <u>p</u> otentiation
M	Mol
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase ( <u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase)
MCS	<u>M</u> ultiple <u>C</u> loning <u>S</u> ite
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA)
MuSK	Muskel spezifische Kinase ( <u>M</u> uscle- <u>S</u> pecific- <u>K</u> inase)
NKA	Natrium Kalium ATPase
NMJ	neuromuskuläre Endplatte (neuromuscular junction)
NtA	aminoterminales Agrin

OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RGC	retinale Ganglienzellen (retinal ganglion cells)
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEA	Sea urchin sperm protein Enterokinase, Agrin
SOC	super optimal broth-Medium + Glucose
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin
TM	Transmembran
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

## 8 Literaturverzeichnis

- Adams, J. C., Schwartz, M. A., (2000). Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol.* 150, 807-822.
- Annie, M., Bittcher, G., Ramseger, R., Loschinger, J., Wöll, S., Porten, E., Abraham, C., Ruegg, M. A., Kröger, S., (2006). Clustering transmembrane-agrin induces filopodia-like processes on axons and dendrites. *Mol.Cell Neurosci.* 31, 515-524.
- Annie, M., Kröger, S., (2002). Isoform pattern and AChR aggregation activity of agrin expressed by embryonic chick retinal ganglion neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20, 525-535.
- Antolik, C., Catino, D. H., O'Neill, A. M., Resneck, W. G., Ursitti, J. A., Bloch, R. J., (2007). The actin binding domain of ACF7 binds directly to the tetratricopeptide repeat domains of rapsyn. *Neuroscience* 145, 56-65.
- Antolik, C., Catino, D. H., Resneck, W. G., Bloch, R. J., (2006). The tetratricopeptide repeat domains of rapsyn bind directly to cytoplasmic sequences of the muscle-specific kinase. *Neuroscience* 141, 87-100.
- Baerwald-De La Torre, K., Winzen, U., Halfter, W., Bixby, J. L., (2004). Glycosaminoglycan-dependent and -independent inhibition of neurite outgrowth by agrin. *Journal of Neurochemistry* 90, 50-61.
- Beauvais, D. M., Burbach, B. J., Rapraeger, A. C., (2004). The syndecan-1 ectodomain regulates  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J.Cell Biol.* 167, 171-181.
- Beauvais, D. M., Rapraeger, A. C., (2003). Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrins in human breast carcinoma cells. *Exp.Cell Res.* 286, 219-232.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., Finberg, R. W., (1997). Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.
- Bergstrom, R. A., Sinjoanu, R. C., Ferreira, A., (2007). Agrin induced morphological and structural changes in growth cones of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 149, 527-536.
- Bezakova, G., Helm, J. P., Francolini, M., Lomo, T., (2001). Effects of purified recombinant neural and muscle agrin on skeletal muscle fibers in vivo. *Journal of Cell Biology* 153, 1441-1452.
- Biroc, S. L., Payan, D. G., Fisher, J. M., (1993). Isoforms of agrin are widely expressed in the developing rat and may function as protease inhibitors. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 75, 119-129.

- 
- Bixby, J. L., Baerwald-De La Torre, K., Wang, C., Rathjen, F. G., Ruegg, M. A., (2002). A neuronal inhibitory domain in the N-terminal half of agrin. *Journal of Neurobiology* 50, 164-179.
- Bork, P., Patthy, L., (1995). The Sea Module - A New Extracellular Domain Associated with O-Glycosylation. *Protein Science* 4, 1421-1425.
- Bose, C. M., Qiu, D., Bergamaschi, A., Gravante, B., Bossi, M., Villa, A., Rupp, F., Malgaroli, A., (2000). Agrin controls synaptic differentiation in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 20, 9086-9095.
- 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.
- Burgess, R. W., Nguyen, Q. T., Son, Y. J., Lichtman, J. W., Sanes, J. R., (1999). Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: Their roles at the neuromuscular junction. *Neuron* 23, 33-44.
- Burgess, R. W., Skarnes, W. C., Sanes, J. R., (2000). Agrin isoforms with distinct amino termini: Differential expression, localization, and function. *Journal of Cell Biology* 151, 41-52.
- Butchbach, M. E., Tian, G., Guo, H., Lin, C. L., (2004). Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *J.Biol.Chem.* 279, 34388-34396.
- Cameron, H. A., Hazel, T. G., McKay, R. D., (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J.Neurobiol.* 36, 287-306.
- Campagna, J. A., Ruegg, M. A., Bixby, J. L., (1995). Agrin is a differentiation-inducing "stop signal" for motoneurons in vitro. *Neuron* 15, 1365-1374.
- Campanelli, J. T., Gayer, G. G., Scheller, R. H., (1996). Alternative RNA splicing that determines agrin activity regulates binding to heparin and alpha-dystroglycan. *Development* 122, 1663-1672.
- Chang, S., De Camilli, P., (2001). Glutamate regulates actin-based motility in axonal filopodia. *Nat.Neurosci.* 4, 787-793.
- Chen, C., Okayama, H., (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol.Cell Biol.* 7, 2745-2752.
- Cheusova, T., Khan, M. A., Enz, R., Hashemolhosseini, S., (2006). Identification of developmentally regulated expression of MuSK in astrocytes of the rodent retina. *J.Neurochem.* 99, 450-457.
- Cohen, I., Rimer, M., Lomo, T., McMahan, U. J., (1997a). Agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle fibers in vivo. *Molecular and Cellular Neuroscience* 9, 237-253.

- 
- Cohen, N. A., Kaufmann, W. E., Worley, P. F., Rupp, F., (1997b). Expression of agrin- in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 76, 581-596.
- Cornish, T., Chi, J., Johnson, S., Lu, Y., Campanelli, J. T., (1999). Globular domains of agrin are functional units that collaborate to induce acetylcholine receptor clustering. *Journal of Cell Science* 112, 1213-1223.
- Cotman, S. L., Halfter, W., Cole, G. J., (1999). Identification of extracellular matrix ligands for the heparan sulfate proteoglycan agrin. *Experimental Cell Research* 249, 54-64.
- Couchman, J. R., Chen, L., Woods, A., (2001). Syndecans and cell adhesion. *Int.Rev.Cytol.* 207, 113-150.
- Dailey, M. E., Smith, S. J., (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci.* 16, 2983-2994.
- de Winter, J. P., ten Dijke, P., de Vries, C. J., van Achterberg, T. A., Sugino, H., de Waele, P., Huylebroeck, D., Verschueren, K., van den Eijnden-van Raaij AJ, (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Mol.Cell Endocrinol.* 116, 105-114.
- 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.
- Dent, E. W., Barnes, A. M., Tang, F., Kalil, K., (2004). Netrin-1 and semaphorin 3A promote or inhibit cortical axon branching, respectively, by reorganization of the cytoskeleton. *J.Neurosci.* 24, 3002-3012.
- Dent, E. W., Gertler, F. B., (2003). Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40, 209-227.
- Denzer, A. J., Brandenberger, R., Gesemann, M., Chiquet, M., Ruegg, M. A., (1997). Agrin binds to the nerve-muscle basal lamina via laminin. *Journal of Cell Biology* 137, 671-683.
- 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. *Journal of Cell Biology* 131, 1547-1560.
- Denzer, A. J., Schulthess, T., Fauser, C., Schumacher, B., Kammerer, R. A., Engel, J., Ruegg, M. A., (1998). Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1. *Embo Journal* 17, 335-343.
- Engert, F., Bonhoeffer, T., (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Esch, F. S., Shimasaki, S., Mercado, M., Cooksey, K., Ling, N., Ying, S., Ueno, N., Guillemin, R., (1987). Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol.Endocrinol.* 1, 849-855.

- 
- Escher, G., Bechade, C., Levi, S., Triller, A., (1996). Axonal targeting of agrin in cultured rat dorsal horn neurons. *Journal of Cell Science* 109, 2959-2966.
- Falo, M. C., Reeves, T. M., Phillips, L. L., (2008). Agrin expression during synaptogenesis induced by traumatic brain injury. *J.Neurotrauma* 25, 769-783.
- Ferreira, A., (1999). Abnormal synapse formation in agrin-depleted hippocampal neurons. *Journal of Cell Science* 112, 4729-4738.
- 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.
- Fok, P. T., Huang, K. C., Holland, P. C., Nalbantoglu, J., (2007). The Coxsackie and adenovirus receptor binds microtubules and plays a role in cell migration. *J.Biol.Chem.* 282, 7512-7521.
- Frischknecht, R., Fejtova, A., Viesti, M., Stephan, A., Sonderegger, P., (2008). Activity-induced synaptic capture and exocytosis of the neuronal serine protease neurotrypsin. *J Neurosci.* 28, 1568-1579.
- 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.
- 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.
- Gesemann, M., Denzer, A. J., Ruegg, M. A., (1995). Acetylcholine Receptor-Aggregating Activity of Agrin Isoforms and Mapping of the Active-Site. *Journal of Cell Biology* 128, 625-636.
- Gingras, J., Ferns, M., (2001). Expression and localization of agrin during sympathetic synapse formation in vitro. *Journal of Neurobiology* 48, 228-242.
- Gingras, J., Rassadi, S., Cooper, E., Ferns, M., (2007). Synaptic transmission is impaired at neuronal autonomic synapses in agrin-null mice. *Dev.Neurobiol.* 67, 521-534.
- Giordano, S., Sherman, L., Lyman, W., Morrison, R., (1992). Multiple molecular weight forms of basic fibroblast growth factor are developmentally regulated in the central nervous system. *Dev.Biol.* 152, 293-303.
- 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.
- Gramolini, A. O., Burton, E. A., Tinsley, J. M., Ferns, M. J., Cartaud, A., Cartaud, J., Davies, K. E., Lunde, J. A., Jasmin, B. J., (1998). Muscle and neural isoforms of agrin

- 
- increase utrophin expression in cultured myotubes via a transcriptional regulatory mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 273, 736-743.
- Groffen, A. J. A., Buskens, C. A. F., van Kuppevelt, T. H., Veerkamp, J. H., Monnens, L. A. H., van den Heuvel, L. P. W. J., (1998). Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *European Journal of Biochemistry* 254, 123-128.
- 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. *Journal of Comparative Neurology* 383, 1-17.
- Heldin, C. H., (1995). Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-223.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G., Melton, D. A., (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77, 283-295.
- Herbst, R., Burden, S. J., (2000). The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *Embo Journal* 19, 67-77.
- Hering, H., Lin, C. C., Sheng, M., (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J.Neurosci.* 23, 3262-3271.
- Hilgenberg, L. G., Su, H., Gu, H., O'Dowd, D. K., Smith, M. A., (2006). Alpha3Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase is a neuronal receptor for agrin. *Cell* 125, 359-369.
- Hilgenberg, L. G. W., Hoover, C. L., Smith, M. A., (1999). Evidence of an agrin receptor in cortical neurons. *Journal of Neuroscience* 19, 7384-7393.
- Hilgenberg, L. G. W., Smith, M. A., (2004). Agrin signaling in cortical neurons is mediated by a tyrosine kinase-dependent increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> that engages both CaMKII and MAPK signal pathways. *Journal of Neurobiology* 61, 289-300.
- 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.
- Hohenester, E., Maurer, P., Timpl, R., (1997). Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. *Embo Journal* 16, 3778-3786.
- Honda, T., Saitoh, H., Masuko, M., Katagiri-Abe, T., Tominaga, K., Kozakai, I., Kobayashi, K., Kumanishi, T., Watanabe, Y. G., Odani, S., Kuwano, R., (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 77, 19-28.
- Hooper, N. M., (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol.Membr.Biol.* 16, 145-156.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 271, 5231-5236.

- 
- Hotta, Y., Honda, T., Naito, M., Kuwano, R., (2003). Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 143, 1-13.
- Huang, K. C., Yasruel, Z., Guerin, C., Holland, P. C., Nalbantoglu, J., (2007). Interaction of the Coxsackie and adenovirus receptor (CAR) with the cytoskeleton: binding to actin. *FEBS Lett.* 581, 2702-2708.
- Iemura, S., Yamamoto, T. S., Takagi, C., Uchiyama, H., Natsume, T., Shimasaki, S., Sugino, H., Ueno, N., (1998). Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 95, 9337-9342.
- Innis, C. A., Hyvonen, M., (2003). Crystal structures of the heparan sulfate-binding domain of follistatin. Insights into ligand binding. *J Biol.Chem.* 278, 39969-39977.
- Inouye, S., Ling, N., Shimasaki, S., (1992). Localization of the heparin binding site of follistatin. *Mol.Cell Endocrinol.* 90, 1-6.
- Ji, R. R., Bose, C. M., Lesuisse, C., Qiu, D., Huang, J. C., Zhang, Q., Rupp, F., (1998). Specific agrin isoforms induce cAMP response element binding protein phosphorylation in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 18, 9695-9702.
- Jones, G., Herczeg, A., Ruegg, M. A., Lichtsteiner, M., Kröger, S., Brenner, H. R., (1996). Substrate-bound agrin induces expression of acetylcholine receptor epsilon-subunit gene in cultured mammalian muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5985-5990.
- Jones, G., Meier, T., Lichtsteiner, M., Witzemann, V., Sakmann, B., Brenner, H. R., (1997). Induction by agrin of ectopic and functional postsynaptic-like membrane in innervated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2654-2659.
- Jontes, J. D., Smith, S. J., (2000). Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron* 27, 11-14.
- Kammerer, R. A., Schulthess, T., Landwehr, R., Schumacher, B., Lustig, A., Yurchenco, P. D., Ruegg, M. A., Engel, J., Denzer, A. J., (1999). Interaction of agrin with laminin requires a coiled-coil conformation of the agrin-binding site within the laminin gamma 1 chain. *Embo Journal* 18, 6762-6770.
- Kaverina, I., Krylyshkina, O., Small, J. V., (2002). Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 34, 746-761.
- Keutmann, H. T., Schneyer, A. L., Sidis, Y., (2004). The role of follistatin domains in follistatin biological action. *Mol.Endocrinol.* 18, 228-240.
- Kim, M. J., Cotman, S. L., Halfter, W., Cole, G. J., (2003). The heparan sulfate proteoglycan agrin modulates neurite outgrowth mediated by FGF-2. *Journal of Neurobiology* 55, 261-277.

- 
- Kim, M. J., Liu, I. H., Song, Y., Lee, J. A., Halfter, W., Balice-Gordon, R. J., Linney, E., Cole, G. J., (2007). Agrin is required for posterior development and motor axon outgrowth and branching in embryonic zebrafish. *Glycobiology* 17, 231-247.
- Kim, N., Stiegler, A. L., Cameron, T. O., Hallock, P. T., Gomez, A. M., Huang, J. H., Hubbard, S. R., Dustin, M. L., Burden, S. J., (2008). Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* 135, 334-342.
- Knott, G., Holtmaat, A., (2008). Dendritic spine plasticity--current understanding from in vivo studies. *Brain Res.Rev.* 58, 282-289.
- Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., Svoboda, K., (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat.Neurosci.* 9, 1117-1124.
- Ko, M., Zou, K., Minagawa, H., Yu, W., Gong, J. S., Yanagisawa, K., Michikawa, M., (2005). Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J.Biol.Chem.* 280, 42759-42765.
- Konur, S., Ghosh, A., (2005). Calcium signaling and the control of dendritic development. *Neuron* 46, 401-405.
- 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. *European Journal of Neuroscience* 11, 4188-4196.
- Kröger, S., Mann, S., (1996). Biochemical and functional characterization of basal lamina-bound agrin in the chick central nervous system. *European Journal of Neuroscience* 8, 500-509.
- Kröger, S., Pfister, H., (2009). Agrin in the nervous system: synaptogenesis and beyond. *Future Neurology* 4, 67-86.
- Kröger, S., Schröder, J. E., (2002). Agrin in the developing CNS: New roles for a synapse organizer. *News in Physiological Sciences* 17, 207-212.
- Ksiazek, I., Burkhardt, C., Lin, S., Seddik, R., Maj, M., Bezakova, G., Jucker, M., Arber, S., Caroni, P., Sanes, J. R., Bettler, B., Ruegg, M. A., (2007). Synapse loss in cortex of agrin-deficient mice after genetic rescue of perinatal death. *J.Neurosci.* 27, 7183-7195.
- Laemmli, U. K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Li, Z., Hilgenberg, L. G. W., O'Dowd, D. K., Smith, M. A., (1999). Formation of functional synaptic connections between cultured cortical neurons from agrin-deficient mice. *Journal of Neurobiology* 39, 547-557.
- Li, Z., Massengill, J. L., Odowd, D. K., Smith, M. A., (1997). Agrin gene expression in mouse somatosensory cortical neurons during development in vivo and in cell culture. *Neuroscience* 79, 191-201.
- Lohmann, C., Bonhoeffer, T., (2008). A role for local calcium signaling in rapid synaptic partner selection by dendritic filopodia. *Neuron* 59, 253-260.

- 
- Luo, L., (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 18, 601-635.
- Ma, E., Morgan, R., Godfrey, E. W., (1994). Distribution of Agrin Messenger-Rnas in the Chick-Embryo Nervous-System. *Journal of Neuroscience* 14, 2943-2952.
- Ma, E. B., Morgan, R., Godfrey, E. W., (1995). Agrin Messenger-Rna Variants Are Differentially Regulated in Developing Chick-Embryo Spinal-Cord and Sensory Ganglia. *Journal of Neurobiology* 26, 585-597.
- 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). Formation of synaptic specializations in the inner plexiform layer of the developing chick retina. *Molecular and Cellular Neuroscience* 8, 1-13.
- Mantych, K. B., Ferreira, A., (2001). Agrin differentially regulates the rates of axonal and dendritic elongation in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 21, 6802-6809.
- Martin, P. T., Sanes, J. R., (1997). Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Development* 124, 3909-3917.
- Matsumoto-Miyai, K., Sokolowska, E., Zurlinden, A., Gee, C. E., Luscher, D., Hettwer, S., Wolfel, J., Ladner, A. P., Ster, J., Gerber, U., Rulicke, T., Kunz, B., Sonderegger, P., (2009). Coincident pre- and postsynaptic activation induces dendritic filopodia via neurotrypsin-dependent agrin cleavage. *Cell* 136, 1161-1171.
- Mattila, P. K., Lappalainen, P., (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9, 446-454.
- Matzuk, M. M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D. R., Bradley, A., (1995). Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 374, 360-363.
- McCroskery, S., Bailey, A., Lin, L., Daniels, M. P., (2009). Transmembrane agrin regulates dendritic filopodia and synapse formation in mature hippocampal neuron cultures. *Neuroscience* 163, 168-179.
- McCroskery, S., Chaudhry, A., Lin, L., Daniels, M. P., (2006). Transmembrane agrin regulates filopodia in rat hippocampal neurons in culture. *Mol.Cell Neurosci.* 33, 15-28.
- McMahan, U. J., (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 55, 407-418.
- McQuade, K. J., Beauvais, D. M., Burbach, B. J., Rapraeger, A. C., (2006). Syndecan-1 regulates alphavbeta5 integrin activity in B82L fibroblasts. *J.Cell Sci.* 119, 2445-2456.
- McQuade, K. J., Rapraeger, A. C., (2003). Syndecan-1 transmembrane and extracellular domains have unique and distinct roles in cell spreading. *J.Biol.Chem.* 278, 46607-46615.

- 
- Meier, T., Hauser, D. M., Chiquet, M., Landmann, L., Ruegg, M. A., Brenner, H. R., (1997). Neural agrin induces ectopic postsynaptic specializations in innervated muscle fibers. *Journal of Neuroscience* 17, 6534-6544.
- Meyer, G., Feldman, E. L., (2002). Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J.Neurochem.* 83, 490-503.
- Moransard, M., Borges, L. S., Willmann, R., Marangi, P. A., Brenner, H. R., Ferns, M. J., Fuhrer, C., (2003). Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering. *Journal of Biological Chemistry* 278, 7350-7359.
- Murphy-Ullrich, J. E., Lane, T. F., Pallero, M. A., Sage, E. H., (1995). SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand. *J Cell Biochem.* 57, 341-350.
- Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., Sugino, H., (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247, 836-838.
- Neuhuber, B., Daniels, M. P., (2003). Targeting of recombinant agrin to axonal growth cones. *Molecular and Cellular Neuroscience* 24, 1180-1196.
- 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. *Molecular and Cellular Neuroscience* 17, 208-225.
- Nikonenko, I., Jourdain, P., Muller, D., (2003). Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis. *J.Neurosci.* 23, 8498-8505.
- 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.
- OConnor, L. T., Lauterborn, J. C., Gall, C. M., Smith, M. A., (1994). Localization and Alternative Splicing of Agrin Messenger-Rna in Adult-Rat Brain - Transcripts Encoding Isoforms That Aggregate Acetylcholine-Receptors Are Not Restricted to Cholinergic Regions. *Journal of Neuroscience* 14, 1141-1152.
- OConnor, L. T., Lauterborn, J. C., Smith, M. A., Gall, C. M., (1995). Expression of Agrin Messenger-Rna Is Altered Following Seizures in Adult-Rat Brain. *Molecular Brain Research* 33, 277-287.
- Ornitz, D. M., (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22, 108-112.
- Otoole, J. J., Deyst, K. A., Bowe, M. A., Nastuk, M. A., McKechnie, B. A., Fallon, J. R., (1996). Alternative splicing of agrin regulates its binding to heparin, alpha-dystroglycan, and the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 7369-7374.
- Phillips, D. J., de Kretser, D. M., (1998). Follistatin: a multifunctional regulatory protein. *Front Neuroendocrinol.* 19, 287-322.

- 
- Porten, E., Seliger, B., Schneider, V. A., Wöll, S., Stangel, D., Ramseger, R., Kröger, S., (2010). The process-inducing activity of transmembrane agrin requires follistatin-like domains. *J Biol.Chem.* 285, 3114-3125.
- Powell, P. P., Finklestein, S. P., Dionne, C. A., Jaye, M., Klagsbrun, M., (1991). Temporal, differential and regional expression of mRNA for basic fibroblast growth factor in the developing and adult rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 11, 71-77.
- Qian, X., Davis, A. A., Goderie, S. K., Temple, S., (1997). FGF2 concentration regulates the generation of neurons and glia from multipotent cortical stem cells. *Neuron* 18, 81-93.
- Ramseger, R., (2007). Analyse der Transmembran-Agrin-abhängigen Signalkaskade in auswachsenden Axonen des zentralen Nervensystems. *Dissertation.* Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Biologie.
- Ramseger, R., (2004). Identifikation der Zytoskelle-reorganisierenden Region in Transmembran-Agrin. *Diplomarbeit.* Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Fachbereich Biologie.
- Ramseger, R., White, R., Kröger, S., (2009). Transmembrane Form Agrin-induced Process Formation Requires Lipid Rafts and the Activation of Fyn and MAPK. *J.Biol.Chem.* 284, 7697-7705.
- Ravel-Chapuis, A., Vandromme, M., Thomas, J. L., Schaeffer, L., (2007). Postsynaptic chromatin is under neural control at the neuromuscular junction. *EMBO J.* 26, 1117-1128.
- Reif, R., Sales, S., Hettwer, S., Dreier, B., Gisler, C., Wolfel, J., Luscher, D., Zurlinden, A., Stephan, A., Ahmed, S., Baici, A., Ledermann, B., Kunz, B., Sonderegger, P., (2007). Specific cleavage of agrin by neurotrypsin, a synaptic protease linked to mental retardation. *FASEB J.*
- Resh, M. D., (1998). Fyn, a Src family tyrosine kinase. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 30, 1159-1162.
- Richards, D. A., de, P., V, Caroni, P., Gahwiler, B. H., McKinney, R. A., (2004). AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus. *J.Physiol* 558, 503-512.
- Rimer, M., Mathiesen, I., Lomo, T., McMahan, U. J., (1997). gamma-AChR/epsilon-AChR switch at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Neuroscience* 9, 254-263.
- Robertson, D. M., Klein, R., de Vos, F. L., McLachlan, R. I., Wettenhall, R. E., Hearn, M. T., Burger, H. G., de Kretser, D. M., (1987). The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 149, 744-749.
- 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.

- 
- 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.
- Sekino, Y., Kojima, N., Shirao, T., (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem.Int.* 51, 92-104.
- Seliger, B., (2008). Identifikation der für die Fortsatzbildung auf Zellen notwendigen Domäne von TM-Agrin. *Bachelor Thesis*. Fachhochschule Lausitz, Fachbereich Bio-, Chemie- und Verfahrenstechnik.
- Serpinskaya, A. S., Feng, G. P., Sanes, J. R., Craig, A. M., (1999). Synapse formation by hippocampal neurons from agrin-deficient mice. *Developmental Biology* 205, 65-78.
- Shimasaki, S., Koga, M., Buscaglia, M. L., Simmons, D. M., Bicsak, T. A., Ling, N., (1989). Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol.Endocrinol.* 3, 651-659.
- Sidis, Y., Schneyer, A. L., Sluss, P. M., Johnson, L. N., Keutmann, H. T., (2001). Follistatin: Essential role for the N-terminal domain in activin binding and neutralization. *Journal of Biological Chemistry* 276, 17718-17726.
- Simons, K., Toomre, D., (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1, 31-39.
- Smith, M. A., Odowd, D. K., (1994). Cell-Specific Regulation of Agrin Rna Splicing in the Chick Ciliary Ganglion. *Neuron* 12, 795-804.
- 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. *Molecular and Cellular Neuroscience* 3, 406-417.
- Stephan, A., Mateos, J. M., Kozlov, S. V., Cinelli, P., Kistler, A. D., Hettwer, S., Rulicke, T., Streit, P., Kunz, B., Sonderegger, P., (2008). Neurotrypsin cleaves agrin locally at the synapse. *FASEB J.* 22, 1861-1873.
- Stone, D. M., Nikolics, K., (1995). Tissue-Specific and Age-Specific Expression Patterns of Alternatively Spliced Agrin Messenger-Rna Transcripts in Embryonic Rat Suggest Novel Developmental Roles. *Journal of Neuroscience* 15, 6767-6778.
- Sugino, K., Kurosawa, N., Nakamura, T., Takio, K., Shimasaki, S., Ling, N., Titani, K., Sugino, H., (1993). Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J Biol.Chem.* 268, 15579-15587.
- Sumitomo, S., Inouye, S., Liu, X. J., Ling, N., Shimasaki, S., (1995). The heparin binding site of follistatin is involved in its interaction with activin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 208, 1-9.
- Szczur, K., Xu, H., Atkinson, S., Zheng, Y., Filippi, M. D., (2006). Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in neutrophils. *Blood* 108, 4205-4213.

- 
- Szebenyi, G., Dent, E. W., Callaway, J. L., Seys, C., Lueth, H., Kalil, K., (2001). Fibroblast growth factor-2 promotes axon branching of cortical neurons by influencing morphology and behavior of the primary growth cone. *J.Neurosci.* 21, 3932-3941.
- Tang, M. X., Redemann, C. T., Szoka, F. C., Jr., (1996). In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug.Chem.* 7, 703-714.
- Tansey, M. G., Baloh, R. H., Milbrandt, J., Johnson, E. M., Jr., (2000). GFRalpha-mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25, 611-623.
- Tashiro, K., Yamada, R., Asano, M., Hashimoto, M., Muramatsu, M., Shiokawa, K., (1991). Expression of mRNA for activin-binding protein (follistatin) during early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 174, 1022-1027.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- Thodeti, C. K., Albrechtsen, R., Grauslund, M., Asmar, M., Larsson, C., Takada, Y., Mercurio, A. M., Couchman, J. R., Wewer, U. M., (2003). ADAM12/syndecan-4 signaling promotes beta 1 integrin-dependent cell spreading through protein kinase Calpha and RhoA. *J.Biol.Chem.* 278, 9576-9584.
- Thomas, W. S., Jacob, M. H., O'Dowd, D. K., Smith, M. A., (1995). Agrin gene expression in ciliary ganglion neurons following preganglionic denervation and postganglionic axotomy. *Dev.Biol.* 168, 662-669.
- Thompson, T. B., Lerch, T. F., Cook, R. W., Woodruff, T. K., Jardetzky, T. S., (2005). The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev.Cell* 9, 535-543.
- Tomko, R. P., Johansson, C. B., Totrov, M., Abagyan, R., Frisen, J., Philipson, L., (2000). Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp.Cell Res.* 255, 47-55.
- Tomko, R. P., Xu, R., Philipson, L., (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 3352-3356.
- Tournell, C. E., Bergstrom, R. A., Ferreira, A., (2006). Progesterone-induced agrin expression in astrocytes modulates glia-neuron interactions leading to synapse formation. *Neuroscience* 141, 1327-1338.
- Tsen, G., Halfter, W., Kröger, S., Cole, G. J., (1995). Agrin Is A Heparan-Sulfate Proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 270, 3392-3399.
- Tsim, K. W., Ruegg, M. A., Escher, G., Kröger, S., McMahan, U. J., (1992). cDNA that encodes active agrin. *Neuron* 8, 677-689.
- Uchida, T., Wada, K., Akamatsu, T., Yonezawa, M., Noguchi, H., Mizoguchi, A., Kasuga, M., Sakamoto, C., (1999). A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 266, 593-602.

- 
- Uhm, C. S., Neuhuber, B., Lowe, B., Crocker, V., Daniels, M. P., (2001). Synapse-forming axons and recombinant agrin induce microprocess formation on myotubes. *Journal of Neuroscience* 21, 9678-9689.
- Ullman, C. G., Perkins, S. J., (1997). The Factor I and follistatin domain families: the return of a prodigal son. *Biochem.J* 326 ( Pt 3), 939-941.
- 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., ., (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.
- Weatherbee, S. D., Anderson, K. V., Niswander, L. A., (2006). LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 133, 4993-5000.
- Weiss, A., Schlessinger, J., (1998). Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 94, 277-280.
- Winzen, U., Cole, G. J., Halfter, W., (2003). Agrin is a chimeric proteoglycan with the attachment sites for heparan sulfate/chondroitin sulfate located in two multiple serine-glycine clusters. *Journal of Biological Chemistry* 278, 30106-30114.
- Wöll, S., (2002). Heterologe Expression des Heparansulfat Proteoglykans Agrin. *Diplomarbeit*. Johannes-Guenberg-Universität Mainz, Fachbereich Biologie.
- Wood, W., Martin, P., (2002). Structures in focus--filopodia. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 34, 726-730.
- Woods, A., Couchman, J. R., (2001). Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13, 578-583.
- Xu, X. H., Fu, A. K. Y., Ip, F. C. F., Wu, C. P., Duan, S. M., Poo, M. M., Yuan, X. B., Ip, N. Y., (2005). Agrin regulates growth cone turning of *Xenopus* spinal motoneurons. *Development* 132, 4309-4316.
- Yoneda, A., Couchman, J. R., (2003). Regulation of cytoskeletal organization by syndecan transmembrane proteoglycans. *Matrix Biol.* 22, 25-33.
- Zacharias, U., Leuschner, R., Norenberg, U., Rathjen, F. G., (2002). Tenascin-R induces actin-rich microprocesses and branches along neurite shafts. *Mol.Cell Neurosci.* 21, 626-633.
- Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W. C., Mei, L., (2008). LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* 60, 285-297.
- Ziv, N. E., Smith, S. J., (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91-102.