

**INAUGURAL - DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung der Doktorwürde**

**der**

**Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät**

**der**

**Ruprecht-Karls-Universität**

**Heidelberg**

**vorgelegt von**

**Diplom-Biologe Martin Theiß**

**aus Frankfurt am Main**

**Tag der mündlichen Prüfung: .....**

**Die Rolle des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1B (MAP1B)  
bei der axonalen Navigation in der embryonalen Retina**

**Gutachter: Prof. Dr. G. Elisabeth Pollerberg**

**Prof. Dr. Stephan Frings**

## **Danksagung**

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. G.E. Pollerberg für ihre intensive Betreuung, konstruktive Diskussionen und die Möglichkeit, eine internationale Konferenz zu besuchen. Ich habe viel von ihr gelernt.

Ich danke Dr. S. Frings für sein Interesse an dieser Arbeit und für die Erstellung des Gutachtens und Dr. K. Thelen für zahlreiche Anregungen.

Prof. Dr. F. Propst danke ich für die Überlassung der k.o.-Mäuse und die Diskussion im Rahmen des Projekts, Prof. Dr. N. Galjart für die Überlassung der EB-GFP-Konstrukte und Prof. Dr. A. Akhmanova sowie Prof. Dr. C. Hoogenraad für die Gespräche zur Mikrotubuli-Beobachtung.

Der gesamten Arbeitsgruppe Entwicklungsneurobiologie danke ich für ihre praktischen Anregungen und Tipps: zu Beginn des Projektes den technischen Assistentinnen Susanne Bergmann, Claudia Brandel, Monika Zieher-Lorenz, später im Projekt Natalja Engel, Yasmin Schweizer, Gesine Richter. Auch bedanken muss ich mich bei all den Studenten, die mit kleinen Überraschungen, kleinen Zwischenfragen und Kleinbränden dafür sorgten, dass der Laboralltag so abwechslungsreich war.

Dr. U. Engel, Dr. N. Dross und dem Team vom Nikon Imaging Center danke ich für die Einweisung in die Mikroskope, ihre praktischen Ratschläge und die Hilfe bei der Bedienung des Multiphotonenmikroskops.

Gedankt sei auch der DFG, die diese Arbeit im Rahmen des SFB488 finanziell unterstützt hat.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt hat, insbesondere an meine Frau Ina für ihre Liebe und ihr Verständnis.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	3
<b>Zusammenfassung</b> .....	8
<b>Summary</b> .....	9
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	10
<b>I Einleitung</b> .....	12
<b>1 Die Embryonalentwicklung des Auges</b> .....	12
<b>2 Axonales Wachstum und Navigation</b> .....	16
2.1 Axon und Wachstumskegel.....	16
2.2 Wegfindung der RGZ-Axone bis zum Chiasma.....	17
<b>3 Zytoskelett des Wachstumskegels</b> .....	21
3.1 Mikrofilamente.....	21
3.2 Intermediärfilamente.....	22
3.3 Mikrotubuli.....	22
3.4 Mikrotubuli-assoziierte Proteine.....	25
3.5 MAP1B.....	26
3.6 MAP1B Knockdown und Überexpression.....	29
3.7 MAP1B Knockout.....	30
3.8 Navigation des Wachstumskegels.....	34
<b>4 Ziel der Arbeit</b> .....	37
<b>II Material und Methoden</b> .....	38
<b>1 Spezielle Labormaterialien</b> .....	38
<b>2 Spezielle Chemikalien und Proteine</b> .....	39
<b>3 Medien und Puffer</b> .....	40
3.1 Hank's Puffer für Retinapräparation.....	40
3.2 Mg-Ca-PBS für Proteinbeschichtungen.....	40
3.3 Medium für Kultur aus Mausembryo-Retina.....	40

<b>4</b>	<b>Markierungen und Färbungen</b>	<b>41</b>
4.1	Immunhistochemische und cytochemische Färbungen	41
4.2	Weitere Färbungen	41
<b>5</b>	<b>Spezielle Geräte</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Mikroskope und Mikroskopsteuerung</b>	<b>43</b>
6.1	Epifluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskope Axiovert 200M und Axiovert 100TV	43
6.2	Kompaktfluoreszenzmikroskop BZ-9000	43
6.3	Multiphotonenmikroskop TriM Scope	43
<b>7</b>	<b>Software</b>	<b>44</b>
7.1	Betriebssysteme	44
7.2	Bildaufbereitung und Quantifizierung	44
7.3	Textverarbeitung und Literaturverwaltung	46
7.4	Mauskolonieverwaltung	46
<b>8</b>	<b>Molekulargenetische Methoden</b>	<b>47</b>
8.1	Genotypisierung der Mäuse und Mausembryonen	47
<b>9</b>	<b>Tiere</b>	<b>49</b>
9.1	Herkunft der k.o.-Mauslinie	49
9.2	Verpaarung der Mäuse	49
9.3	Tötung der Mäuse zur Organentnahme	49
<b>10</b>	<b>Gefrierschnitte von Mausembryoaugen</b>	<b>50</b>
10.1	Herstellung der Gefrierschnitte	50
10.2	Färbung der Gefrierschnitte	50
<b>11</b>	<b>Retina-Gesamtpräparaten</b>	<b>51</b>
11.1	Präparation der Mausretina	51
11.2	Sichtbarmachen von RGZ-Axonon in Retina-Gesamtpräparaten	52
11.3	Sichtbarmachen des Teils der optischen Faserschicht, deren Axone den SNK bereits erreicht haben	52
11.4	Sichtbarmachen von lokalen Axon-Subpopulationen	53
<b>12</b>	<b>Herstellung von Augenpräparaten und Multiphotonenmikroskopie</b>	<b>55</b>
12.1	Markierung von lokalen Axon-Subpopulationen in intakten Augen	55
12.2	Präparieren und Einbetten der Augen	55

12.3	Multiphotonenmikroskopie der Augenpräparate.....	56
<b>13</b>	<b>Herstellung von biomimetischen ALCAM-Mikromustern.....</b>	<b>58</b>
13.1	Produktion von rekombinantem ALCAM.....	58
13.2	Erzeugung der biomimetischen Substratstreifen.....	58
<b>14</b>	<b>Lebendbeobachtung von Axonen.....</b>	<b>60</b>
14.1	Aufnahme von Zeitrafferfilmen der Wachstumskegel.....	60
14.2	Untersuchung des Wachstumskegel-Verhaltens auf definiertem Substrat....	60
14.3	Untersuchung des Wachstumskegel-Verhaltens in Retina-Gesamtpräparaten .....	61
<b>15</b>	<b>Quantifizierung und Auswertung.....</b>	<b>62</b>
15.1	Faszikel Anzahl und Durchmesser in Retina-Gesamtpräparaten.....	62
15.2	Defaszikulierung und Faszikulierung in Retina-Gesamtpräparaten.....	64
15.3	Faszikelzwischenräume in Retina-Gesamtpräparaten.....	65
15.4	Wachstumsebene von Axon-Subpopulationen in RetinaGesamtpräparaten.	67
15.5	Axon-Dynamik auf homogenem Substrat.....	67
15.6	Axon-Dynamik in Retina-Gesamtpräparaten.....	69
15.7	Wachstumskegel-Dynamik.....	69
<b>III</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>71</b>
<b>1</b>	<b>Voruntersuchungen.....</b>	<b>71</b>
1.1	Homozygote k.o.-Embryonen sind unauffällig und die Genotypen im Wurf von heterozygoten Eltern liegen im Verhältnis 1:2:1 vor.....	71
1.2	Die zentral-periphere Ausbreitung der RGZ-somata, deren Axone den SNK erreicht haben, hat einen Radius von 600 µm.....	74
1.3	Lagerung der Mausembryoköpfe in kühlem Hank's Puffer ist möglich.....	76
<b>2</b>	<b>Dicke der Neuroretina.....</b>	<b>77</b>
2.1	Die Neuroretina ist in MAP1B-k.o.-Mäusen in der Nähe des SNK dünner....	77
<b>3</b>	<b>RGZ-Axon-Faszikulierung in der Retina.....</b>	<b>79</b>
3.1	Automatisierte Quantifizierung von Axonfaszikeln liefert zuverlässige Ergebnisse.....	79
3.2	Die Anzahl dünner Faszikel in der optischen Faserschicht ist im k.o. erhöht	81
3.3	Die Anzahl der Defaszikulierungen und Faszikulierungen ist im k.o. erhöht.	84
3.4	Anzahl und Fläche der Faszikelzwischenräume ist unverändert.....	87

<b>4</b>	<b>Navigation der RGZ-Axone am SNK.....</b>	<b>88</b>
4.1	Subpopulationen von RGZ-Axonon fehlnavigieren im k.o. am SNK.....	88
4.2	Fehl navigierende RGZ-Axone tauchen in den SNK ein, verlassen diesen jedoch wieder, um in die gegenüberliegende Retina einzudringen.....	92
4.3	Dreidimensionale Mikroskopie von Augen-Gesamtpräparaten.....	95
<b>5</b>	<b>RGZ-Axon-Verhalten in vitro.....</b>	<b>97</b>
5.1	Die Wachstumsdynamik von RGZ-Axonon variiert stärker im k.o.....	97
5.2	Die Wachstumskegel-Asymmetrie variiert stärker im k.o.....	102
5.3	RGZ-Axone bevorzugen Mikrostreifen mit ALCAM und faszikulieren auf diesen.....	103
<b>6</b>	<b>RGZ-Axon-Verhalten in vivo.....</b>	<b>105</b>
6.1	Wachstumskegel in Retina-Gesamtpräparaten wachsen dreimal so effizient wie auf Laminin-Substrat.....	105
<b>IV</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>108</b>
<b>1</b>	<b>Entwicklung der Neuroretina unter MAP1B-k.o.....</b>	<b>108</b>
<b>2</b>	<b>Verhalten der RGZ-Wachstumskegel in vitro.....</b>	<b>111</b>
<b>3</b>	<b>Faszikulierung und Navigation der RGZ-Axone in der Retina in vivo. .</b>	<b>116</b>
<b>4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>122</b>
<b>V</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>127</b>
	<b>Eigene Publikationen.....</b>	<b>140</b>

## Zusammenfassung

Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) modulieren die Stabilität und Dynamik von Mikrotubuli. Indem sie das Wachstum der Mikrotubuli regulieren, die den Hauptanteil des axonalen Zytoskeletts ausmachen, spielen MAPs eine entscheidende Rolle für die Elongation und Navigation von Axonen. Eines der fünf klassischen MAPs (MAP1–4 und Tau) ist MAP1B, ein axonales MAP, das als Erstes während der Embryonalentwicklung auftritt. In dieser Arbeit wurde die Rolle von MAP1B bei der Wegfindung von Axonen der retinalen Ganglienzellen (RGZ) in der sich entwickelnden Retina untersucht. Hierzu wurden Retinae von Mausembryonen, die kein MAP1B besitzen (Knockout), in der Phase des maximalen RGZ-Axonwachstums (E14,5) untersucht. Die k.o.-Neuroretina ist im Zentralbereich (um den Sehnervkopf herum) dünner als im Wildtyp. Dies ist jedoch nicht auf eine Reduktion der RGZ-Axone zurückzuführen, sondern auf eine Verminderung der Neuroepithelialzellschicht. RGZ-Axone zeigen auf ihrem Weg zum Sehnerv, auf dem sie sich zunehmend bündeln, in der k.o.-Retina ein abnormales Navigationsverhalten: Einzelne RGZ-Axone und dünne Axonbündel lösen sich häufiger aus ihren Faszikeln, wodurch die Anzahl dünner Faszikel erhöht ist. *In vitro* Experimente unter genauer definierten Bedingungen und an einzelnen RGZ-Axonon offenbarten, dass zwei Verhaltensweisen im k.o. häufiger auftraten: starke Seitwärtsbewegungen der Axonspitzen und starke Lateral-exploration des Wachstumskegels an der Axonspitze. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Befunde weisen also darauf hin, dass bei Fehlen von MAP1B die Feinregulation der Steuerungsbewegungen der Axone reduziert ist, was zu dem beobachteten Abwandern aus den Bündeln führen könnte. Dies bewirkt insbesondere am Sehnervkopf, wo die RGZ-Axone ein Abbiegemanöver durchführen, dramatische Fehlnavigationen im k.o.: Die Axone tauchen zwar in den Sehnervkopf ein, wachsen dann jedoch in die gegenüberliegende Neuroretina. Sie wachsen dabei nicht antiparallel entlang der RGZ-Axone, sondern in einer tieferen Neuroretinaschicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal eine wichtige Rolle von MAP1B bei der Moderierung des Wachstumskegelverhaltens sowie der Weg- und Zielfindung navigierender Axone.

## Summary

Microtubule-associated proteins (MAPs) modulate the stability and dynamics of microtubules. By regulating microtubules, the main component of the axonal cytoskeleton, MAPs play a crucial role for the elongation and navigation of axons. One of the five classical MAPs (MAP1–4 and Tau) is MAP1B, an axonal MAP which is the first to appear during embryonic development. In this thesis project, the role of MAP1B in path finding of retinal ganglion cell (RGC) axons was investigated in the developing retina. For this, the retinae of mouse embryos lacking MAP1B (knockout) were examined in the phase of maximal RGC axon growth (E14.5): The k.o. retina in the central region (around the optic nerve head) is thinner than the wild type retina which is, however, not due to a reduction in RGC axons but to a decrease of the epithelial cell layer. RGC axons exhibit on their way to the optic nerve, where they progressively fasciculate, an abnormal navigation behaviour in k.o. retinae: Single RGC axons and thin axon fascicles separate from their bundles more often, thereby increasing the number of thin fascicles. *In vitro* experiments under more defined conditions and observation of single RGC axons revealed that two types of behaviour were more frequent under k.o. conditions: strong side-movements of the axon tips and strong lateral exploration of the growth cone at the axon tip. These *in vivo* and *in vitro* findings indicate that lack of MAP1B reduces the fine regulation of axonal steering movements which could lead to the observed straying from bundles. At the optic nerve head, where RGC axons perform a turning manoeuvre, this causes dramatic misrouting in the k.o. retina: The axons dive into the optic nerve head, however, then extend into the opposite side of the retina, not growing along the RGC axons in an anti-parallel fashion but in a deeper layer of the retina. The findings of this Ph.D. project demonstrate for the first time an important role of MAP1B in the moderation of growth cone behaviour as well as the path and target finding of navigating axons.

## Abkürzungsverzeichnis

AAP – **A**ktin **a**ssoziiertes **P**rotein

ÄNBS – **Ä**ußere **n**euro**b**lastische **S**chicht (outer neuroblastic layer, ONBL)

CS2 – Adobe **C**reative **S**uite Version **2**

DAPI – 4',6-**D**iamidin-2-**p**henyl**i**ndol (Zellkernmarker)

Dil – 1,1'-**D**ioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl**i**ndocarbocyanine perchlorate (lipophiler Tracer)

DiO – 3,3'-**D**ioctadecyl**o**xcarbocyanine perchlorate (lipophiler Tracer)

DMEM/F-12 – **D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium / Ham's **F-12** Nutrient Mixture

E14,5 – **E**mryonaler Entwicklungstag **14,5**: 14 Tage nach dem Vaginalplug

Fiji – **F**iji **i**s **j**ust **I**mageJ Softwarepaket mit ImageJ und weiteren Plug-ins

(g/v) – **G**ewicht pro **V**olumen; 10% (g/v): 10 g in 90 ml

GTP / GDP – **G**uanosin**t**ri**p**hospat / **G**uanosin**d**i**p**hospat

GIMP – **G**NU **I**mage **M**anipulation **P**rogram

IBF – **I**nterfakultäre **B**iomedizinische **F**orschungseinrichtung (Heidelberg)

INBS – **I**nnere **n**euro**b**lastische **S**chicht (inner neuroblastic layer, INBL)

HEPES – 2-(4-(2-**H**ydroxy**e**thyl)-1-**p**iperazinyl)-**e**thansulfons**ä**ure (pH Puffer)

HWG – **H**irnwurzel**g**anglien

k.o. – **K**nock**o**ut, hier: bezogen auf das deaktivierte MAP1B-Gen der Maus

MAP1B – **M**ikrotubuli-**a**ssoziiertes **P**rotein **1B**

mRNA – **m**essenger **R**NA (Boten-RNA)

NIC – **N**ikon **I**maging **C**enter, Heidelberg

OFS – **O**ptische **F**asers**s**chicht (optic fiber layer, OFL)

PBS – Dulbeccos **p**hosphate **b**uffered **s**aline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR – **P**olymerase **C**hain **R**eaction (Polymerase-Kettenreaktion)

Pen/Strep – **P**enicillin / **S**treptomycin Antibiotikamixtur

PFA – **P**ara-**F**ormaldehyd

PLL – **P**oly-**L**-**L**ysin

RGZ – **r**etinale **G**anglienzelle(n)

RNAi – **RNA** **I**nterferenz

SNK – **S**eh**n**erv**k**opf (optic nerve head)

TAE-Puffer – **T**RIS, **A**cetate, **E**DTA (Ethyldiamintetraessigsäure)

TBS – **T**RIS **b**uffered **s**aline (TRIS gepufferte Salzlösung)

TRIS – **T**ris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TSC – **T**ransiente **S**chicht von **C**hievitz (transient fibre layer of Chievitz)

(v/v) – **V**olumen pro **V**olumen; 10% (v/v): 10 ml in 90 ml, gesamt 100 ml

w.t. – **W**ild**t**yp, hier: bezogen auf das intakte MAP1B-Gen der Maus

# I Einleitung

## 1 Die Embryonalentwicklung des Auges

Das Nervensystem erlaubt es, schnell, flexibel und gezielt auf Veränderungen in der Umgebung zu reagieren. Die Augen sind für viele Lebewesen dabei ein wichtiges Sinnesorgan, da sie das Wahrnehmen der Umwelt über große Entfernung und ohne Zeitverzögerung ermöglichen. Es werden erheblich mehr neuronale Retinazellen angelegt als benötigt werden, vermutlich, um Störungen der Augenentwicklung abzumildern. Die Entstehung der Augen ist genetisch hoch konserviert, die nachfolgende Beschreibung bezieht sich jedoch auf die Entwicklung des Mauseuges.

Die späteren Augen differenzieren sich als Augenfeld im *Prosencephalon* (prospektives *Diencephalon*). Das Augenfeld teilt sich entlang der Mittellinie. Im Embryonalstadium der Maus Theiler-Stadium 12 (T12) – dies entspricht dem Embryonaltag 7,5 (E7,5) und einem Embryo mit 5–7 Somitenpaaren – beginnen sich die Augenbläschen aus dem Diencephalon auszustülpen. Die Augenbläschen berühren in T15 (E9,5; 20–25 Somitenpaare) das sich differenzierende Ektoderm. Im Ektoderm induzieren die Augenbläschen die Bildung der Linse, die wiederum das Einfallen der Augenbläschen zu einem doppelwandigen Augenbecher induziert. Dies passiert ebenfalls in Stadium T15 (E10,5 25–30 Somitenpaare). Die äußere Zellschicht des Augenbechers differenziert sich zum Pigmentepithel, die innere Zellschicht zur Neuroretina: Im T20 (E11,5–E13; 48–51 Somitenpaare) wird das Pigmentepithel durch seine dunkle Färbung erkennbar (Chow & Lang, 2001; Pei & Rhodin, 1970).

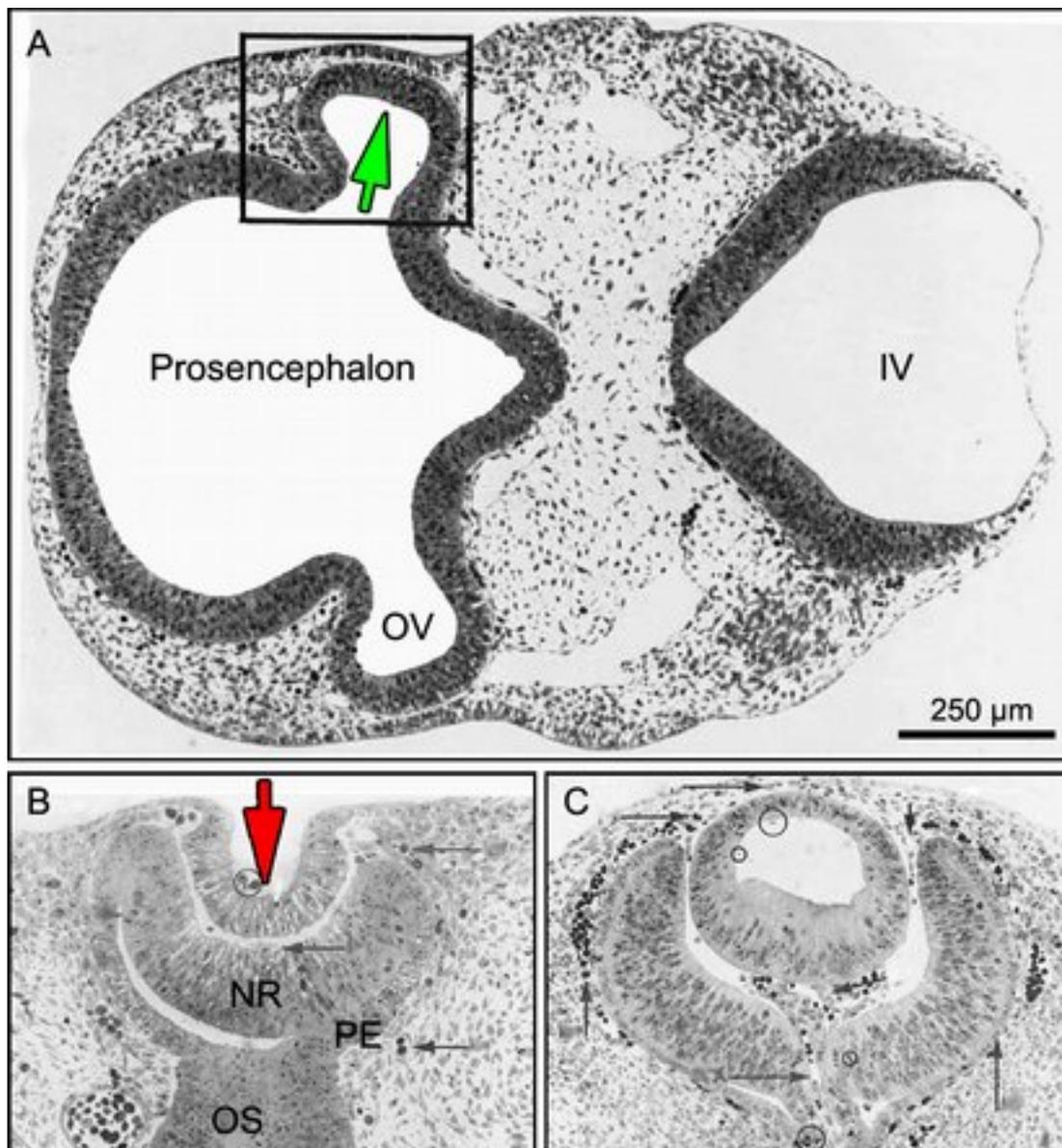


Abbildung 1: Augenentwicklung der Maus. Transversalschnitt durch den Kopf eines Mausembryos E9,5 (A). Zu erkennen sind der vierte Ventrikel (IV) und das Prosencephalon, aus dem sich die optischen Vesikel (OV) ausstülpfen (grüner Pfeil). Detailansicht des Auges E10,5 (B), auf der zu sehen ist, dass der OV bereits einfällt (roter Pfeil), Neuroretina (NR), prospektiver Sehnerv (optischer Stil, OS) und das Pigmentepithel (PE) sind zu erkennen. Detailansicht eines Auges E12,5 (C), bei dem sich die Linse geschlossen hat und die ersten RGZ-Axone den SNK in den Sehnerv verlassen. Bild angepasst aus (Pei & Rhodin, 1970).

Im zentralen Bereich der Neuroretina sinkt diese ab und verbindet sich mit dem Augentiel zum späteren Sehnerv. An der Stelle der Einstülpung entsteht an E10,5 der Sehnervkopf (SNK). Dies ist begleitet von einer ersten Apoptosewelle im zentralen Teil des neu geformten Augenbechers (Péquignot et al., 2003). Die peripheren Vorläuferzellen (Neuroepithelialzellen) der Neuroretina proliferieren weiter, so dass die Retina sich peripher ausdehnt. Die zentralen Neuroepithelialzellen proliferieren und beginnen mit der Differenzierung. Sie sind an der Basalmembran auf der Seite des Glaskörpers und der Basalmembran auf der Seite des Ventrikels mit ihren Endfüßen verankert und bewegen sich zwischen den Membranen auf und ab (Baye & Link, 2008). Die Neuroepithelialzellen teilen sich an der ventrikulären Basalmembran in eine Neuroepithelialzelle, die den Zyklus von vorne beginnt, und eine neuronale Retinazelle, die ihre Differenzierung beginnt. Die ersten Retinazellen, die sich differenzieren, sind die retinalen Ganglienzellen (RGZ). Sie bilden eine mehrlagige Schicht und senden ihr Axon in zentrale Richtung zum SNK aus. Aus diesen Axonen besteht die optische Faserschicht (OFS). Weitere Zelltypen werden erzeugt: Es entstehen in der ersten Welle Amakrinzellen, Horizontalzellen und Zapfen (ab E11 mit einem Peak E14,5).

Am Tag E14,5 besteht die Neuroretina aus den Somata der Neuroepithelialzellen in der äußeren neuroblastischen Schicht (ÄNBS). Die RGZ liegen in einer bis zu vier Zellen dicken Schicht vor, die nicht als klare Schicht erkennbar ist. Sie bilden gemeinsam mit den sich zu Amakrinzellen und Horizontalzellen differenzierenden Zellen die innere neuroblastische Schicht (INBS). Die beiden Schichten sind durch eine weitgehend zellkernfreie, aus Fortsätzen der Neuroepithelialzellen bestehende Schicht getrennt. Diese dünne Schicht ist das *transient fibre layer of Chievitz* (TSC). Das TSC besteht aus den Fortsätzen neuronaler Zellen, auf denen bei *in vitro* Experimenten das Adhäsionsmolekül Contactin-1 (CNTN-1) nachgewiesen wurde (Wolburg et al., 1991). Contactin-1 spielt bei der Einteilung der (aus der TSC entstehenden) inneren plexiformen Schicht in Unterschichten (*sub*

*lamination*) eine entscheidende Rolle (Yamagata & Sanes, 2012). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der TSC lokalisiert dort Axone und Fortsätze von Müller-Gliazellen (Smelser et al., 1973). Müller-Gliazellen sind jedoch der letzte Zelltyp, der sich in der Retina differenziert. Während ihrer Differenzierung an E16 in der Mausretina ist bereits eine innere plexiforme Schicht entwickelt, es handelt sich also um Ausläufer der Neuroepithelialzellen im TSC (Hatakeyama & Kageyama, 2004). Es herrscht keine Einigkeit über den Aufbau und es finden sich nur Mutmaßungen in der Literatur, was die Funktion der TSC bei der Entstehung der inneren plexiformen Schicht und der Trennung von Amakrin- und Bipolarzellen betrifft (Provis et al., 1998).

In einer zweiten Welle differenzieren Stäbchen, Bipolarzellen und zuletzt die Müller-Gliazellen (ab E16 mit einem Peak um P3). Die Schichten der Retina teilen sich neu und in mehr Schichten als bisher auf: Aus der INBS wird die Ganglienzellschicht (GZS), ein Teil der ÄNBS rückt nach innen und ein Teil der INBS nach außen. Hierdurch entsteht die innere Körnerschicht aus Horizontalzellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und den Müller-Gliazellen. Dies resultiert in der Auflösung des TSC und es entsteht die äußere plexiforme Schicht (ÄPS) in Abgrenzung zu den RGZ und die innere plexiforme Schicht (IPS) in Abgrenzung zu den Photorezeptoren (Provis et al., 1998; Wang et al., 2002; Young, 1985). Die Augenentwicklung setzt sich weiter fort, in Apoptosewellen an P2, P9 und P15 werden falsch verschaltete Retinazellen entfernt (Péquignot et al., 2003).

## 2 Axonales Wachstum und Navigation

### 2.1 Axon und Wachstumskegel

Um die neuronale Zelle mit dem korrekten Zielgebiet zu verschalten und der Apoptose zu entgehen, ist es notwendig, dass das Axon vom Soma erfolgreich ins Zielgebiet navigiert. Die Struktur am wachsenden Ende des Axons, die dies bewerkstelligt, ist der Wachstumskegel. Der Wachstumskegel ist eine hochdynamische Struktur, deren Zytoskelett permanent umgebaut wird. Der Wachstumskegel ändert *in vivo* seine Form zwischen gestrecktem, torpedoförmigem Wachstum in Vorwärtsphasen und flächiger Form in Orientierungsphasen (Brittis et al., 1995; Zelina et al., 2005). Wachstumskegel, die *in vitro* auf beschichtetem Glas auswachsen, zeigen eine flächige Struktur auch im Vorwärtswachstum.

Trotz der hohen Dynamik und ständigen Bewegung ist der Wachstumskegel eine geordnete Struktur. Am distalen Ende, der Vorderkante des Wachstumskegels, in der Peripherie (P-Zone) ist der Wachstumskegel *in vitro* nur etwa 200 nm dick (Atilgan et al., 2005). Das polymerisierende Aktin unterstützt die Bildung der flächigen (Lamellipodien) und fadenförmigen Strukturen (Filopodien), mit denen der Wachstumskegel eine Breite von über 20 µm erkunden kann. Der Wachstumskegel lässt sich morphologisch in drei Bereiche einteilen. Die Übergangszone (T-Zone) trennt die Peripherie von der zentralen Zone (Z-Zone) des Wachstumskegels. Hinter der Z-Zone komprimiert und verjüngt sich der Wachstumskegel auf die Breite des Axons (siehe Abbildung 2, Abbildung 13, Abbildung 14). Der Wachstumskegel erkundet seine Umgebung – zieht sich bei repulsiven Signalen zurück und wächst bei attraktiven Signalen voran –, bis er sein Zielgebiet erreicht hat. Im Zielgebiet kollabiert der Wachstumskegel und das Axon beginnt im Kontakt mit Zielzellen Synapsen auszubilden.

## 2.2 Wegfindung der RGZ-Axone bis zum Chiasma

Die Axone der RGZ stellen die Verbindung zwischen den letzten Zellen in der Verschaltung der Neuroretina und deren Zielgebieten im Gehirn her. Auf ihrem Weg bilden sie zunächst die OFS und erreichen den SNK. Um diesen ersten Abschnitt zu bewältigen, werden sie von einer Vielzahl Signalmoleküle geleitet.

Wachstumskegel nehmen die haptischen Eigenschaften ihrer Umgebung wahr und folgen Unebenheiten wie z.B. Kratzern im Substrat (Stepien et al., 1999). Diese Reaktionen werden über mechanosensitive Ionenkanäle in der Zellmembran des Wachstumskegels vermittelt. Der unspezifische Kationeneinstrom führt zum Umbau des Zytoskeletts und Rückzug des Wachstumskegels (Goswami et al., 2007; Shibasaki et al., 2010). Mit diesem Mechanismus sind Wachstumskegel auch ohne weitere Signalmoleküle in der Lage, sich zu orientieren. Sie ändern ihr Verhalten *in vitro* auf unterschiedlich festen Substraten (Flanagan et al., 2002).

Zelladhäsionsmoleküle, die zur Wegfindung und Faszikulierung der RGZ-Axone beitragen, befinden sich in der Plasmamembran von Soma, Axon und Wachstumskegel der RGZ (Avci et al., 2004; Pollerberg et al., 2013; Thelen et al., 2012; Zelina et al., 2005). Die Zelladhäsionsmoleküle zeigen sowohl eine *cis*-Interaktion (innerhalb der Plasmamembran der gleichen Zelle) als auch eine *trans*-Interaktion (zwischen zwei Zellen). Sie lösen dabei zum Teil selbst Signale aus, wirken aber auch als Co-Rezeptoren und Modulatoren für andere, „klassische“ Rezeptoren wie den Typ-3-Semaphorin Rezeptor Neuropilin-1 oder rekrutieren selbst Co-Rezeptoren (Maness & Schachner, 2007; Pollerberg et al., 2013). Diese Signale führen dazu, dass Axone auf Axonen wachsen, sich zu Faszikeln (Bündeln) zusammenfassen und in den SNK eintauchen. Dieses Verhalten kann bereits durch die Inhibition einzelner Adhäsionsmolekül-Typen empfindlich gestört werden (Brittis et al., 1995; Pollerberg et al., 2013; Zelina et al., 2005).

Laminin ist ein Molekül der extrazellulären Matrix und befindet sich in hoher Konzentration in der Basallamina, die die OFS vom Glaskörper trennt. Laminin vermittelt Adhäsionskräfte und löst im Wachstumskegel durch seinen Rezeptor Integrin ein positives Signal aus, was das Auswachsen und Vorwärtswachstum von RGZ-Axonon anregt. Es ist neben den Zelladhäsionsmolekül-vermittelten Signalen (ALCAM, L1CAM etc.) ein wesentliches Signal, das die RGZ-Axone auf anderen RGZ-Axonon und an der Basallamina entlang zum SNK wachsen lässt. Das Integrin-Signal ist durch Modulation des cAMP-Spiegels in der Lage, die attraktive Wirkung des DCC Netrin Signals umzukehren (Höpker et al., 1999). Durch diese gemeinsam repulsive Wirkung lösen sich die Wachstumskegel am SNK von der Basallamina und tauchen in den SNK ein.

Netrin-1, ein diffusibles Signalmolekül wird am SNK von pax2-positiven Gliazellen produziert und wirkt attraktiv auf RGZ-Axone (Deiner et al., 1997). Durch das Netrin Signal finden die ersten RGZ den SNK und erhalten beim Eintauchen ein positives Signal. Netrin-1 aktiviert lokal die Translation von Aktin im Wachstumskegel, was ebenfalls die Wachstumsrichtung beeinflusst (Welshhans & Bassell, 2011). In k.o. Mäusen und Inhibitionsexperimenten mit Netrin-1 und dessen Rezeptor DCC zeigen sich Fehlnavigationen kommissuraler Axone (Serafini et al., 1996), eine Fehlnavigation im Thalamus (Braisted et al., 2000) und Hippocampus (Barallobre et al., 2000). Die Navigation am SNK ist im Netrin-1 k.o. ebenfalls betroffen, die Axone zeigen eine reduzierte Attraktion durch Netrin-1 und sie fehl navigieren am SNK in die Neuroretina (Deiner et al., 1997). Bei diesen Vorgängen ist nur die Navigation, nicht das Wachsen der Axone per se betroffen (Deiner et al., 1997). Moduliert wird das Netrin-Signal durch Unc-5. In einer Umgebung mit sehr hoher Netrin-Konzentration wirkt das Signal über Unc5 repulsiv auf Axone. Entfernen sich die Axone dann von der Netrinquelle, agiert Unc-5 gemeinsam mit DCC und sorgt für eine fortgesetzte Repulsion (Barallobre et al., 2005; Round & Stein, 2007; Sun et al., 2011). Vermittelt wird die attraktive Wirkung von Netrin-1 durch eine Typ-I Phosphorylierung von MAP1B (s.u.)

durch Gsk3 $\beta$  (Serin und Tyrosin) und Cdk5 (Del Río et al., 2004)

Diffusibles und membrangebundenes Semaphorin (3a bzw. 5a) werden am SNK und im Sehnerv von pax2-positiven Gliazellen produziert (Ko et al., 2012; Oster, 2003). Sie wirken repulsiv auf RGZ-Axone (Oster, 2003). Der Plexin/Neuropilin-Signalkomplex hemmt das attraktive Integrin-Signal und führt u.a. über die Kinase Gsk3 $\beta$  zum Kollaps des Wachstumskegels, wodurch das Axon repulsiert wird (Zhou et al., 2006). Sowohl das Netrin als auch das Semaphorinsignal sind entscheidend für die Navigation der RGZ-Axone am SNK. Die repulsive Wirkung von Semaphorin-3a wird durch reduzierte (Serin) Phosphorylierung von Gsk3 $\beta$  vermittelt (Eickholt, 2002).

Die Axone wachsen aus RGZ aus und werden von den Somata der Gliazellen abgestoßen und vom Laminin der Basallamina angezogen (Halfter et al., 1987; Stier & Schlosshauer, 1995). Die Axone wachsen in Richtung Basallamina aus der GZS, vollziehen dort eine erste Wendung und orientieren sich an den Endfüßen der radialen Glia und der Basalmembran (Holt, 1989). Die früh differenzierten RGZ werden von Netrin-1 aus dem benachbarten SNK veranlasst, ihr nächstes Wendemanöver zu vollziehen und in den SNK einzutauchen. Bevor die ersten RGZ-Axone auswachsen, ist die Basallamina mit repulsivem Chondroitinsulfatproteoglykan durchsetzt, das sich jedoch mit fortschreitendem Differenzieren der RGZ immer weiter auf die Peripherie beschränkt und dort fehlgeleitete Axone zurückweist (Brittis et al., 1992; Snow et al., 1991).

Später differenzierende Axone treffen auf bereits vorhandene Axone zentral gelegener RGZ und faszikulieren mit diesen durch Zelladhäsionssignale. Die RGZ-Axone wachsen entlang der vorhandenen Axone zum SNK. Dort bewirkt die repulsive Wirkung von Laminin und Netrin bzw. Laminin und Semaphorin, dass die Axone sich von der Basallamina lösen und in den SNK einwachsen. Im SNK finden die Axone nur Netrin vor. Eine hohe Konzentration von Netrin (10 bis 20  $\mu$ m von den produzierenden Zellen) führt

in der Nahwirkung dazu, dass positive Signale von Netrin über DCC von den negativen Signalen von Netrin über Unc5 überspielt werden. Die Axone werden von der Netrinquelle im SNK abgestoßen und wachsen in den Sehnerv. DCC (das Maus Homolog zu *C. elegans* Unc-40) und Unc5 halten danach als Komplex gemeinsam eine Repulsion durch Netrin aufrecht. Gleichzeitig werden die Axone von ebenfalls im SNK präsenten, den SNK und Sehnerv nach außen abgrenzenden Semaphorinen davon abgehalten, den Sehnerv wieder zu verlassen. Die Semaphorine leiten die Axone im Sehnerv bis zum nächsten Navigationspunkt, dem *Chiasma opticum*, an dem sich die Sehnerven beider Augen kreuzen.

### 3 Zytoskelett des Wachstumskegels

#### 3.1 Mikrofilamente

Die drei grundlegenden Zytoskelettstrukturen werden nach der Dicke ihrer Filamente eingeteilt. Mikrofilamente sind die dünnsten der drei Zytoskelettkomponenten (6–7 nm). Globuläres Aktin (G-Aktin) hat mit 375 Aminosäuren ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa und ist 4 x 6,5 nm groß. Es wird in der Zelle zu Filamenten (F-Aktin) als Doppelstrang polymerisiert. F-Aktin ist ein Doppelfilament, das alle 72 nm einmal um sich gedreht ist. Es ist polarisiert, das heißt, es hat eine Richtung, da sich am spitzen Ende (*pointed end*) immer die Subdomänen 3 und 4 des G-Aktin befinden und am gezackten Ende (*barbed end*) immer die Subdomänen 1 und 2 stehen. Bei der Polymerisation von Aktin wird G-Aktin mit gebundenem Guanosintriphosphat (GTP) an das Filament gebunden, nach durchschnittlich 2 Sekunden wird dies zu Guanosindiphosphat (GDP) umgesetzt. Das spitze Ende wird auch minus-Ende genannt, da hier meist eine Netto-Depolymerisation erfolgt, während am gezackten Ende, das auch Plus-Ende genannt wird, eine Polymerisation frischen G-Aktins mit GTP stattfindet.

Im kortikalen Zytoskelett gibt F-Aktin den Axonen – gemeinsam mit anderen Proteinen wie Spektrinen – ein Grundgerüst. Dieses Gerüst gibt dem Axon Form, ermöglicht und reguliert Adhäsion durch Verankerung der intrazellulären Teile der Zelladhäsionsmoleküle (Pollerberg et al., 2013). F-Aktin durchzieht das Axon und den Wachstumskegel und spielt durch seine Polarität bei Transportvorgängen eine Rolle (Kapitein & Hoogenraad, 2011). F-Aktin erzeugt – gemeinsam mit den Motorproteinen der Myosinklasse und Adapterproteinen – eine Kopplung an Adhäsionsmoleküle. Diese Kopplung erlaubt den Aufbau von Kräften gegenüber dem Substrat und spielt durch seine Polymerisation an der Vorderkante eine wichtige Rolle (Jay, 2000).

### 3.2 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind die Zytoskelettstruktur mittleren Durchmessers (10 nm). Intermediärfilamente sind nach Funktion und Struktur in 5 Klassen eingeteilt. Die Klasse-4-Intermediärfilamente werden als Neurofilamente bezeichnet, da sie nur in neuronalen Zellen vorkommen. Die Neurofilamente unterteilen sich nach Molekulargewicht in leichtes (NF-L; ca. 70 kDa), mittleres (NF-M; ca. 150 kDa) und schweres (NF-H; ca. 200 kDa) Neurofilament. Weitere Neurofilamente sind Nestin und Internexin. Neurofilamente bestehen aus mehrfach ineinander verdrillten Strukturen und lagern sich zu verdrillten Polymeren zusammen. Dies verleiht ihnen (und damit den Axonen) enorme Elastizität. Der Durchmesser von Axonen ist ebenfalls von Neurofilamenten geregelt (Yuan et al., 2012). Neurofilamente erreichen durch axonalen Transport den Wachstumskegel, werden jedoch aus diesem wieder abtransportiert (Uchida & Brown, 2004) Im Wachstumskegel selbst spielen sie keine beschriebene Rolle.

### 3.3 Mikrotubuli

Das dritte Element stellen die Mikrotubuli dar. Tubulin bildet den Grundbaustein der Mikrotubuli und hat mit 450 Aminosäuren ein apparentes Molekulargewicht von etwa 55 kDa. Es gibt alpha-, beta-, gamma-, delta-, epsilon- und zeta-Tubuline. In eukaryotischen Zellen – so auch im Wachstumskegel – findet man als Bausteine der Mikrotubuli alpha- und beta-Tubulin in Form von Heterodimeren von 4,6 x 8,0 x 6,5 nm Größe. Gamma-Tubulin spielt bei der Polymerisation neuer Mikrotubuli im Axon eine Rolle als Polymerisationsinitiator im Gamma-Tubulin Ringkomplex. Wie auch F-Aktin sind Mikrotubuli polarisiert. Sie besitzen ein minus-Ende, an dem die Tubulineinheiten GDP gebunden haben und netto depolymerisieren, sowie ein Plus-Ende, an dem frische Tubulindimere mit gebundenem GTP netto polymerisieren. Während in Dendriten beide Orientierungen von Mikrotubuli vorkommen, befindet sich ca. 96% der axonalen Mikrotubuli in einer Orientierung, bei der das Plus-Ende zum Wachstumskegel zeigt (Heidemann

et al., 1981). Daher sind auch die Mikrotubuli, die den Wachstumskegel erkunden, mit ihrem Plus-Ende in Wachstumsrichtung orientiert. Als zweite polarisierte Komponente sind Mikrotubuli für den Transport in der Zelle wichtig (Kapitein & Hoogenraad, 2011). Die Tubulindimere aus je einem  $\alpha$ -Tubulin und einem  $\beta$ -Tubulin polymerisieren zu Hohlzylindern aus 13 Protofilamenten von 24 nm Durchmesser und 12 nm lichter Weite. Der Typ 3 von  $\beta$ -Tubulin ( $\beta$ 3-Tubulin) ist neuronensexklusiv und kann als Marker verwendet werden.

Mikrotubuli und der Transport auf den Mikrotubuli wird in Axon und Wachstumskegel (neben den MAPs, s.u.) durch post-translationale Modifikation der Tubulinuntereinheiten reguliert. Über längere Zeit stabile Mikrotubuli werden zunächst de-tyrosiniert, was sie weniger anfällig gegen depolymerisierende Motorproteine (z.B. das Kinesin-verwandte MCAK) macht. Anschließend werden stabile Mikrotubuli acetyliert. Die Modifikationen sind reversibel. Weitere Modifikationen sind (poly-)Glutamylation, (poly-)Glycylation, Palmitoylierung und Phosphorylierung (Janke & Bulinski, 2011). Die Modifikationen beeinflussen das Verhalten von Motorproteinen und MAPs.

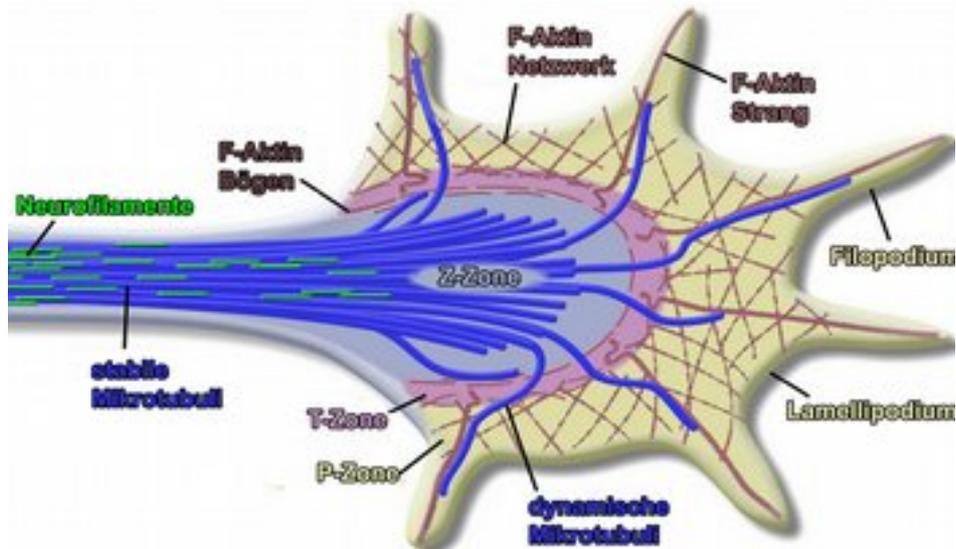
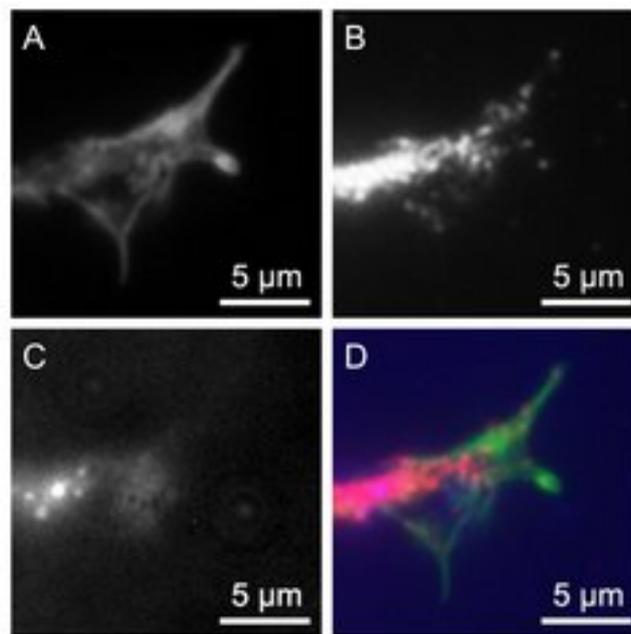


Abbildung 2: Zytoskelett eines Maus RGZ-Wachstumskegels auf Laminin-Substrat und schematische Darstellung. Das F-Aktin Zytoskelett (A, D grün) bildet flächige Lamellipodien und fadenförmige Filopodien aus und umfasst als kortikales Skelett Wachstumskegel und Axon. Es trennt in der T-Zone die Z-Zone von der P-Zone. Das Mikrotubuli-Zytoskelett ( $\beta$ 3-Tubulin, B, D rot) bildet dicht gepackte Bündel von Mikrotubuli im Axon und fächert in der zentralen Zonen des Wachstumskegels auf. Einzelne Mikrotubuli durchbrechen das Aktinskelett der Übergangsdomäne und erkunden die periphere Zone. Das Neurofilament-Skelett (NF-H, C, D blau) reicht in die zentrale Domäne des Wachstumskegels hinein, ist jedoch nur im Axon prominent vertreten. Schema angepasst aus (Lowery & Vactor, 2009).

### 3.4 Mikrotubuli-assoziierte Proteine

Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) sind eine heterogene Gruppe von Proteinen. Sie beeinflussen die Stabilität und Dynamik der Mikrotubuli und vermitteln zwischen Aktin bzw. Intermediärfilamenten und Mikrotubuli. Zu den klassischen – das heißt: zuerst entdeckten – MAPs zählt man die MAP1 und MAP2 Familien, MAP4 und Tau. Sie liegen in großen Mengen in den Zellen vor und binden direkt an Mikrotubuli. Die Gruppe der MAPs wächst jedoch immer weiter. MAPs im weiteren Sinne lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zum einen gibt es MAPs, die mit der polymerisierenden Spitze des Plus-Endes der Mikrotubuli (*plus-tip*) assoziieren, zum anderen solche, die mit der Seite assoziieren (*lattice*). Ein wichtiges Plus-Enden-MAP ist beispielsweise End-binding Protein (EB), das an das Plus-Ende der Mikrotubuli mit noch nicht hydrolysiertem GTP bindet. Es vermittelt anderen Plus-Enden Proteinen eine Bindung an den Mikrotubulus. Ein gängiges Seiten-bindendes MAP wäre Tau, das im Axon an die Mikrotubuli bindet und diese stabilisiert. Betrachtet man die Mikrotubuli stabilisierende Funktion, so kann man die Mtap6 Familie (STOPs), Doublecortin und APC zu den MAPs hinzuzählen. Neben den klassischen MAPs sind diese MAP1B in ihrer Funktion am ähnlichsten.

Die Übergänge zwischen den MAP-Kategorien sind jedoch fließend, wie *adenomatous polyposis coli* (APC) zeigt, das entlang von Mikrotubuli bindend stabilisierend wirkt oder am Plus-Ende zur Verankerung (*capturing*) der Mikrotubuli beitragen kann (Nakamura et al., 2001; Wen et al., 2004). Zahlreiche MAPs beeinflussen sich untereinander. Das Seiten-assoziierte MAP1B bindet – wenn es nicht an die Mikrotubuli gebunden ist – EB-Proteine und reguliert so deren Verfügbarkeit am Plus-Ende und die Mikrotubuli-Dynamik (Jiménez-Mateos et al., 2005a; Tortosa et al., 2013; Tymanskyj et al., 2012).

Bei der Wanderung von Zellen und der Bewegung des Wachstumskegels spielen eine Vielzahl weiterer MAPs und MAP-assoziiierter Proteine wie Clip,

Clasp, p150-glued, IQGAP, Tiam, Lis1 oder Stim1 eine Rolle (Akhmanova & Steinmetz, 2008, 2010; Kaverina & Straube, 2011).

### **3.5 MAP1B**

MAP1B findet sich im Soma, Axon und Wachstumskegel von Neuronen und in Schwannzellen. Die Typ-I phosphorylierte Form (s.u.) findet sich nur in der sich entwickelnden oder regenerierenden Zelle. Es ist eines der ersten MAPs in neuronalen Zellen, und unter den klassischen MAPs das früheste. MAP1B wird immer dort exprimiert, wo Zellen des Nervensystems oder Axone in der Entwicklung oder Regeneration in Bewegung sind (Gordon-Weeks & Fischer, 2000; Halpain & Dehmelt, 2006; Soares et al., 1998). Es ist auch als MAP5 oder unter seinem Drosophila Namen FUTSCH bekannt. MAP2 ist hingegen auf dendritische Prozesse und MAP1A auf den Adulten beschränkt.

Wie alle MAP1 Familienmitglieder wird MAP1B als Polyprotein translatiert und dann proteolytisch in eine leichte Kette (LC1) von 32 kDa und eine schwere Kette (MAP1B-HC) von ca. 300 kDa apparentem Molekulargewicht gespalten. MAP1B-HC interagiert auch mit den LC Varianten 2 und 3, die als MAP1A-LC (LC2) bzw. als unabhängiges Genprodukt (LC3) transkribiert und translatiert werden (Gordon-Weeks & Fischer, 2000; Langkopf et al., 1992). HC und LC1 verfügen über eine Mikrotubuli-bindende Domäne und die HC reguliert die Bindung der LC (Tögel et al., 1998). Die LC1 kann über Nitrosylierung reguliert werden, was für den Stickoxid (NO) vermittelten Kollaps des Wachstumskegels wichtig ist (Stroissnigg et al., 2007).

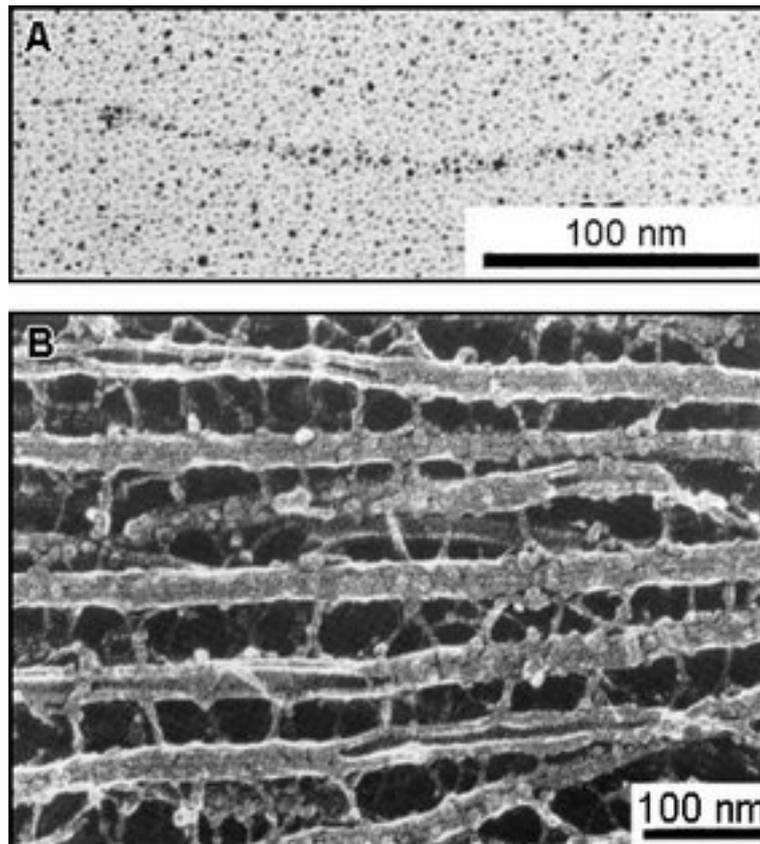


Abbildung 4: MAP1B ist ein filamentöses Protein von durchschnittlich 186 nm Länge mit einer runden Struktur an einem Ende (A). Es lagert sich an Mikrotubuli und bildet Brücken wie *in vitro* gezeigt (B). Die runde Struktur am Ende, die auch alleine an Mikrotubuli gebunden zu sehen ist, ist die LC1, der lange Teil die HC. Bilder übernommen aus (Sato-Yoshitake et al., 1989).



Abbildung 3: Aufbau der Domänen von MAP1B, die N-terminalen Aminosäuren 1-2000 bilden die schwere Kette (HC), von der die leichte Kette (LC1) proteolytisch abgespalten wird. Schwarze Balken unter dem Molekül markieren die MAP1-Homologiedomänen MH1, 2 und 3, die MAP1B mit MAP1 Familienmitgliedern gemeinsam hat. Weiterhin eingezeichnet sind die Mikrotubuli-bindenden Domänen (MB, rot) und die Aktin-bindenden Domänen auf der HC und LC (blau) sowie die jeweiligen Bindestellen von HC an LC (LCH bzw. HCB). LCB und AB befinden sich gemeinsam in der ersten Domäne am N-terminus der HC. Schema verändert nach (Riederer, 2007).

Die bekanntere Regulierung von MAP1B erfolgt durch Typ-I und Typ-II Phosphorylierung an mindestens 33 Phosphorylierungsstellen (Collins et al., 2005). Typ-II Phosphorylierung wird durch CKII und die Phosphatase PP1 reguliert (Ulloa et al., 1993a, 1993b). Typ-II phosphoryliertes MAP1B kommt im Adulten in Axonen und Dendriten vor (Gonzalez-Billault et al., 2004). Die Typ-I Phosphorylierung wird durch Gsk3 $\beta$  (Phosphatase: PP2A) (Lucas et al., 1998; Tymanskyj et al., 2012) und Cdk5 (Phosphatase: PP2B) (Kawauchi et al., 2005; Pigino et al., 1997) reguliert. Von Cdk5 Typ-I phosphoryliertes MAP1B ist im distalen Axon und Wachstumskegel angereichert und bindet Mikrotubuli. Es ist in Wendemanövern an Substratgrenzen auf den stabilisierten Teil des Wachstumskegels beschränkt. Eine lokale Laser-Zerstörung (mit *micro-Cromophore-Assisted-Laser-Inactivation*, micro-CALI) führt zu einer lokalen Destabilisierung des Wachstumskegels und einem Wegbewegen von der destabilisierten Seite (Mack, 2000). Der Aktivator von Cdk5 (p35) – nicht jedoch Cdk5 selbst – ist in Wendemanövern ebenfalls auf die stabilisierte Wachstumskegelseite beschränkt (Hahn et al., 2005).

Typ-I Phosphorylierung durch Gsk3 $\beta$  spielt eine Rolle beim Destabilisieren der Mikrotubuli (dynamisch halten). In Zelllinien, die mit MAP1B und Gsk3 $\beta$  transfiziert wurden, konnten weniger de-tyrosinierte (stabilisierte) Mikrotubuli beobachtet werden. Die Inhibition von Gsk3 $\beta$  führt zu einer erhöhten Wachstumskegelfläche, vermutlich durch mehr dynamische Mikrotubuli (Goold et al., 1999; Lucas et al., 1998). Die unterschiedlichen Wirkungen der Typ-I Phosphorylierung sind durch unterschiedliche Phosphorylierungsstellen auf MAP1B zu erklären. Weitere Kinasen von MAP1B sind c-Jun N-terminale Kinase JNK (Kawauchi et al., 2005) – die ebenfalls in wachsenden Axonen eine Rolle spielt (Barnat et al., 2010)– sowie cdc2, p38MAPK, ERK1 und PKG (Collins et al., 2005). In der adulten Maus findet sich phosphoryliertes MAP1B in Gehirnregionen hoher Transparenz und es wird in regenerierenden Axonen und Schwanzzellen gefunden (Bouquet et al., 2007; Nothias et al., 1996; Ramón-Cueto & Avila, 1997).

Partner	Funktion der Interaktion	Quelle
Mikrotubuli	Lokale Stabilisierung, Aufrechterhaltung der dynamischen Instabilität, Modulierung des Transports entlang Mikrotubuli, Verbinden von Mikrotubuli + Aktin	(Bouquet et al., 2007; Mack, 2000; Pedrotti & Islam, 1996; Tögel et al., 1998)
EB1 / EB3	Reduktion der Plus-Enden Polymerisation und der Mikrotubuli Stabilität	(Jiménez-Mateos et al., 2005a; Tortosa et al., 2013; Tymanskyj et al., 2012)
LANP	Förderung der Neuritogenese	(Opal, 2003)
Lis1	Reduktion der Lis1-Dynein Interaktion	(Jiménez-Mateos et al., 2005b)
Gigaxonin	Modulierung der LC1 Degradation, Verbinden von Mikrotubuli + Neurofilament	(Allen et al., 2005; Ding, 2002)
DAPK1	Stimulation der Autophagieaktivität	(Harrison et al., 2008)
Nbr1	Vermittlung des Kontakts des Autophagierezeptors mit Mikrotubuli	(Marchbank et al., 2012)
p53	Reduktion der p53 Transkriptionsaktivität	(Lee et al., 2008)
GRIP1	Modulierung der AMPA-Rezeptoraktivität	(Seog, 2004)
GABA <sub>c</sub>	Lokalisation und Modulierung von GABA <sub>c</sub>	(Billups et al., 2000; Hanley et al., 1999)
TIAM	Aktivierung von Rac1 / Aktinpolymerisation	(Henríquez et al., 2012)
MAG	Glia-Axon-Kommunikation	(Franzen et al., 2001)
Weitere prospektive direkte oder indirekte Interaktionspartner sind u.a. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> (GAPDH), <i>heat shock protein 8</i> (hsp8), Spektrin und clathrin Protein MKIAA0034 (Cueille et al., 2007).		

Tabelle 1: Interaktionspartner von MAP1B-HC und MAP1B-LC1. Nur Interaktionspartner auf Proteinebene sind aufgelistet.

### 3.6 MAP1B Knockdown und Überexpression

Neuronale Zellen, bei denen Gsk3 $\beta$  mit Lithium inhibiert wurde, zeigen eine Erhöhung der Anzahl stabiler, de-tyrosinierter Mikrotubuli. Dies wird als Erzeugung dynamisch instabiler Mikrotubuli durch Typ-I phosphoryliertes MAP1B gedeutet (Goold et al., 1999). Transfiziert man Zellen, die normalerweise kein MAP1B und kein Gsk3 $\beta$  besitzen (COS-7 Nierenzellen) mit beidem, wird MAP1B in den Zellen Typ-I phosphoryliert. Die Mikrotubuli werden in diesem Versuch durch MAP1B besser vor depolymerisierenden

Substanzen geschützt, gleichzeitig verliert die Zelle jedoch auch ihre stabilen, de-tyrosinierten Mikrotubuli (Goold et al., 1999). Entzieht man Neuronen durch eine Injektion von Antikörpern gegen MAP1B das MAP1B, zeigt sich keine Veränderung der axonalen Wachstumsgeschwindigkeit, der Menge an Mikrotubuli im Axon oder des De-Tyrosinierungsgrades (Tint et al., 2005).

Auch in Tau-k.o.-Mäusen – Tau gehört zu den klassischen MAPs und ist MAP1B sehr ähnlich – zeigte sich keine solche Wirkung des MAP1B-Entzugs. Der Entzug von MAP1B macht die Wachstumskegel jedoch sehr viel empfindlicher gegen Mikrotubuli-depolymerisierende Substanzen (Tint et al., 2005). In Neuronen des Hippocampus, denen durch RNAi-Transfektion akut die MAP1B-Expression ausgeschaltet wurde, zeigt sich ein reduziertes Axonwachstum und ein erhöhtes Verzweigen der Axone (*branching*). Die Mikrotubuli-Dynamik in diesem MAP1B-Knockdown zeigte eine reduzierte Geschwindigkeit der Mikrotubuli-Polymerisation im Axon, aber nicht im Wachstumskegel (Tymanskyj et al., 2012). MAP1B beschränkt das Verzweigungsverhalten und die Mikrotubuli-Dynamik. Durch Transfektion von COS-7-Zellen konnte gezeigt werden, dass MAP1B die Mikrotubuli-Dynamik durch Erhöhung der Polymerisationsgeschwindigkeit regelt (Tymanskyj et al., 2012). Nicht an Mikrotubuli gebundenes MAP1B bindet direkt an EB-Proteine. Überexpression von MAP1B reduziert die Anzahl des am Plus-Ende verfügbaren EB-Proteins und damit die Polymerisationsgeschwindigkeit und Stabilität der Mikrotubuli. Ein Knockdown von MAP1B erhöht die Anzahl der verfügbaren EB-Proteine am Plus-Ende und führt zu Überstabilisierung und Zurückbiegen der Mikrotubuli (Tortosa et al., 2013).

### **3.7 MAP1B Knockout**

Es wurden neben der in dieser Arbeit verwendeten Mauslinie drei weitere Mauslinien erzeugt, in dem Versuch, MAP1B in der Maus auszuschalten

(Edelmann et al., 1996; González-Billault et al., 2000; Takei et al., 1997). Keiner dieser drei Knockouts ist ein vollständiger Knockout (null Mutant), alle exprimieren noch eine Form von (unterschiedlich) beschnittenem MAP1B:

Exprimiert noch	Phänotyp	Quelle
N-terminales Fragment der HC	-/- lethal vor E10; +/- Ataxie, deformierte Augen, flach geformte Purkinjezellen, gestörte Schichtung Retina + Hippocampus	(Edelmann et al., 1996; Tögel et al., 1998)
C-terminales Fragment der HC	Verzögerte neuronale Entwicklung; Fehlen des <i>Corpus callosum</i>	(Kutschera et al., 1998; Takei et al., 1997)
Splice Isoform Exon 3; geringe Mengen volles MAP1B	-/- lethal P1; vergrößerter 3. Ventrikel; Cortex ½ Größe; Cortex Schichtung gestört; unterbrochenes <i>Corpus callosum</i> mit mehr Somata	(González-Billault et al., 2000; Kutschera et al., 1998)

Tabelle 2: Liste der MAP1B Knockouts, die noch beschnittene Formen von MAP1B exprimieren, was das Fehlen annähernd vollständig kompensieren oder dominant negative Auswirkungen haben kann.

Die Mauslinie eines der unvollständigen MAP1B-k.o. (Takei et al., 1997) (s.o.) wurde mit einer Tau k.o. Mauslinie (Harada et al., 1994) gekreuzt. Die MAP1B-k.o. und MAP1B-Tau-Doppel-k.o. Tiere zeigen ein um 20% reduziertes Gehirngewicht postnatal. Im MAP1B-k.o. fehlt das *Corpus callosum*. Das *Corpus callosum* verbindet die Hemisphären des Gehirns und ist eine Struktur, die nur Axone und keine Somata von Neuronen enthält. Im Doppel-k.o. mit Tau fehlen weitere axonale Gehirnstrukturen: *Commissura rostralis*, *Commissura fornicis* und das *Fasciculus medialis telencephali*. Die Form und Schichtung im Hippocampus ist abnormal, es kommt zu einer Aufspaltung der CA1 Region. Nur der Doppel-k.o. zeigt Axonwachstumsdefekte und eine reduzierte Wanderung neuronaler Zellen (Takei et al., 2000). Obwohl es sich dabei um einen unvollständigen MAP1B-k.o. handelt, zeigt die Untersuchung die wichtige Rolle von MAP1B und Tau und deren teilweise kompensatorische Funktion füreinander.

Die in dieser Arbeit untersuchte MAP1B-k.o. Mauslinie stellt den ersten vollständigen Knockout von MAP1B-HC und MAP1B-LC dar (Meixner et al., 2000). Soweit nicht gesondert erwähnt, handelt es sich bei allen im folgenden beschriebenen Befunden um Versuche mit homozygoten MAP1B-k.o. Tieren. Homozygote k.o. Mäuse führen beim Erkunden einer neuen Umgebung mehr kurze, lokale Bewegungen als lange Fortbewegungen aus (*Open Field Test*). Die Mäuse haben eine reduzierte Ausdauer und benötigen länger, um eine Plattform zu finden, zeigen jedoch das gleiche Lernverhalten wie w.t.-Mäuse (*Water Maze Test*). Viele adulte k.o.-Tiere starben unerwartet bei Labyrinthversuchen, überlebende Tiere zeigten jedoch das gleiche Lernverhalten wie w.t.-Tiere (*Multiple T-Maze Test*). Das Versterben der Tiere wird auf eine mutmaßliche Stressanfälligkeit der k.o.-Tiere zurückgeführt (Pangratz-Fuehrer et al., 2005). Die Amplitude der a-Welle im Elektro-Retinogramm ist bei k.o.-Tieren niedriger, was an der fehlenden Modulierung des GABA<sub>C</sub> Rezeptors durch MAP1B liegen kann (Pangratz-Fuehrer et al., 2005).

Es finden sich widersprüchliche Ergebnisse zur Rolle von MAP1B in der Autophagie und Apoptose: Zum einen gibt es Belege für eine aktive, fördernde Beteiligung von MAP1B: In Gigaxonin k.o.-Mäusen führt die akkumulierte MAP1B-LC1 zum Zelltod, was mit dem Knockdown der MAP1B-LC1 verhindert werden kann (Allen et al., 2005). In HEK293 und HCT116 Zellen löst das Binden der *death-activated protein kinase* (DAPK-1) an MAP1B Autophagie und das Abschnüren von apoptotischen Körperchen aus, der Knockdown von MAP1B verhindert dies (Harrison et al., 2008). Der Ubiquitinrezeptor Nbr-1 sammelt Proteine für den autophagischen Abbau und interagiert dafür MAP1B. MAP1B wird dabei nicht selbst abgebaut, sondern vermittelt den Kontakt zwischen Nbr-1 und dem Mikrotubuli-Skelett (Marchbank et al., 2012). Zum anderen ist eine vor Apoptose schützende Wirkung von MAP1B demonstriert: Durch den Amyloid- $\beta$ -induzierten Abbau von MAP1B in kortikalen Neuronen wird das Zytoskelett destabilisiert und Apoptose ausgelöst (Fifre, 2005). In SH-SY5Y Zellen (Neuroblastomzellen)

unterbindet die MAP1B-LC1 die p53-abhängige Transkriptionsaktivität und verhindert den Zytostatika-induzierten Zelltod (Lee et al., 2008).

MAP1B-k.o.-Mäusen fehlt das *Corpus callosum*, es finden sich jedoch fehlgeleitete, myelinisierte Bündel im Gehirn der Mäuse. Die Myelinschicht der Axone ist jedoch dünner in den k.o.-Tieren und die motorischen Nerven zeigen eine langsamere Leitungsgeschwindigkeit (Meixner et al., 2000). Die Schichtung der adulten Retina scheint unauffällig. Die Verteilung der mit MAP1B interagierenden GABA<sub>c</sub> Rezeptoren ist unverändert. Die klassischen MAPs der MAP2 Familie, MAP1A und Tau sind in k.o.-Tieren nicht erhöht exprimiert, weder in Neugeborenen noch in Adulten (Meixner et al., 2000).

Regenerierende Axone aus Hinterwurzelganglien (HWG) zeigen *in vitro* keine Veränderung der maximalen Neuritenlänge. Die HWG-Axone wachsen jedoch in Schlangenlinien und zeigen doppelt so häufig Verzweigungen. Diese Verzweigungen passieren sowohl bei der Aufspaltung des Wachstumskegels als auch bei der Bildung von Protrusionen entlang des Axons. Die Wachstumskegel von MAP1B-k.o. HWG-Axonon stoppen häufiger an Grenzen zu anderem Substrat, auf dem kein Wachstum möglich ist, als w.t.-Wachstumskegel. Die w.t.-Wachstumskegel vollziehen dort in den meisten Fällen ein Wendemanöver, das heißt, sie wachsen weiter (Bouquet, 2004). Die Proliferation von Schwanzzellen – die bei Aktivierung der Regeneration auch MAP1B exprimieren – ist nicht beeinträchtigt. Es wandern jedoch in einem Regenerationsversuch *in vitro* erheblich weniger k.o.-Schwanzzellen und diese mit einer niedrigeren Geschwindigkeit (Bouquet et al., 2007). MAP1B ist essentiell für den von Lysophosphatidsäure (LPA) induzierten Rückzug von Schwanzzellfortsätzen und HWG-Wachstumskegeln. LPA induziert im MAP1B-k.o. einen Abbau des Aktin-Zytoskeletts, aber kein Zurückbiegen der Mikrotubuli im Wachstumskegel (Bouquet et al., 2007).

### 3.8 Navigation des Wachstumskegels

Der Wachstumskegel ist eine sensible Struktur, die schon ein Wendemanöver einleiten kann, wenn einzelne Filopodien Kontakt mit einer Substratgrenze aufnehmen und Calciumsignale auslösen (Gomez, 2001). Solche Wendemanöver werden durch einen Ab- und Aufbau des Zytoskeletts vermittelt. Im Wachstumskegel polymerisiert Aktin u.a. an der Vorderkante, wo es – in Abhängigkeit von Aktin-assoziierten Proteinen (AAP) – Filopodien und Lamellipodien ausbildet. Es wird von der Vorderkante zurückgezogen (*retrograde flow*) und depolymerisiert (Gallo & Letourneau, 2004). Über die Kopplung von Adhäsionsmolekülen an den Aktin-Rückzug kann der Wachstumskegel Kraft für einen Vortrieb erzeugen (Jay, 2000). Polymerisation, Verzweigung und Depolymerisation werden über eine Vielzahl von AAP reguliert. Ein weiterer Regulator von Aktin ist die lokale Translation im Wachstumskegel (Sasaki et al., 2010).

Im Wachstumskegel polymerisieren Mikrotubuli von der zentralen Zone aus in die Peripherie des Wachstumskegels und depolymerisieren wieder (dynamische Instabilität). Dieses stochastische Verhalten wird von einer Vielzahl von MAPs reguliert. Bereiche des Wachstumskegels, in denen sich Mikrotubuli befinden, werden über den tubulinbasierten Transport mit Proteinen und mRNA versorgt. Bereiche des Wachstumskegels, in denen Mikrotubuli stabilisiert werden, z.B. durch Typ-I-phosphoryliertes MAP1B, werden daher mit mehr Material versorgt als Bereiche, in denen das Zytoskelett abgebaut wird. Glattes endoplasmatisches Retikulum, dessen Calciumausschüttung bei der Navigation des Wachstumskegels eine Rolle spielt, folgt mit seinen Ausstülpungen den Mikrotubuli (Shen & Demarex, 2012). Dies ist z.B. wichtig für eine Retraktion des Wachstumskegels unter Kontrolle des repulsiven Semaphorin-Signals (Mitchell et al., 2012). Die MAPs regeln durch ihre stabilisierende Wirkung die Verteilung der Mikrotubuli im Wachstumskegel.

Inaktiviert man die Oligomerisierungsdomäne von APC lokal im Wachstumskegel, wird das Zytoskelett auf der behandelten Seite destabilisiert und der Wachstumskegel wendet sich zur unbehandelten Seite (Koester et al., 2007). Wird hingegen die Domäne, welche die Mikrotubulibindung negativ reguliert, lokal inaktiviert, wird das Zytoskelett auf dieser Seite stabilisiert. In der Folge vergrößert der Wachstumskegel seine Fläche und wendet sich zur behandelten Seite hin (Koester et al., 2007). Wird die Typ-I phosphorylierte Form von MAP1B lokal im Wachstumskegel inaktiviert, führt dies zu einer Wende des Wachstumskegels hin zur Wachstumskegelseite, in der MAP1B noch stabilisierend wirken kann (Mack, 2000). Gemeinsam generieren Aktin und Mikrotubuli unter Kontrolle von AAPs und MAPs lokale Wachstums- und Rückzugsreaktionen des Wachstumskegels und bestimmen damit die Richtung des wachsenden Axons (Lowery & Vactor, 2009; Tojima et al., 2011; Vitriol & Zheng, 2012).

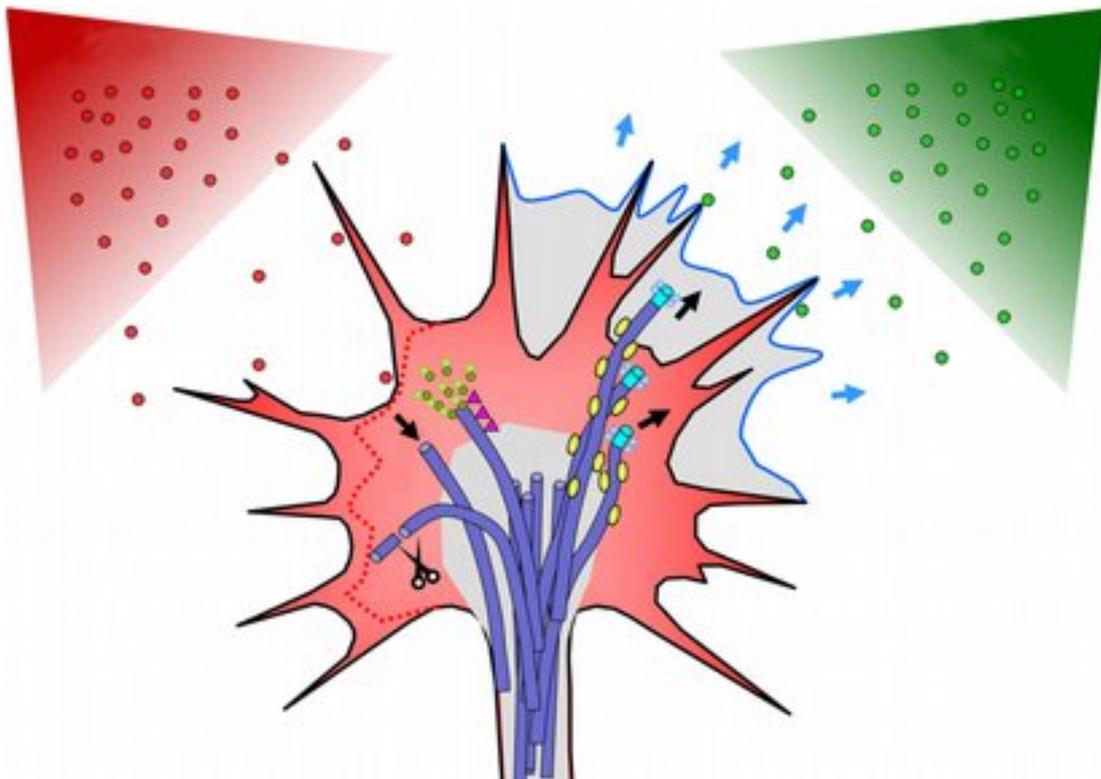


Abbildung 5: Attraktive Signale (grün) führen über eine Polymerisation (hellblaue Pfeile) von Aktin (rot, im Wachstumskegel) an der Vorderkante (blau) und ein Wachstum (schwarze Pfeile, rechts) der Mikrotubuli (dunkelblau) zu einem Navigieren des Wachstumskegels hin zum attraktiven Signal. MAPs an der Seite der Mikrotubuli (gelb) und am Plus-Ende (türkis) dirigieren das Mikrotubuliwachstum. Stofftransport auf die stabilisierte Seite des Wachstumskegels wird verstärkt, frische Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren werden auf die Oberfläche gebracht und zum Kraftaufbau an das Zytoskelett gekoppelt. Dies führt zu einem Vorwärtswachstum in diese Richtung. Repulsive Signale (rot) führen zu einer Depolymerisierung der Mikrotubuli in Dimere (grün/hellgrün), zum Zurückziehen der Mikrotubuli durch MAPs (pinke Dreiecke) und zum Zerteilen der Mikrotubuli durch Mikrotubuli zerteilende Proteine (Scheren). Die Seite des Wachstumskegels, auf der ein Abbau des Zytoskeletts erfolgt, entkoppelt die Adhäsionsstellen vom Zytoskelett und endocytisiert Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle. In der Folge zieht sich der Teil des Wachstumskegels zurück. Bild angepasst aus (Vitriol & Zheng, 2012).

#### **4 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von MAP1B bei der Embryonalentwicklung der Retina zu charakterisieren. Zahlreiche attraktive und repulsive Signale, die auf den Wachstumskegel wirken, tun dies unter anderem durch MAP1B. Es konnte gezeigt werden, dass MAP1B eine entscheidende Rolle bei Wendemanövern und beim Kollaps des Wachstumskegels *in vitro* und bei der Ausbildung axonaler Gehirnstrukturen *in vivo* spielt. In dieser Arbeit wurde daher die Entwicklung der Neuroretina und insbesondere der optischen Faserschicht untersucht, in der RGZ ihre Axone aussenden. Betrachtet wurden sowohl die intra-retinale Navigation und Faszikulierung der Axone als auch das Navigationsmanöver am Sehnervkopf. Des Weiteren wurde das Verhalten von RGZ-Axonon *in vitro* untersucht, um die *in vivo* Befunde unter definierten Bedingungen zu beleuchten.

## **II Material und Methoden**

### **1 Spezielle Labormaterialien**

Adhäsionsobjekträger, Histobond	Paul Marienfeld
Deckgläser, hochpräzise, 22 x 22 x 0,17 mm	Zeiss (Schott)
Dumont-Pinzetten	FST
Edelstahlbalken aus chirurgischem Stahl	Werkstatt des COS
Nitrozellulosemembran	Whatman
Kolbenhubpipetten, verschiedene Volumina	Gilson, Abimed
Silikon-Matrizen für Substratstreifen	F. Bonhoeffer
Zellkulturgefäße (Schalen, Flaschen)	Greiner, Nunc

## 2 Spezielle Chemikalien und Proteine

Agarose	Invitrogen
Agarose niedriger Schmelzpunkt (LMP)	Invitrogen
ecALCAM (ALCAM, extrazelluläre Domäne)	Eigenprod. / K. Thelen
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Barrier Marker (Roti-Liquid)	Roth
Baysilone Silikonpaste, hochviskos	Roth
BSA (Bovines Serumalbumin, Fraktion V)	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
Dil (lipophiler Axon-Tracer)	Sigma-Aldrich
DiO (lipophiler Axon-Tracer)	Sigma-Aldrich
DMEM/F-12 Medium	Gibco (Invitrogen)
EHS-Laminin von Maus	Invitrogen
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica (Jung)
GelRED (DNA Farbstoff)	VWR
Methylzellulose	Sigma-Aldrich
Mowiol 4-88 (Polyvinylalkohol)	Clariant
N2-Supplement	Gibco (Invitrogen)
Para-Formaldehyd (PFA)	Riedel de Haen
Pen/Strep	Gibco (Invitrogen)
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich
RedExtract-N-Amp Kit	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Worthington
Reinstwasser (DNase-/RNase-frei)	Sigma-Aldrich

### **3 Medien und Puffer**

#### **3.1 Hank's Puffer für Retinapräparation**

Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS) mit Phenolrot wird für die Präparation von Retina-Gesamtpräparaten und Explantaten verwendet. Für die Präparation embryonaler Mausretinae wird Hank's Puffer mit Magnesium (0,81 mM  $\text{MgSO}_4$ ) und Calcium (1,26 mM  $\text{CaCl}_2$ ) ergänzt, um den Gewebeverband zu erhalten.

#### **3.2 Mg-Ca-PBS für Proteinbeschichtungen**

Steril gefiltertes PBS mit Magnesium und Calcium (0,49 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,49 mM  $\text{CaCl}_2$ ) wird zum Verdünnen von Proteinlösungen, beim Beschichten von Deckgläschen mit Protein und beim Waschen der Deckgläschen verwendet.

#### **3.3 Medium für Kultur aus Mausembryo-Retina**

Als Medium für Kulturen von Retina-Gesamtpräparaten wird DMEM/F-12, das 2,5 mM L-Glutamin und 15,02 mM HEPES enthält, verwendet. Dieses Fertigmedium wird mit 1% (v/v)-N2 Supplement (Bottenstein & Sato, 1979) für die Kultur von neuronalen Primärzellen und mit 1% (v/v)-Pen/Strep zur Bekämpfung bakterieller Kontamination ergänzt.

Für Kulturen von Explantatstreifen werden zusätzlich 10% (v/v) einer 1% (g/v)-Stocklösung von Methyl-Zellulose zugegeben. Die Methyl-Zellulose verringert die Oberflächenspannung und erhöht leicht die Viskosität des Mediums, wodurch das Eintauchen von Explantatstreifen in das Medium und die Positionierung der Explantate erleichtert werden.

## 4 Markierungen und Färbungen

### 4.1 Immunhistochemische und cytochemische Färbungen

Es wurden folgende Primärantikörper verwendet:

Name	Antigen aus	Antikörper aus	Verdünnung	Hersteller
L1CAM	Maus	Kaninchen	1:1000	G.E. Pollerberg
Tuj-1 ( $\beta$ III-Tubulin)	Ratte	Maus	1:10000	Sigma-Aldrich
ALCAM	Huhn	Kaninchen	1:1000	G.E. Pollerberg

Tabelle 3: Primärantikörper

Mit den Primärantikörpern wird für 2 h (Explantate und Schnitte) bzw. 8 h (Retina-Gesamtpräparate) inkubiert.

Zur Fluoreszenzmarkierung der Primärantikörper werden folgende Sekundärantikörper verwendet:

Name	Antigen	Antigen aus	Antikörper aus	Konjugat	Hersteller
488 $\alpha$ Maus	IgG (H+L)	Maus	Ziege	Alexa-488	Sigma-Aldrich
546 $\alpha$ Maus	IgG (H+L)	Maus	Ziege	Alexa-546	Sigma-Aldrich
488 $\alpha$ Kan.	IgG (H+L)	Kaninchen	Ziege	Alexa-488	Sigma-Aldrich
546 $\alpha$ Kan.	IgG (H+L)	Kaninchen	Ziege	Alexa-546	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: Sekundärantikörper.

Die Sekundärantikörper werden nach Herstellerangabe in einer Verdünnung von 1:200 verwendet, mit Ausnahme der Färbung von Retina-Gesamtpräparaten, für die mit einer Verdünnung von 1:400 gearbeitet wurde.

### 4.2 Weitere Färbungen

Als Zellkernmarker wird 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Zur antero- und retrograden Färbung von Axonen werden die lipophilen Fluoreszenzfarbstoffe Dil bzw. DiO in Form von Kristallen in die optische Faserschicht (OFS) von Retina-Gesamtpräparaten gedrückt.

## 5 Spezielle Geräte

Kryostat CH30505	Leica
Eier-Brutschränke	Ehret
Gewebehacker	Bachofer
Gewebehackerklingen	Credo
Inkubatoren	Heraeus
Nucleofector	Amaxa
Sterilbänke	Heraeus, Babcock-BSH
Thermocycler	Biometra
X201T mit Stiftbedienung	Lenovo
Zentrifugen	Heraeus, Kendro, Sorvall

## **6 Mikroskope und Mikroskopsteuerung**

### **6.1 Epifluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskope Axiovert 200M und Axiovert 100TV**

Die Lebendbeobachtungen für die Bestimmung der Axon-Dynamik und Wachstumskegel-Dynamik in der intakten Retina und auf beschichtetem Substrat wird an den inversen Mikroskopen Zeiss Axiovert 200M mit AxioCam MrM rev.3 bzw. Zeiss Axiovert 100TV mit AxioCam durchgeführt. Die Mikroskope werden mit einem selbstgebauten PC und der Software AxioVision 4.9 (bzw. 4.8.1 am 100TV) gesteuert.

### **6.2 Kompaktfluoreszenzmikroskop BZ-9000**

Bildrasteraufnahmen von Retina-Gesamtpräparaten werden mit dem Keyence BZ-9000 Kompaktmikroskop in Epifluoreszenz aufgenommen. Das Mikroskop wird mit einem selbstgebauten PC und der Software Keyence BZ-II Viewer bzw. BZ-II Analyser gesteuert.

### **6.3 Multiphotonenmikroskop TriM Scope**

Aufnahmen von PFA-fixierten, ungeschnittenen Mausembryoaugen in 3D werden mit dem LaVision Biotec TriM Scope Multiphotonenmikroskop am Nikon Imaging Center (NIC) gemacht. Das TriM Scope wird mit einer DELL Workstation und der Software ImSpector gesteuert.

## 7 Software

### 7.1 Betriebssysteme

Für den Betrieb der Computer kam auf den Steuerungscomputern für ZEISS Mikroskope Windows XP SP3 und auf den übrigen Computern Windows 7 SP1 zum Einsatz. Der Lenovo X201T Laptop für das manuelle Verfolgen von Spuren in Mikroskopaufnahmen, für mobile Textverarbeitung und Tabellenkalkulation wurde mit Xubuntu 13.04 betrieben.

### 7.2 Bildaufbereitung und Quantifizierung

Fiji ([www.fiji.sc](http://www.fiji.sc)) ist ein internationales Softwarepaket, bestehend aus ImageJ 1.48b (W. Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda) und vielen weiteren, optionalen Komponenten (Plug-ins). Die Zusammenstellung von Fiji verändert sich von Version zu Version, die weiter unten erwähnten Plug-ins wurden von den Autorensseiten heruntergeladen und nach Anleitung installiert.

Rasterbilder von Retina-Gesamtpräparaten werden am BZ-9000 Computer mit der Funktion „Merge“ von BZ-Analyser II (Keyence) zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Bei sehr vielen Einzelaufnahmen kommt das „Merge Grid of Images“-Plug-in von Fiji zum Einsatz, da BZ-Analyser II nicht in der Lage ist, sehr große Bilderzahlen zu handhaben. Um den Axonverlauf in die Tiefe der Retina in nur einem Bild sichtbar zu machen, wird die Funktion „Full Focus“ von BZ-Analyser II verwendet.

Die weitere Bildaufbereitung und Quantifizierung erfolgt in Fiji: Der Hintergrund in Retinagesamtaufnahmen wird mit der Funktion „*ROI Background Subtraction*“ (zum Reduzieren von lokal unterschiedlichem Hintergrund) verringert: Axonfreie Regionen in den Bereichen der Retina mit niedriger Fluoreszenzintensität werden als Hintergrund markiert und verrechnet. Das neue Bild wird mit dem unbearbeiteten verglichen, um sicherzustellen, dass

durch die Reduktion keine kleinen Faszikel in dunklen Retinabereichen unterbrochen oder entfernt werden.



Abbildung 6: Bildaufbereitungs- und Analysewerkzeug Fiji

Messungen von Strecken, Flächen, Winkeln und Anzahlen wurden mit den entsprechenden Fiji-Standardwerkzeugen durchgeführt (siehe Abbildung 6, Werkzeuge 1–7 in der Werkzeugleiste). Als spezielles Plug-in zum Messen von Fluoreszenzintensitäten entlang von Kreisbögen wird „Oval Profile Plot“ (B. O’Connell, attbi.com) verwendet.

Für die zweidimensionale Visualisierung der Z-Achse in Bildstapeln („*3D/2D conversion via stack flattening*“), in denen der Verlauf von fehl Navigierenden Axonen am Sehnervkopf (SNK) zu sehen ist, wird das Fiji Plug-in „*Temporal Color Code*“ (Kota Miura) verwendet. Das Plug-in weist jedem Bild einer Bildserie eine Farbe zu und kodiert die Tiefe in der Z-Achse farblich. Zusätzlich werden Z-Stapel in kleinere Stapel unterteilt und mit dem Fiji Plug-in „*Extended Depth of Focus*“ (Forster et al., 2004) verrechnet. Das Plug-in bildet die jeweils scharfen Anteile der einzelnen Stapelbilder in einem einzigen Gesamtbild ab und macht so den Gesamtverlauf der Axone in XY-Ebene fokussiert sichtbar. Für das manuelle Verfolgen von Spuren des Wachstumskegels wird das Plug-in „*MtrackJ*“ (E. Meijering, Erasmus Medical Center Rotterdam) verwendet.

Aus den Messwerten abgeleitete Parameter und statistische Tests werden mit Calc aus dem Softwarepaket LibreOffice 4.1 und der Tabellenkalkulation Gnumeric berechnet. Für die Varianzanalyse wird in der Regel ein einfaktorierter ANOVA verwendet (entspricht für zwei Gruppen dem T-Test).

Abbildungen werden mit LibreOffice 4.1 Draw und Impress sowie mit Photoshop Creative Suite 2 (CS2) erstellt. Die Endfertigung der Abbildungen erfolgt in Photoshop CS2 und Illustrator CS2.

### **7.3 Textverarbeitung und Literaturverwaltung**

Für Textverarbeitung wurde Writer aus dem LibreOffice 4.1 Paket verwendet, Literaturverwaltung erfolgte mit Zotero 4.0 in Firefox und in LibreOffice 4.1.

### **7.4 Mauskolonieverwaltung**

Die Mauskolonieverwaltung und Auftragserteilung an die Tierpfleger an der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) wird mit Tierbase (Datenbankanwendung von 4D Software) durchgeführt.

## 8 Molekulargenetische Methoden

### 8.1 Genotypisierung der Mäuse und Mausembryonen

Zur Bestimmung des Genotyps der Embryonen wird parallel zur Präparation der Verdau eines Biopats durchgeführt. Zur Bestimmung des Genotyps adulter Tiere wird im Alter von 3 Wochen eine Schwanzbiopsie durchgeführt und das Biopat verdaut. Als schnellste Möglichkeit, den Verdau des Biopats und die PCR durchzuführen, erwies sich das REExtract-N-Amp Kit von Sigma-Aldrich. Das Kit enthält eine binäre Verdauungslösung, die direkt vor dem Verdau aktiviert wird, und einen PCR-Mastermix mit „hot-start“ Polymerase und BSA, zu dem direkt das verdaute Biopat hinzugegeben werden kann. Abweichend vom Herstellerprotokoll wird 10 min bei 56 °C verdaut und anschließend 10 min bei 95 °C hitzeinaktiviert. Kürzere Hitzeinaktivierung führt zu Störungen in der PCR, wodurch kein PCR-Produkt erzeugt wird.

Die anschließende Multiplex-PCR wurde mit zum Teil beschriebenen Primern durchgeführt (Bouquet, 2004). Der upstream Primer SG1 erzeugt bei vorhandenem w.t.-Allel mit dem in der MAP1B Sequenz bindenden downstream Primer SG4 ein 408 bp langes Produkt. Bei vorhandenem k.o.-Allel erzeugt SG1 mit dem – im un-deletierten Teil bindenden – downstream Primer SG6 über die Deletion hinweg ein ca. 80 bp längeres Produkt als SG1 und SG4.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anmerkung
1	94	120	Initialisierung HotStart Polymerase
2	94	30	
3	65	30	
4	72	30	Sprung nach Schritt 2 (29x)
5	4	unbegrenzt	Stopp der PCR, Aufbewahrung

Tabelle 5: PCR Programm zur Genotypisierung

Die folgenden drei Primer wurden bei Sigma-Aldrich bestellt und für die Genotypisierungs-PCR bei Mausembryonen und adulten Mäusen der MAP1B-k.o.-Linie eingesetzt:

<b>Name</b>	<b>Bestellung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Chromosom Bindestelle</b>
SG1	B2555-038 2007	<b>ATAGGTGCTGTGCCTCGCCTGA</b>	13: 7426446-7426425
SG4	B2555-039 2007	<b>TTAGGAAGGCAGAGGAGCAGCC</b>	13: 7426038-7426059
SG6	B2555-028 2007	<b>TTGCTTCCCCACTGAGCCTTCC</b>	13: 7407180-7407201

Tabelle 6: Primer für die Genotypisierungs PCR

Die PCR-Produkte werden in einem 2%-Agarosegel mit zugegebenem GelRED DNA-Fluoreszenzfarbstoff (1:20000) bei 125 V für 25 min aufgetrennt und anschließend dokumentiert.

## **9 Tiere**

### **9.1 Herkunft der k.o.-Mauslinie**

Die Mäuse (*Mus musculus* LINNAEUS) stammen aus einer MAP1B-k.o.-Linie mit C57BL/6 Hintergrund, die von F. Propst, Max F. Perutz Laboratories, Wien zur Verfügung gestellt wird (Meixner et al., 2000). Die Tiere werden als Linie 630 an der IBF der Universität Heidelberg gehalten.

### **9.2 Verpaarung der Mäuse**

Homozygote k.o.-Mäuse sind fruchtbar, aber Verpaarungen führen nur selten zu trächtigen Mäusen (Meixner et al., 2000). Daher wurden für alle Versuche heterozygote Tiere verpaart und der Genotyp der Embryonen während der Präparation bestimmt. Für alle Experimente wurden auf E14,5 zeitlich abgestimmte Mausverpaarungen verwendet, die Embryonen der Theiler-Stadien 22-23 ergaben.

### **9.3 Tötung der Mäuse zur Organentnahme**

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Um die Tötung zu erleichtern, wurden besonders unruhige Tiere durch minimale CO<sub>2</sub>- oder Isofluran-Einwirkung vor der zervikalen Dislokation beruhigt. Alle Prozeduren wurden in Übereinstimmung mit dem geltenden Tierschutzgesetz und in enger Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten des IBF durchgeführt.

## **10 Gefrierschnitte von Mausembryoaugen**

### **10.1 Herstellung der Gefrierschnitte**

Köpfe von Mausembryonen werden in 4% PFA für 24 h fixiert. Danach werden die Köpfe mit 4% PFA und 11% Saccharose und dann 25% Saccharose entwässert, bis sie nicht mehr aufschwimmen. Die entwässerten Köpfe werden auf einem Filterpapier in Einbettmedium für Gefrierschnitte orientiert und eingebettet. Anschließend wird von den Präparaten mit Hilfe eines Kryostaten Coronalschnitte (12  $\mu\text{m}$ ) angefertigt, diese auf Adhäsionsobjektträger aufgenommen und vor der Färbung mit (hydrophobem) „*Barrier Marker*“ umrandet.

### **10.2 Färbung der Gefrierschnitte**

Die Färbung der Kryostatschnitte werden nach publiziertem Standardprotokoll durchgeführt (Harlow & Lane, 1999). Kryostatschnitte werden jedoch mit TBS gewaschen und vor der Zugabe des Primärantikörpers eine Stunde mit 1% BSA, 2% Goat Serum, 0,3M Glycin und 0,3% Triton X100 in PBS behandelt, um unspezifischen Hintergrund zu reduzieren und verbleibende Aldehyde zu neutralisieren. Bei der Färbung verblieben sowohl die Primär- als auch die Sekundärantikörper 2 h auf den Schnitten. Abschließend wurde eine DAPI-Färbung und 3 Waschschrte mit TBS durchgeführt.

## 11 Retina-Gesamtpräparaten

### 11.1 Präparation der Mausretina

Der durch zervikale Dislokation getöteten, trächtigen Maus wird der Uterus entnommen und dieser mit Hank's Puffer abgespült, um Kontaminationen zu reduzieren. Die Embryonen werden dem Uterus in einer Präparationsschale entnommen, einzeln in eine weitere Präparationsschale mit Hank's Puffer überführt und dort durch Dekapitation getötet. Der Hank's Puffer, der in den nachfolgenden Schritten verwendet wird, ist für die Präparation mit Magnesium und Calcium modifiziert (siehe 3.1). Die Köpfe werden in eine 24-Mulden-Platte mit je 1 ml Hank's Puffer überführt und bis zur Präparation (max. 2 h) im Kühlschrank (8 °C) aufbewahrt.

Im Falle einer Verpaarung von MAP1B-heterozygoten Elterntieren wird den Embryonen zusätzlich eine Extremität als Biopat für die Genotypisierung abgetrennt, die verbleibenden Embryorümpfe werden einzeln in Röhrchen verpackt und bei -30 °C eingefroren, um ggf. erneut eine Genotypisierung durchzuführen und Gewebe für eventuelle weitere Versuche zu bevorraten.

Retina-Gesamtpräparate werden hergestellt wie für Huhnembryo beschrieben (Halfter et al., 1983), mit folgenden Abweichungen vom Protokoll: Die Präparation erfolgt in einer Schale, deren Boden mit 2% Agarose bedeckt ist (zur Schonung und Reinigung der Werkzeuge und zum Immobilisieren der Köpfe). Die Augen von E14,5 Embryonen werden noch im Kopf durch einen kleinen Einschnitt in der Peripherie mit einer Pinzette zur Orientierung der Präparate nasal markiert, da bei der Maus keine Fissur mehr sichtbar ist. Die Augen werden einschließlich des proximalen optischen Nerven entnommen (um den SNK nicht zu beschädigen), von Pigmentepithel, Glaskörper und Blutgefäßen befreit und auf einer Nitrozellulosemembran flach ausgebreitet. Anschließend wurden die Präparate für die Lebendbeobachtung im Gesamtpräparat, zur Erzeugung fixierter Präparate oder von Explantat-Streifen weiterverarbeitet.

### **11.2 Sichtbarmachen von RGZ-Axonon in Retina-Gesamtpräparaten**

Die Gesamtpräparate werden bei Raumtemperatur in 4%-PFA-Lösung 60 min fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung der Retina-Gesamtpräparate erfolgt nach für Huhnretina publizierter Standardmethode (Avci, 2005). Abweichend von dieser Methode wird vor Zugabe des Primärantikörpers (L1CAM; 1:1000) zur Visualisierung der Axone mit 2% BSA in PBS für 1 h blockiert. Der Primärantikörper verbleibt 8 h auf dem Präparat, wird heruntergewaschen und anschließend 15 min mit 4% PFA in PBS zwischenfixiert. Die Präparate werden dreimal gewaschen und vor der Zugabe des fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpers (546αKan.; 1:400) erneut 1 h mit 2% BSA in PBS blockiert. Der Sekundärantikörper bleibt 2 h auf den Präparaten. Während des ersten von vier Waschschriffen werden die Zellkerne der Präparate mit DAPI gefärbt, um den axonfreien Bereich in der Retinaperipherie besser sichtbar zu machen. Die fertigen Präparate wurden unter einem Deckglas in PBS eingebettet und mit Nagellack versiegelt, um sie möglichst schnell mikroskopieren zu können, da DiO sich mit der Zeit unspezifisch über die gesamte Retina verteilt.

Eine Axonfärbung mit Tuj-1 konnte nicht durchgeführt werden, da das zur intrazellulären Färbung nötige Auswaschen der Lipide – mit Triton X-100 bzw. Digitonin – die Markierung der Axone mit lipophilem DiO (siehe Abbildung 7) massiv reduziert und den Farbstoff unspezifisch über die Retina verteilt.

### **11.3 Sichtbarmachen des Teils der optischen Faserschicht, deren Axone den SNK bereits erreicht haben**

Um zusätzlich zur gesamten OFS den Teil der OFS sichtbar zu machen, deren Axone den SNK bereits erreicht haben, werden drei bis vier kleine DiO-Kristalle direkt in das Gebiet des SNK appliziert. Das Applizieren des Kristalls durch Stecken in den abgetrennten Stumpf des optischen Nerv erwies sich als unzureichend und führte nicht zu auswertbaren Färbungen. Sofort nach dem Stecken werden die Retina-Gesamtpräparate mit 4%

warmem PFA für 1 h fixiert. Die Präparate werden in PBS eingebettet und das Deckglas mit Nagellack versiegelt. Am folgenden Tag werden die Präparate mit dem Zeiss 200M Mikroskop, 10x Vergrößerung durch eine Rasteraufnahme dokumentiert und die Entfernungen von jeweils 10 peripheren Somata rund um den SNK mit Fiji gemessen (siehe 7.2). Für künftige Versuche dieser Art kann das neue 4x Objektiv des BZ-9000 Kompaktmikroskops schnell ausreichend aufgelöste Aufnahmen liefern.

### **11.4 Sichtbarmachen von lokalen Axon-Subpopulationen**

Um lokale Subpopulationen von Axonen in der OFS sichtbar zu machen, wurden kleine Kristalle der Fluoreszenzfarbstoffe DiO bzw. Dil verwendet. Der lipophile Carbocyanin-Kristall wird mit Hilfe eines (in Natronlauge auf eine Spitze von 40  $\mu\text{m}$  geätzten) Wolframdrahts mechanisch in die optische Faserschicht der Gesamtpräparate appliziert. Der Farbstoff diffundiert sofort anterograd und retrograd in der Plasmamembran bis zum Soma und bis zum Wachstumskegel der RGZ (Godement et al., 1987; Zelina et al., 2005). Die Präparate werden sofort nach dem Einbringen des Kristalls mit 4% PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert oder für die Lebendbeobachtung vorbereitet.

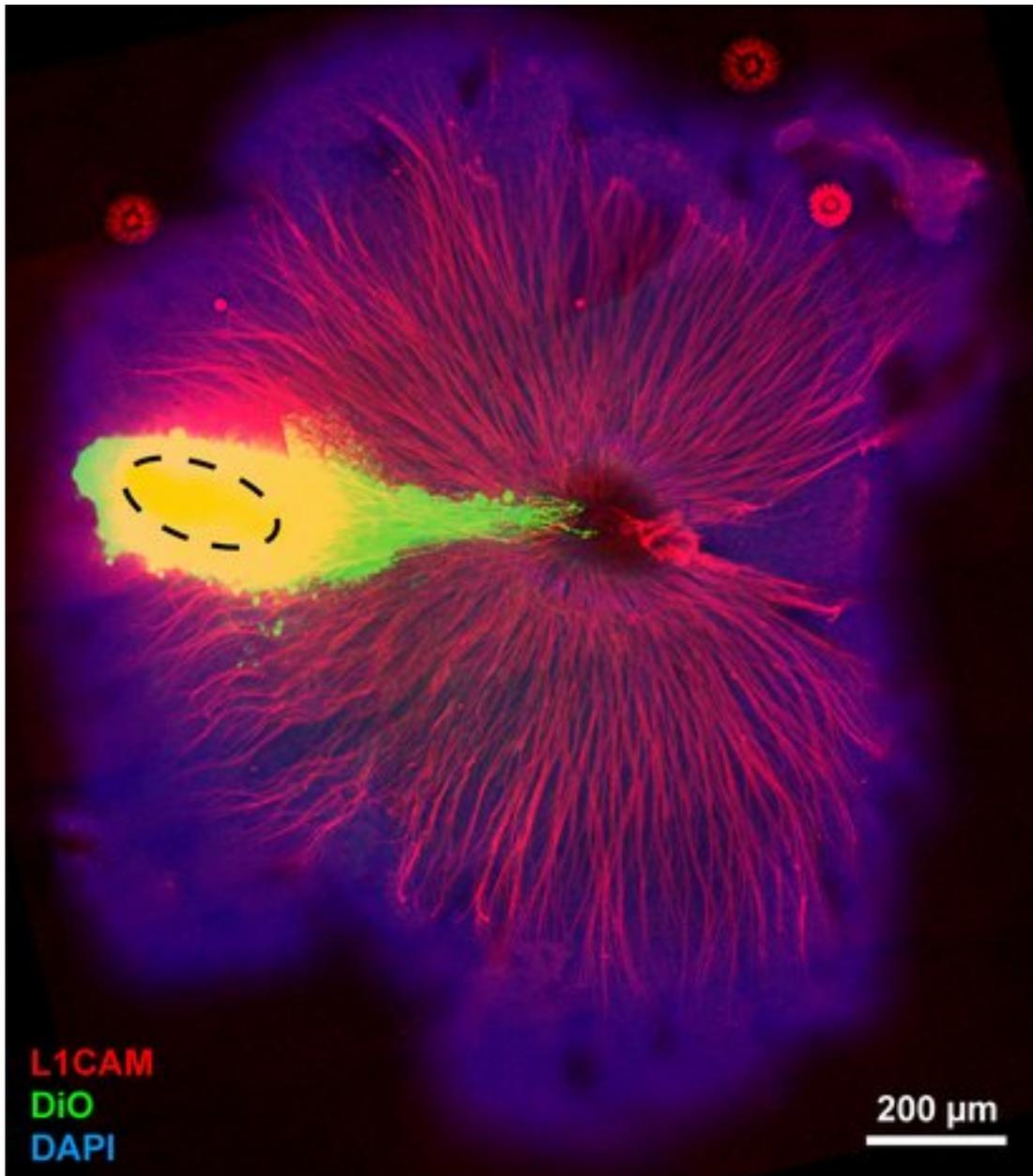


Abbildung 7: Retina-Gesamtpräparat. Axone mit L1CAM Immunfluoreszenz-Färbung (rot), Axon-Subpopulation DiO-Färbung (grün), applizierter Kristall (gestrichelte Linie) und Gesamtretina-Sichtbarmachung (DAPI).

## **12 Herstellung von Augenpräparaten und Multiphotonenmikroskopie**

### **12.1 Markierung von lokalen Axon-Subpopulationen in intakten Augen**

Um unbeschädigte Augen in 3D zu visualisieren und navigierende Axone am SNK exakt zu lokalisieren, werden ebenfalls Dil-Kristalle verwendet. In die Cornea der – noch im Kopf befindlichen – Augen wird mit einem spitz geätzten Wolframdraht eine Öffnung von der Größe der Pupille geschnitten. Ein Teil des Hank's Puffers wird aus der Schale abgegossen und in das Auge, dass aus der Flüssigkeit herausragt wird ein großer Dil-Kristall mit einem Wolframdraht eingebracht. Der Kristall wird mit dem Draht unter den Rand des Pigmentepithels und weiter nach unten-außen geschoben, bis er auf der peripheren Neuroretina ankommt (und von außen nicht mehr zu sehen ist). Der Kopf wird sofort in einem 2 ml Reagenzröhrchen mit 1,5 ml 4%-PFA bei Raumtemperatur fixiert. Am nächsten Tag wird das PFA durch 2 ml PBS ersetzt.

### **12.2 Präparieren und Einbetten der Augen**

Nach 7 Tagen wird der Kopf mit PBS gewaschen und die Neuroretinae mit einem möglichst großen Stück des optischen Nervs aus dem Kopf präpariert. Die Axonmarkierung war erfolgreich, wenn eine ohne Fluoreszenzlicht, mit dem bloßen Auge sichtbare Menge Dil im optischen Nerv zu erkennen ist. Vor dem Einbetten muß sehr gründlich mit einer Dumont #55 Pinzette das Pigmentepithel und der Kristall entfernt werden. Reste des Pigmentepithels heizen sich bei der Multiphotonenmikroskopie auf und zerstören das Präparat, wenn sie nicht vorsichtig, zeitintensiv mit dem Laser gebleicht werden. Im Praparat verbleibende Kristallstücke können den Mikroskopsensor überlasten und irreparabel beschädigen. Im letzten Präparationsschritt wird der Glaskörper vorsichtig mit den Blutgefäßen entfernt.

Vor der Mikroskopie wird das Auge in PBS mit 0,8% LMP Agarose (*low melting point*) eingebettet. Das Auge wird mit einer geschlossenen Pinzette in die gewünschte Position gebracht und vorsichtig mit weiterer Agarose bedeckt. Die Agarose sollte eine glatte Fläche bilden, aber über dem Auge so dünn wie möglich sein. Nach einer halben Stunde ist die Agarose geliert und die Schale wird mit PBS gefüllt und mit Parafilm verschlossen. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Proben zu verhindern, werden diese während des Gelierens mit Alufolie bedeckt und später in Alufolie verpackt zum Mikroskop transportiert.

### **12.3 Multiphotonenmikroskopie der Augenpräparate**

Zur Aufnahme der Bilder musste zunächst die optimale Anregungswellenlänge für Dil bei Multiphotonenanregung gefunden werden. Die Laserintensität des Titan:Saphir-Lasers mit optisch parametrischem Oszillator zur Ausweitung der verfügbaren Wellenlängen ist über die verfügbaren Wellenlängen nicht linear, was ein einfaches Berechnen der Wellenlänge erschwert. Die im Wellenlängensuchlauf (*scan*) ermittelte, optimale Anregungswellenlänge für Dil beträgt 950 nm. Die Präparate wurden mit dieser Wellenlänge angeregt und mit dem 16x LWD (langer Arbeitsabstand, long working distance) Objektiv mit einer numerischen Apertur von 0.8 in einer Auflösung von  $0,388 \times 0,388 \times 1 \mu\text{m}$  dokumentiert. Diese Auflösung reicht aus, einzelne Axone und dünne Faszikel zu visualisieren.

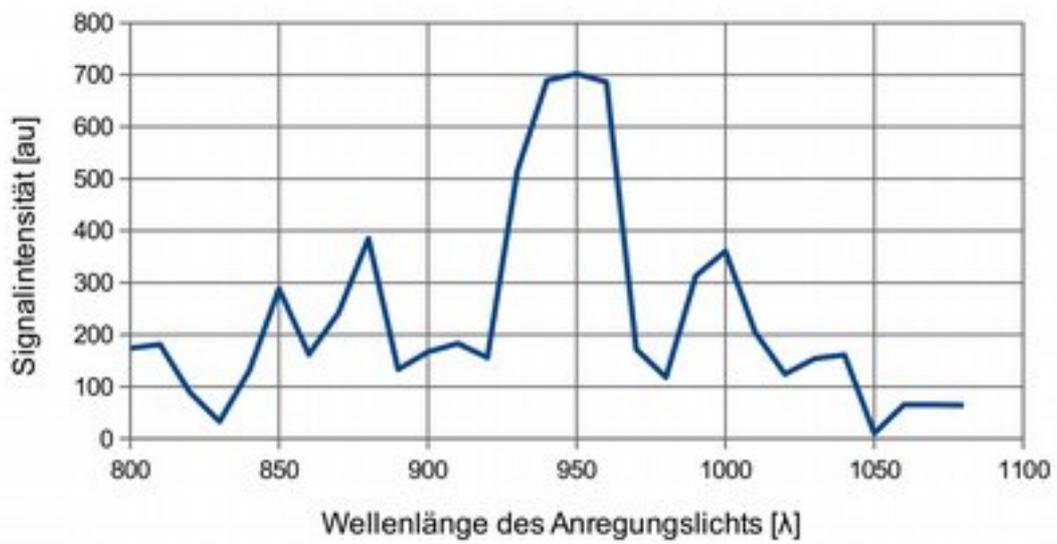


Abbildung 8: Probeanregung von Dil in der Retina zur Bestimmung der optimalen Anregungswellenlänge. Für die Aufnahmen verwendete Anregungswellenlänge: 950 nm.

## **13 Herstellung von biomimetischen ALCAM-Mikromustern**

### **13.1 Produktion von rekombinantem ALCAM**

Zur Herstellung von Substraten wird rekombinantes ALCAM verwendet und zusätzliches hergestellt wie beschrieben (Jährling, 2009). Das rekombinante Protein ecALCAM enthält die fünf extrazellulären Domänen von ALCAM und His-Markierungen zur Aufreinigung. Die Herstellung erfolgt in HEK-293 Zellen, die stabil mit pSec-tag2a-ecALCAM (extrazellulärer Teil ALCAM, 6x His-Tag, cMyc-Tag, Ampicillin und Zeozin Resistenz) transfiziert sind. Die Aufreinigung des Proteins erfolgt in einer Säule mit Nickel-NTA Agaroseperlen nach Standardmethode.

### **13.2 Erzeugung der biomimetischen Substratstreifen**

Substratstreifen auf Deckgläsern werden durch Injektion in Silikonmatrizen nach Standardmethode erzeugt (Vielmetter et al., 1990; Weschenfelder et al., 2013). Abweichend wird 3 µg/ml ecALCAM (in Mg-Ca-PBS) in die Kanäle injiziert und eine Stunde inkubiert. Als zweite Beschichtung wird 10 µg/ml Laminin in Mg-Ca-PBS homogen auf das gesamte Deckglas aufgebracht.

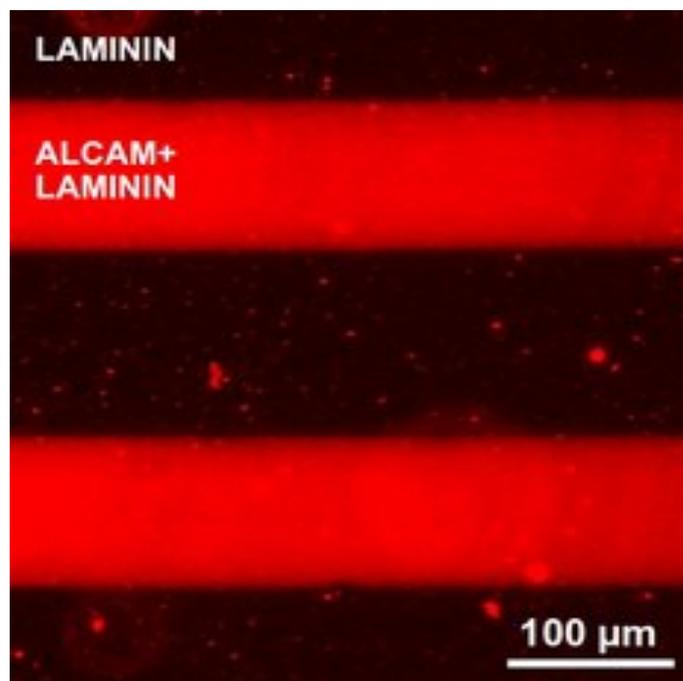


Abbildung 9: Biomimetisches Streifenmuster: 100  $\mu\text{m}$  breite Streifen werden auf Deckgläser mit 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ecALCAM beschichtet. Visualisierung durch ALCAM und 546 $\alpha$ Maus Antikörper. Maßstabsbalken 100  $\mu\text{m}$ .

## **14 Lebendbeobachtung von Axonen**

### **14.1 Aufnahme von Zeitrafferfilmen der Wachstumskegel**

Lebendbeobachtungen von Wachstumskegeln aus Explantatstreifen und in der intakten Retina werden an den Zeiss 200M und Zeiss 100TV Mikroskopen unter einer selbst gebauten Klimakammer durchgeführt (Zelina, 2005). An beiden Mikroskopen wird ein phasenkontrast-taugliches Plan-Apochromat 63x Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,4 verwendet.

Die Präparate werden in einer selbstgebauten Klimakammer mit Atmosphäre aus dem Inkubator versorgt (37 °C, 95% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub>); zur Verbesserung des Phasenkontrasts wird der Kunststoffdeckel der Klimakammer mit einer Öffnung versehen, die mit Silikonpaste und einem großen Deckglas verschlossen wird. Ein wärmeisolierendes Zelt umschließt das gesamte Mikroskop mit Ausnahme der Kamera und sorgt für homogene 37 °C.

### **14.2 Untersuchung des Wachstumskegel-Verhaltens auf definiertem Substrat**

Zur Untersuchung des Wachstumskegel-Verhaltens auf definiertem Substrat werden 300 µm breite Retina-Explantatstreifen aus Retina-Gesamtpräparaten (siehe Abbildung 7) gehackt und auf homogenem Substrat ausgelegt (Halfter et al., 1983). Die Explantate werden mit der Schnittkante auf der zentralen Retinaseite zur Mitte des Deckgläschens orientiert. Abweichend vom publizierten Protokoll werden die Explantate in Medium für die Kultur von Mausexplantaten (siehe 3.3) auf Deckgläschen, die mit 10 µg/ml Laminin beschichtet sind, ausgelegt und Axone auswachsen gelassen.

Für die Untersuchung des Wachstumskegel-Verhaltens werden Zeitrafferaufnahmen von 30 min Länge (6 Aufnahmen pro Minute) an den Mikro-

skopen Zeiss 100M und Zeiss 200TV angefertigt. Um die Beeinträchtigung der Wachstumskegel durch erhöhte Temperatur und Strahlungsschäden zu reduzieren, werden Ultraviolett, Blau, Rot und Infrarot aus dem Spektrum der Phasenkontrastbeleuchtung ausgefiltert.

### **14.3 Untersuchung des Wachstumskegel-Verhaltens in Retina-Gesamtpräparaten**

Die Lebendbeobachtung wird im gleichen Aufbau wie bereits beschrieben durchgeführt (siehe 14.2). Das Markieren und Filmen der Wachstumskegel im Präparat wird wie für Huhnretina beschrieben durchgeführt (Zelina, 2005; Zelina et al., 2005). Abweichend hiervon wird die Anzahl der Abstandshalter zwischen dem Deckglasboden der Lebendbeobachtungsschale und Präparat wegen der dünneren Mausretina von 2 auf 1 reduziert. DiO bzw. Dil werden ca. 600  $\mu\text{m}$  vom SNK appliziert, um RGZ zu markieren, deren Wachstumskegel den SNK noch nicht erreicht haben.

## 15 Quantifizierung und Auswertung

### 15.1 Faszikel Anzahl und Durchmesser in Retina-Gesamtpräparaten

In zusammengesetzten, hintergrundreduzierten Rasteraufnahmen von Retina-Gesamtpräparaten (siehe 7.2) wird entlang von Kreisen mit einem Radius von 300 bzw. 400  $\mu\text{m}$  um den SNK-Mittelpunkt die Fluoreszenzintensität mit dem Fiji Plug-in „*Oval Profile Plot*“ bestimmt. Die Anzahl der zu messenden Grauwerte entlang des Kreises wird errechnet, sodass für jeden Pixel auf dem Kreisbogen der Fluoreszenzintensitätswert gemessen:

$$\frac{300\mu\text{m} * 2 * \pi}{0,26642\mu\text{m}/\text{Pixel}} = 7075\text{Pixel}$$

7075 Messwerte werden für den Kreisbogen mit einem Radius von 300  $\mu\text{m}$  um den SNK-Mittelpunkt berechnet und gemessen bzw. 9433 Pixel für den 400  $\mu\text{m}$  Kreisbogen.

Zur Festlegung der Faszikeldurchmesser wurde der Abstand der Schnittpunkte der Intensitätslinie mit einer Linie, die dem Median der Fluoreszenzintensität entspricht, ermittelt. Um trotz Hintergrundreduktion noch vorhandene, subtile lokale Unterschiede in der Fluoreszenzintensität auszugleichen, wird der Median nicht global für die gesamte Retina, sondern lokal für jeden Pixel in einem Bereich von 75  $\mu\text{m}$  (37,5  $\mu\text{m}$  zu beiden Seiten) entlang des Kreisbogens ermittelt.

Die kleinsten Strukturen, die erkennbar sind, haben einen Durchmesser von 0,7  $\mu\text{m}$ , was der Dicke eines Axons entspricht. Bei detektierten Signalen < 0,7  $\mu\text{m}$  handelt es sich um Pixelfehler im Bild oder runde Ansammlungen von Sekundärantikörpern. Strukturen < 0,7  $\mu\text{m}$  werden aus der Auswertung entfernt. Die erhaltenen Faszikeldurchmesser werden in die Kategorien  $d \leq 2,5 \mu\text{m}$  (= dünn, bis zu 10 Axone),  $2,5 \mu\text{m} < d < 10 \mu\text{m}$  (= mittel) und  $d \geq 10 \mu\text{m}$  (= dick) eingeteilt und ihre Häufigkeit bestimmt.

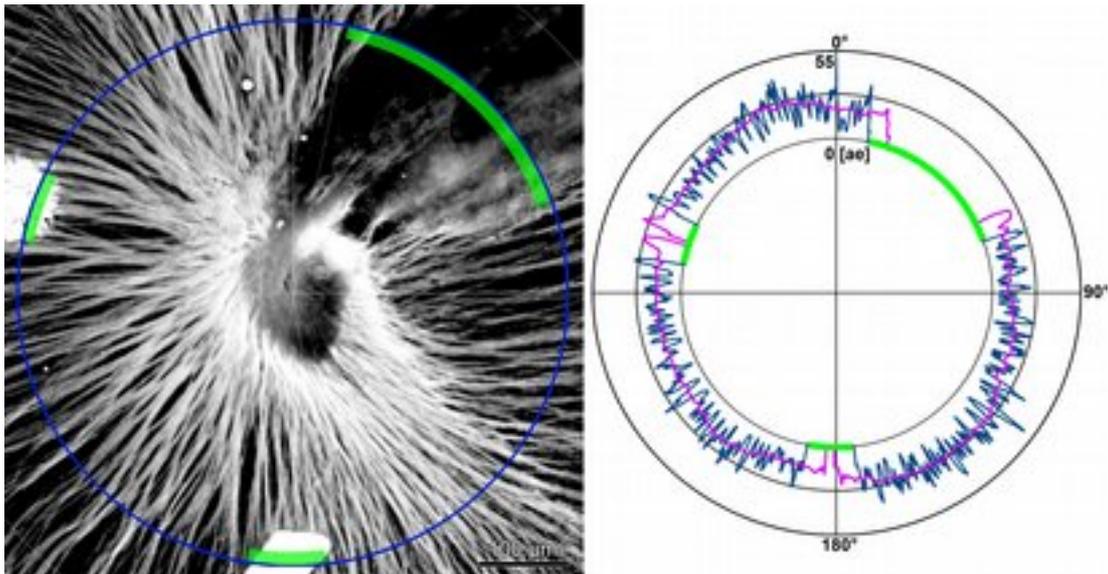


Abbildung 10: Entlang des Kreisbogens (blau, links) mit einem Radius von 300 µm um den SNK wird die Fluoreszenzintensität der L1CAM Färbung gemessen und in einem Radarplot visualisiert (blaue Linie, rechts). Bereiche auf dem Kreisbogen, die aufgrund von Beschädigungen oder Störungen durch DiO-Kristalle nicht ausgewertet werden können, werden aus den Messwerten entfernt (grüne Markierungen in beiden Darstellungen). Die Distanz zwischen zwei Schnittpunkten der – an den lokalen Median der Fluoreszenz (75 µm) angepassten – Messlinie (rot) mit dem Fluoreszenzintensitätsplot (blau) ergibt den Faszikeldurchmesser.

### 15.2 Defaszikulierung und Faszikulierung in Retina-Gesamtpräparaten

Die Anzahl der Defaszikulierungs- und Faszikulierungs-Ereignisse der Axonfaszikel werden in Retinae mit L1CAM-Färbung in einem Ringbereich mit einem Radius von 300 bis 400  $\mu\text{m}$  (ausgehend vom SNK-Mittelpunkt) manuell gezählt. Dünne Faszieln ( $d < 2,5 \mu\text{m}$ ) werden von den mittleren und dicken Faszieln getrennt erfasst und ausgewertet.

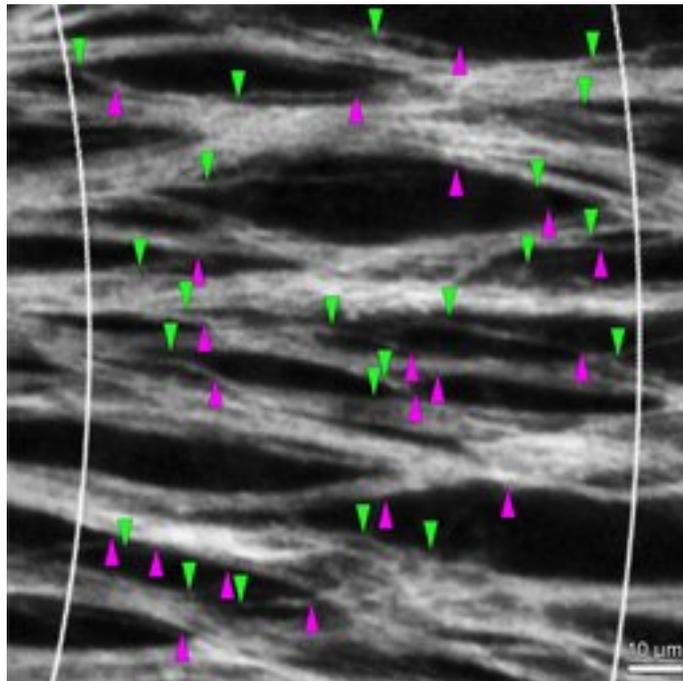


Abbildung 11: Detailaufnahme von L1CAM markierten Axonfaszieln, zwischen 300  $\mu\text{m}$  (linker Kreisbogen) und 400  $\mu\text{m}$  (rechter Kreisbogen) vom Mittelpunkt des SNK entfernt. Axone faszikulieren (grüne Pfeile nach unten) und defaszikulieren (magenta Pfeile nach oben) auf dem Weg von der peripheren Retina (rechte Seite, nicht im Bild) zum SNK (linke Seite, nicht im Bild). Ereignisse sind nur für niedrige Faszikeldurchmesser ( $d < 2,5 \mu\text{m}$ ) eingezeichnet.

### **15.3 Faszikelzwischenräume in Retina-Gesamtpräparaten**

Retinae wurden in GIMP mit dem Vordergrund-Auswahl-Werkzeug in einen „Faszikel-Bereich“ (weiß) und einen „Zwischenraum-Bereich“ (schwarz) getrennt, um ein Bild zu erhalten, das nur die Faszikel-Zwischenräume als schwarze Flächen enthält. Die periphere Retina über 300  $\mu\text{m}$  und das 150- $\mu\text{m}$ -Gebiet um den SNK ohne Zwischenräume wurden aus dem Rohbild entfernt. Anschließend wurden die verbliebenen Zwischenräume mit dem Fiji Plug-in „*Particle Analyzer*“ gezählt und ihre Fläche vermessen. Mit dem komplementären Bild lassen sich die von Faszikeln bedeckten Bereiche darstellen und als Fläche quantifizieren.

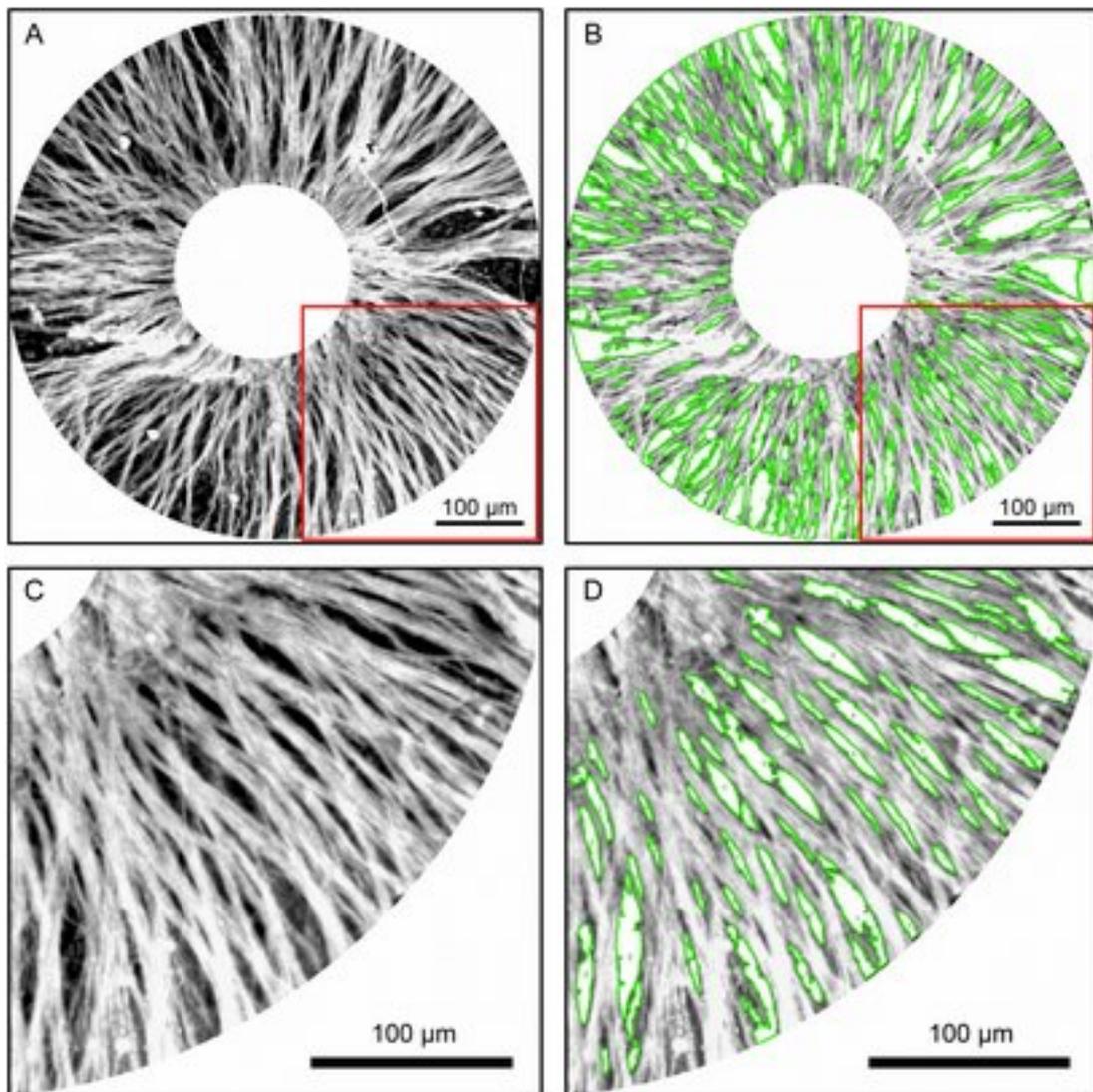


Abbildung 12: Lineare Kontrastierung und Quantifizierung der OFS-Zwischenräume: Rohbild des L1CAM fluoreszenzmarkierten OFS (A), nicht auswertbarer Kreis (Radius 100 µm) um den Mittelpunkt des SNK und Bereich außerhalb des 300-µm-Radius sind entfernt. Überlagerung des Rohbildes mit den in GIMP herausgearbeiteten Bereichen (B). Detailansicht eines Ausschnitts (B, grün) der mit Fiji analysierten Partikel (C). Maßstabsbalken 100 µm.

#### **15.4 Wachstumsebene von Axon-Subpopulationen in Retina-Gesamtpräparaten**

Von Retina-Gesamtpräparaten mit DiO-markierten Axon-Subpopulationen werden am SNK mit dem BZ-9000 Mikroskop Z-Stapel mit 0,7 bis 1,8  $\mu\text{m}$  Schrittweite erfasst. Die Aufnahmen beginnen in der Ebene der tiefsten in der Retina DiO-markierten Axone und enden mit den obersten Axonen, die in der OFS des Präparats markiert sind. Als Tiefe der fehlnavigierenden RGZ-Axone in der Retina wird der Abstand der letzten Bildebenen mit vollständig im Fokus befindlichen Axonen gewertet.

#### **15.5 Axon-Dynamik auf homogenem Substrat**

Zeitrafferaufnahmen von Wachstumskegeln auf Deckgläschen mit Laminin (siehe 14.2) werden durch Verfolgen der Spur (*track*) des Wachstumskegel-Halses analysiert. Der Wachstumskegel-Hals ist definiert als der Bereich, an dem der Wachstumskegel sich (ausgehend von der Wachstumskegelspitze) zum ersten Mal auf die doppelte Axonbreite verjüngt. Die zurückgelegte Strecke der Spur ergibt sich aus den aufsummierten Positionsänderungen, die Distanz aus der direkten Verbindung des Start- und Endpunktes der Spur. Aus den Koordinaten der Spur wurde mittels linearer Regression eine Wachstumsrichtung ermittelt. Abweichend von der Beschreibung (Thelen et al., 2012; Zelina et al., 2005) werden alle Punkte mittels Koordinatentransformation gedreht, damit die per Regression ermittelte Wachstumsrichtung der X-Achse des Koordinatensystems entspricht. Positionsänderungen in X-Achsen-Richtung werde als Vorwärtsbewegung, in Y-Achsen-Richtung als Seitwärtsbewegung gewertet. Bewegt sich der Wachstumskegel-Hals mindestens 0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  vorwärts, wird das Verhalten in dieser Minute als Vorwärtsphase gewertet, zieht er sich mindestens 0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  zurück, wird es als Rückwärtsphase gewertet. Minimale Bewegungen  $< 0,5 \mu\text{m}/\text{min}$  werden als Stoppphase gewertet. Die Anzahl der Phasen pro Stunde und die durchschnittliche Dauer der Phasen werde ermittelt. Die durchschnittlichen, minimalen und maximalen

Geschwindigkeiten in X- und Y-Achsen-Richtung werden zur vollständigen Charakterisierung der Dynamik getrennt nach Phasen ebenfalls ermittelt.

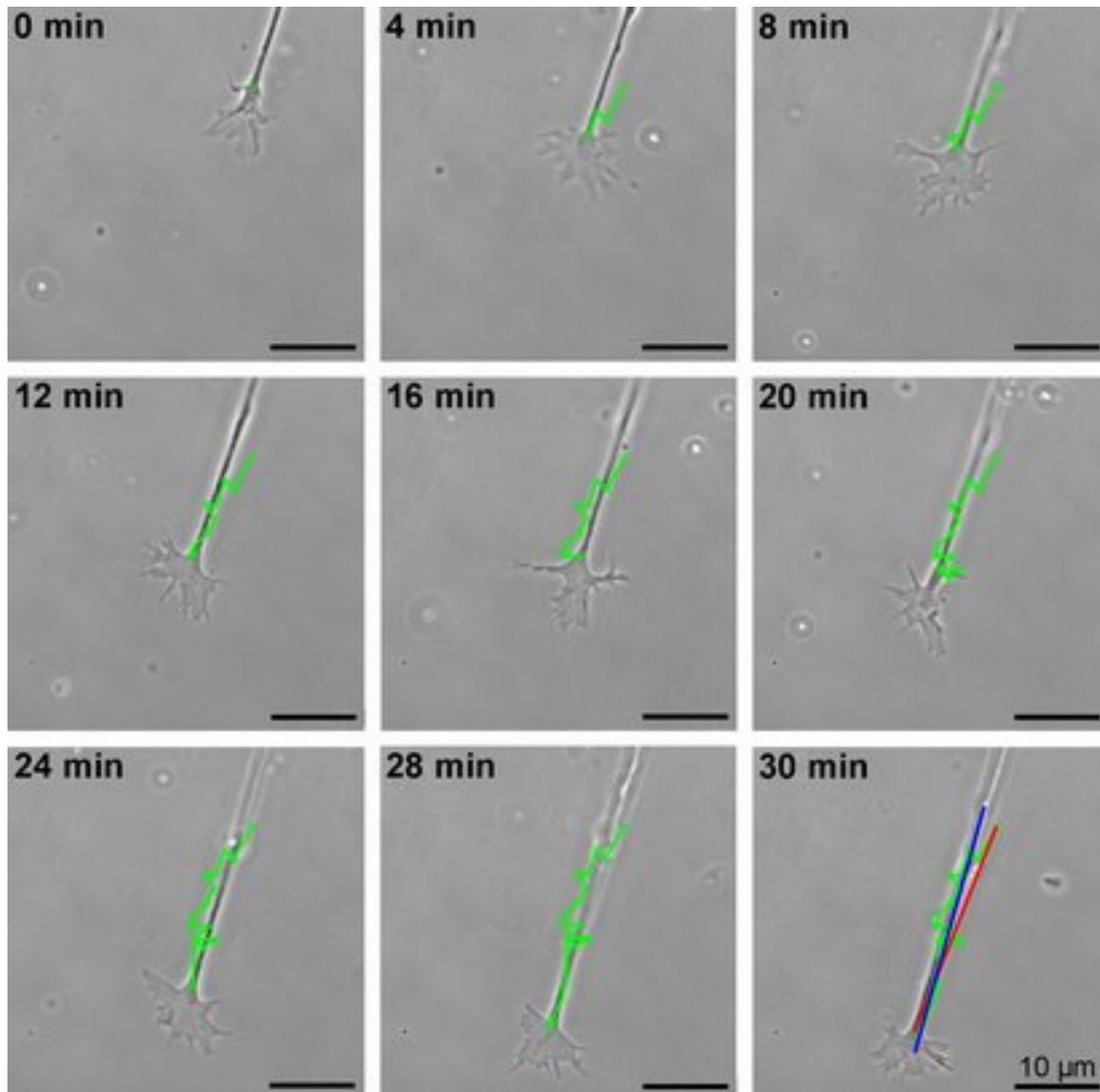


Abbildung 13: Axondynamik auf Laminin. Serienbild aus einer Zeitrafferaufnahme. Die Wachstumskegel-Spur (grün) mit minütlich festgestellter Position des Wachstumskegelhalses (letzter Punkt der Spur). Distanzlinie (rot) und Wachstumsrichtung (Ausgleichsgerade, blau) der Spur des Wachstumskegels sind im letzten Bild dargestellt.

### **15.6 Axon-Dynamik in Retina-Gesamtpräparaten**

Wachstumskegel im Retina-Gesamtpräparat sind schlank und torpedoförmig, der Wachstumskegel-Hals lässt sich nicht bestimmen, da die Wachstumskegel selten die doppelte Breite des Axons erreichen. Für die Bestimmung der Wachstumskegel-Dynamik in Retina-Gesamtpräparaten wird die vorderste Spitze des Axons mit dem Fiji-Plugin „*MtrackJ*“ verfolgt. Die übrige Auswertung erfolgt wie für Spuren des Wachstumskegelhalses auf homogenem Substrat (siehe 14.2).

### **15.7 Wachstumskegel-Dynamik**

Die Wachstumskegel-Dynamik wird getrennt von der Axon-Dynamik ausgewertet. Um die Dynamik des Wachstumskegels zu quantifizieren, werden Grundumfang, Gesamtumfang, Fläche, Flächenasymmetrie sowie Anzahl und Länge von Filopodien für jeden Sektor des Wachstumskegels ermittelt. Der Grundumfang ergibt sich aus dem Umfang des Wachstumskegels ohne Filopodien, die Umfangslinie schneidet das Axon im Wachstumskegelhals, zur Berechnung des Gesamtumfangs wird die doppelte Länge der Filopodien zum Grundumfang addiert.

Die distalen 20  $\mu\text{m}$  des Axons, „in den Wachstumskegel verlängert“, teilen diesen in die linke und rechte Seite, deren Flächen getrennt ermittelt werden. Ein Kreuz, das die Strecke Wachstumskegelhals zu Wachstumskegelspitze im 45°Winkel halbiert, teilt den Wachstumskegel in einen vorderen und hinteren sowie zwei seitliche Sektoren ein. Filopodien werden – unabhängig von der Richtung, in die sie zeigen – dem Sektor zugeordnet, in dem sie entspringen.

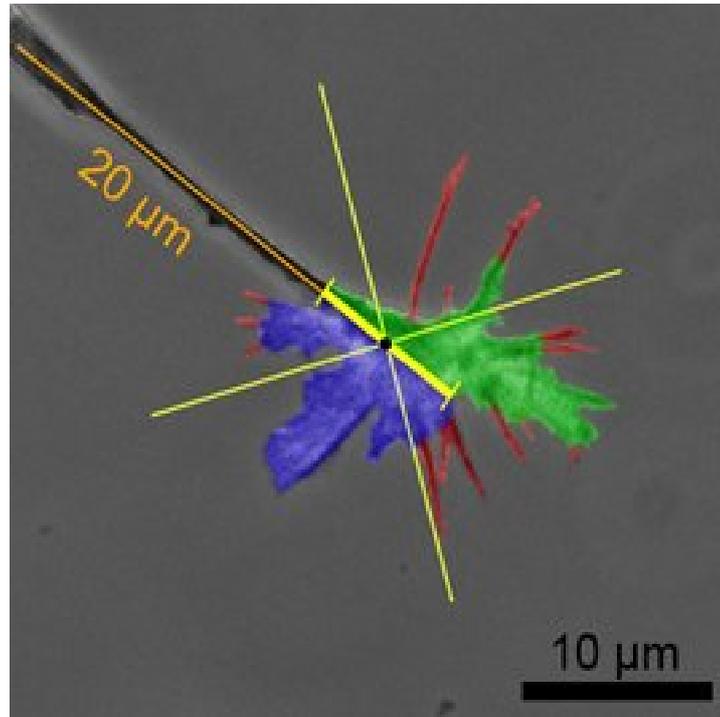


Abbildung 14: Exemplarischer Wachstumskegel, aufgenommen im Phasenkontrast. Für die Bestimmung der Wachstumskegel-Dynamik werden die letzten 20  $\mu\text{m}$  des Axons als Wachstumsrichtung (orange) in den Wachstumskegel verlängert. Die Verlängerungslinie teilt die Wachstumskegel-Fläche in rechte und linke Teilflächen (blau und grün), deren Flächenverhältnis bestimmt wird. Grundumfang (Umrandung der Teilflächen) und Gesamtumfang (Grundumfang plus doppelte Filopodienlänge) werden bestimmt. Die Sektorgrenzen (gelb) teilen den Wachstumskegel in ihrem Schnittpunkt, der halben Länge der Flächenhalbierenden (schwarzer Punkt), in 4 Sektoren. Die Sektoren enthalten 14 Filopodien (rot), 8 davon im vorderen, 3 im linken, 3 im hinteren Sektor.

### **III Ergebnisse**

#### **1 Voruntersuchungen**

##### **1.1 Homozygote k.o.-Embryonen sind unauffällig und die Genotypen im Wurf von heterozygoten Eltern liegen im Verhältnis 1:2:1 vor**

Unter adulten Tieren der verwendeten MAP1B-k.o.-Mauslinie herrscht ein schon beschriebenes Ungleichgewicht der Genotypen im Erwachsenenalter (Meixner et al., 2000). Nach der Mendel'schen Spaltungsregel wären 25% homozygote k.o.-Tiere aus einer Verpaarung heterozygoter Elterntiere zu erwarten. Aus entsprechenden Verpaarungen innerhalb der verwendeten Kolonie resultieren jedoch nur 10% (25 von 250) Tiere mit homozygotem k.o., die ein Alter von 3 Wochen erreichen. In der Zweitlinie von F. Propst erreichen ebenfalls 10% der homozygoten k.o.-Tiere das Erwachsenenalter. Aus weiteren – in dieser Arbeit nicht verwendeten – Mauslinien mit partiellem MAP1B-k.o. wurde von fehlentwickelten Embryonen und am ersten Tag versterbenden homozygoten k.o.-Jungtieren (González-Billault et al., 2000) bzw. von vor E8,5 versterbenden homozygoten k.o.-Embryonen berichtet (Edelmann et al., 1996).

Für die Planung und Durchführung dieser Arbeit ist es wichtig, festzustellen, ob in der hier verwendeten MAP1B-k.o.-Linie Embryonen bereits E14,5 Fehlentwicklungen aufweisen bzw. in reduzierter Zahl vorkommen. Es konnte durch Genotypisierung der Embryonen aus heterozygoten Verpaarungen von E13,5 bis E15,5 gezeigt werden, dass bis mindestens E15,5 das zu erwartende 1:2:1-Verhältnis zwischen den Genotypen vorliegt.

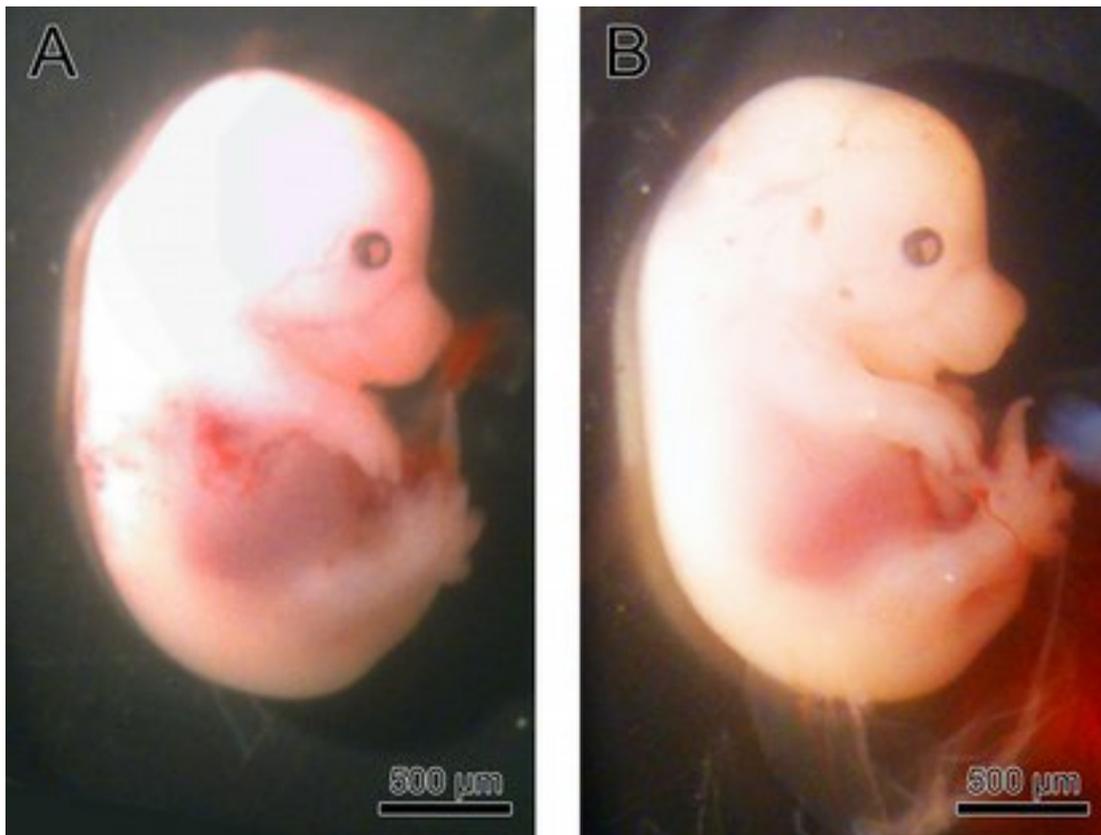


Abbildung 15: Maus Embryonen E14,5 eines Wurfes. Der homozygote k.o.-Embryo (B) unterscheidet sich äußerlich nicht vom homozygoten w.t. (A). Beide Embryonen sind etwa gleich groß und gleich weit entwickelt (Theiler-Stadium 22 am Übergang zu 23).

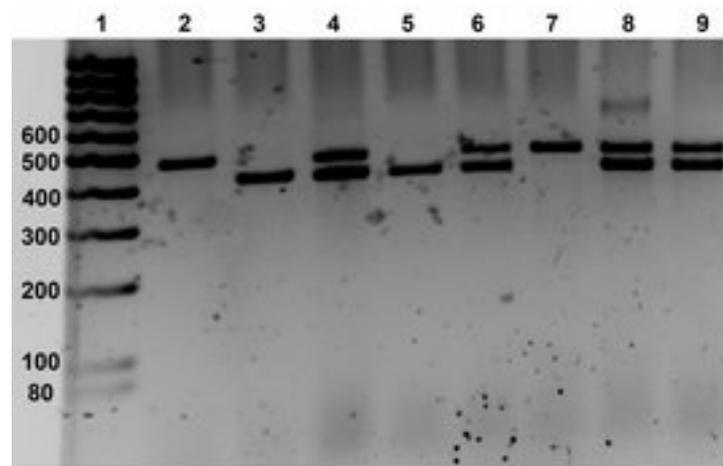


Abbildung 16: PCR-Produkte der Genotypisierung der Embryonen einer heterozygoten Verpaarung. Nach elektrophoretischer Auftrennung sind die beiden möglichen Produkte gut zu unterscheiden. DNA-Marker mit Größenangabe in Basenpaaren, links und rechts die PCR-Produkte der 8 Embryonen. w.t.-Embryonen sind anhand des kürzeren PCR-Produkts (siehe Position 3 und 5), k.o.-Embryonen anhand des längeren PCR-Produkts (siehe Position 2 und 7) zu erkennen. Die Genotypisierung von heterozygoten Embryonen ergibt beide PCR-Produkte (siehe Position 4, 6, 8, 9).

## **1.2 Die zentral-periphere Ausbreitung der RGZ-somata, deren Axone den SNK erreicht haben, hat einen Radius von 600 $\mu\text{m}$**

Für die Untersuchung der Axon-Navigation am SNK ist es wichtig, solche lokalen Subpopulationen von RGZ zu markieren, deren Axone den SNK erreicht haben und dort das Navigationsmanöver vollzogen haben. Das Manöver sollte bei der normalen intra-retinalen Geschwindigkeit der Axone (siehe 6.1) 2 bis 3 h in Anspruch nehmen. Für die Untersuchung der Axon-Dynamik im Retina-Gesamtpräparat ist es wichtig, Subpopulationen von RGZ zu markieren, deren Axone den SNK noch nicht erreicht haben.

Anhand von L1CAM-gefärbten Kryostatschnitten und Gesamtpräparaten wurde die Ausdehnung der OFS in der E14,5 Mausretina bestimmt. Die OFS erstreckt sich durchschnittlich  $736 \pm 80 \mu\text{m}$  um den Mittelpunkt des SNK ( $n = 3$ ; Messungen ( $m$ ) = 6). RGZ, deren Axone den SNK bereits erreicht haben, werden retrograd mit einem in den SNK applizierten DiO-Kristall gefärbt und die Distanz der vom Mittelpunkt des SNK am weitesten entfernten Somata bestimmt. Diese beträgt  $603 \pm 55 \mu\text{m}$  ( $n = 3$ ,  $m = 30$ ).

Mit diesen Ergebnissen zeigt sich, dass für die Untersuchung der Navigation der RGZ-Axone am SNK die DiO- bzw. Dil-Kristalle in einer Entfernung von höchstens  $500 \mu\text{m}$  vom Mittelpunkt des SNK appliziert werden dürfen. Weiter entfernt applizierte Kristalle würden nur Axone einfärben, die den SNK noch nicht erreicht haben. Da allgemein davon ausgegangen wird, dass fehlnavigierende Axone nach einer gewissen Zeit abgebaut werden und die Zellen sterben (Péquignot et al., 2003), dürfen die Kristalle auch nicht zu nah am SNK appliziert werden. Dort markiert der Kristall RGZ, deren Axone schon E13,5 das Manöver am SNK vollzogen haben. Für die Untersuchung der Axon-Dynamik in Retina-Gesamtpräparaten müssen lokale Subpopulationen von RGZ eingefärbt werden, deren Axone den SNK noch nicht erreicht haben. Die Kristalle müssen hierfür  $600$  bis  $800 \mu\text{m}$  vom Mittelpunkt des SNK entfernt appliziert werden, denn sonst werden primär Axone eingefärbt, die den SNK erreicht und die Retina verlassen haben.

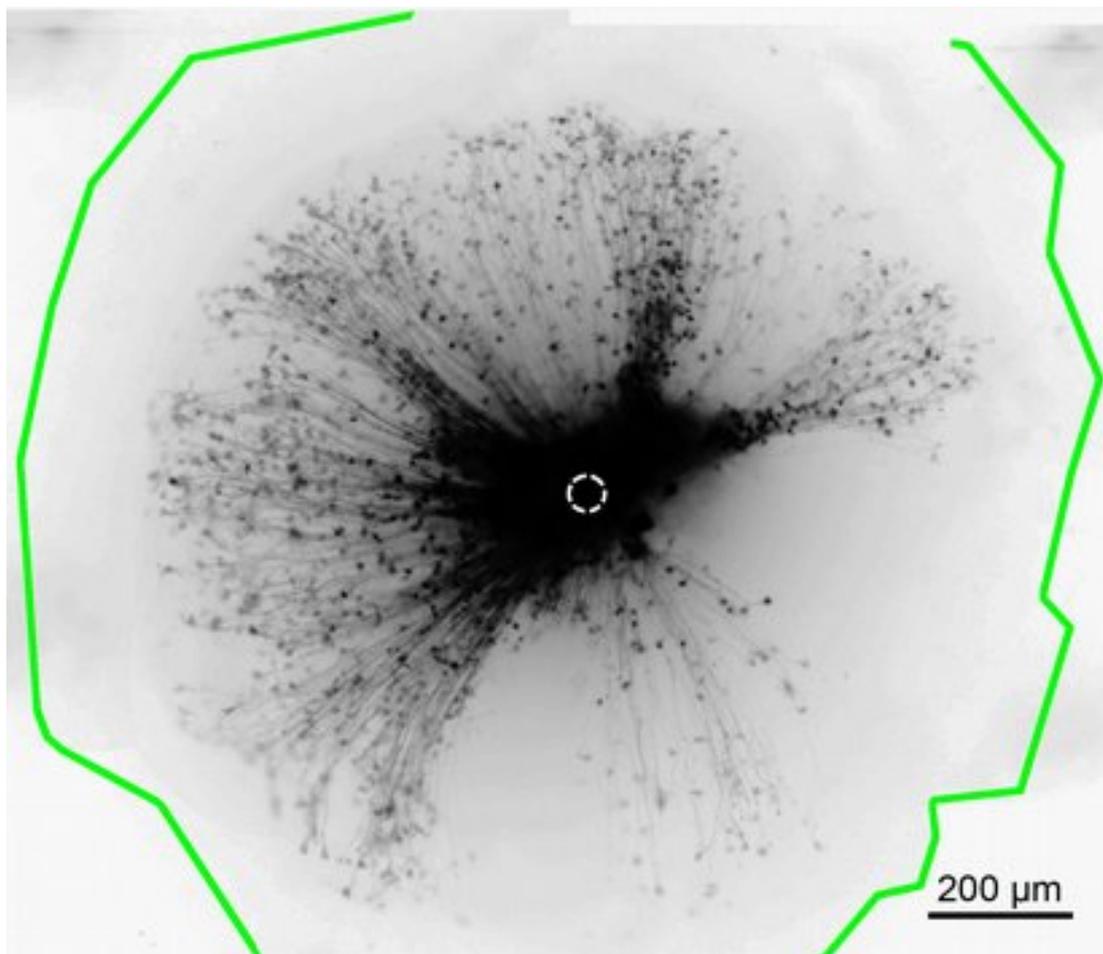


Abbildung 17: Retrograd mit DiO gefärbte Somata und Axone von RGZ, deren Axone E14,5 den SNK bereits erreicht haben. (Um eine kontrastreichere Darstellung zu erreichen, wurde das Bild invertiert.) Der Umriss des Retina-Gesamtpräparats (grün) und der SNK (weißer, unterbrochener Kreis) wurden eingezeichnet.

### **1.3 Lagerung der Mausembryoköpfe in kühlem Hank's Puffer ist möglich**

Da nicht alle Embryonen eines Wurfes sofort verarbeitet werden können, müssen sie bis zur Präparation gelagert werden. Während der Lagerung kommt es allerdings zu Gewebeerfall und Zelltod, sodass die Embryonen nicht weiterverwendet werden können. Eine gezieltere Präparation durch Auswahl der homozygoten Embryonen aus dem Wurf kann jedoch erst nach abgeschlossener Genotypisierung erfolgen, die wiederum 90 Minuten dauert (siehe II 8.1). In der Literatur finden sich für diese Problematik nur wenige, zudem widersprüchliche Angaben. Es mussten daher zellkompatible Aufbewahrungsbedingungen erarbeitet werden.

Die Lagerung von Köpfen oder ganzer Embryonen (im Uterus) in Hank's Puffer im Inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) oder bei Raumtemperatur (20 °C) hat einen deutlichen Gewebeerfall zur Folge. Die Augen sind bereits nach 90 min nicht mehr zur Präparation von Retina-Gesamtpräparaten geeignet. Im Gegensatz dazu lassen sich die Augen auch nach 3 h bei kühler Lagerung (8 °C) in Hank's Puffer noch präparieren. Es ist kein Unterschied zwischen sofort nach der Entnahme und nach 2 h präparierten Explantaten bzw. Gesamtpräparaten zu erkennen. Die Lagerung in DMEM/F-12 Medium bringt keine sichtbaren Vorteile gegenüber der Lagerung in (mit Calcium und Magnesium) ergänztem Hank's Puffer (siehe II 3.1). Auch die Lagerung von ganzen Embryonen im Uterus mit Hank's Puffer oder DMEM/F-12 Medium bringt keine Verbesserung gegenüber der Lagerung von einzelnen Köpfen. Daher wurden für alle beschriebenen Experimente einzelne Köpfe bei 8 °C in (mit Calcium und Magnesium) ergänztem Hank's Puffer gelagert.

## 2 Dicke der Neuroretina

### 2.1 Die Neuroretina ist in MAP1B-k.o.-Mäusen in der Nähe des SNK dünner

Zur Untersuchung der Dicke der OFS sowie der gesamten Neuroretina wurde in Gewebeschnitten die Ausdehnung der Schichten vermessen. Am Rand des SNK (50  $\mu\text{m}$  von dessen Mittelpunkt) und in Abständen von 100, 200 und 300  $\mu\text{m}$  wurde mit dem Linien-Messwerkzeug von Fiji (siehe Methoden 7.2) die Schichtdicke in 3 w.t. und 5 k.o.-Retinae bestimmt.

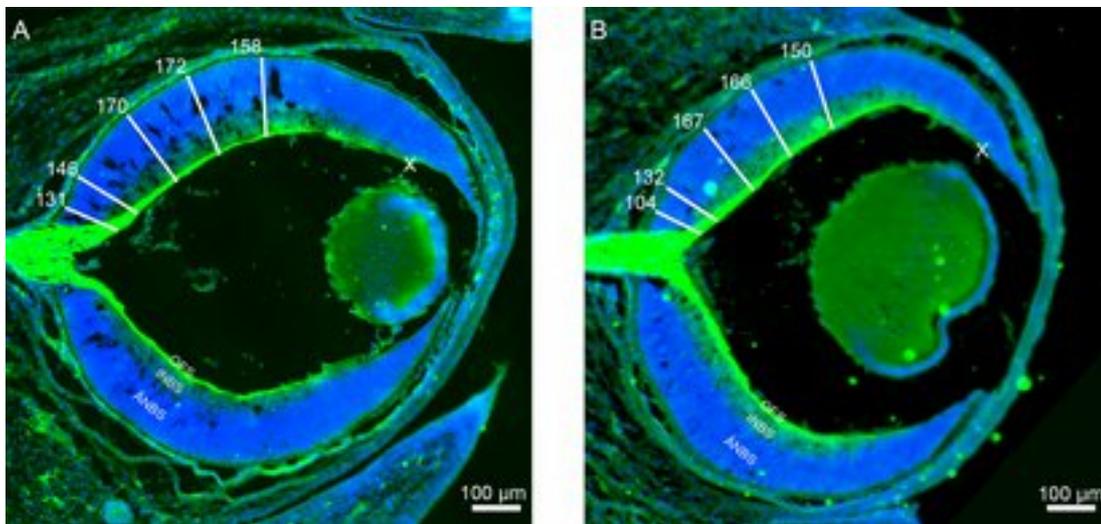


Abbildung 18: Kryostatschnitte von E14,5 w.t. (A) und k.o. (B) Augen. Färbung der OFS (L1CAM, grün) und aller Somata (DAPI, blau). Eingezeichnet je eine der beiden Messreihen (in 50, 100, 200, 300 und 400  $\mu\text{m}$  Distanz vom Mittelpunkt des SNK) mit ihren Messwerten. Die optische Faserschicht (OFS), die innere neuroblastischen Schicht (INBS) und die äußere neuroblastischen Schicht (ÄNBS) sind gekennzeichnet. Das weiße X markiert den Punkt der maximalen Ausdehnung der OFS.

Die Ausbreitung der OFS nach peripher ist im k.o. mit  $694 \pm 38 \mu\text{m}$ , im Vergleich zum w.t. mit  $737 \pm 56 \mu\text{m}$  vom SNK, nicht signifikant anders ausgebreitet. Die Messungen zeigen, dass die OFS in der Nähe des SNK im w.t. und k.o. dick ist, während die restliche Neuroretina sich um den SNK herum verjüngt (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19). Nach peripher nimmt

die Dicke der OFS kontinuierlich ab, da immer weniger Somata bereits ein Axon gebildet haben und sie nur die Axone peripherer RGZ umfasst. Die Dicke der OFS in w.t. und k.o.-Embryonen zeigen keinen signifikanten Unterschied.

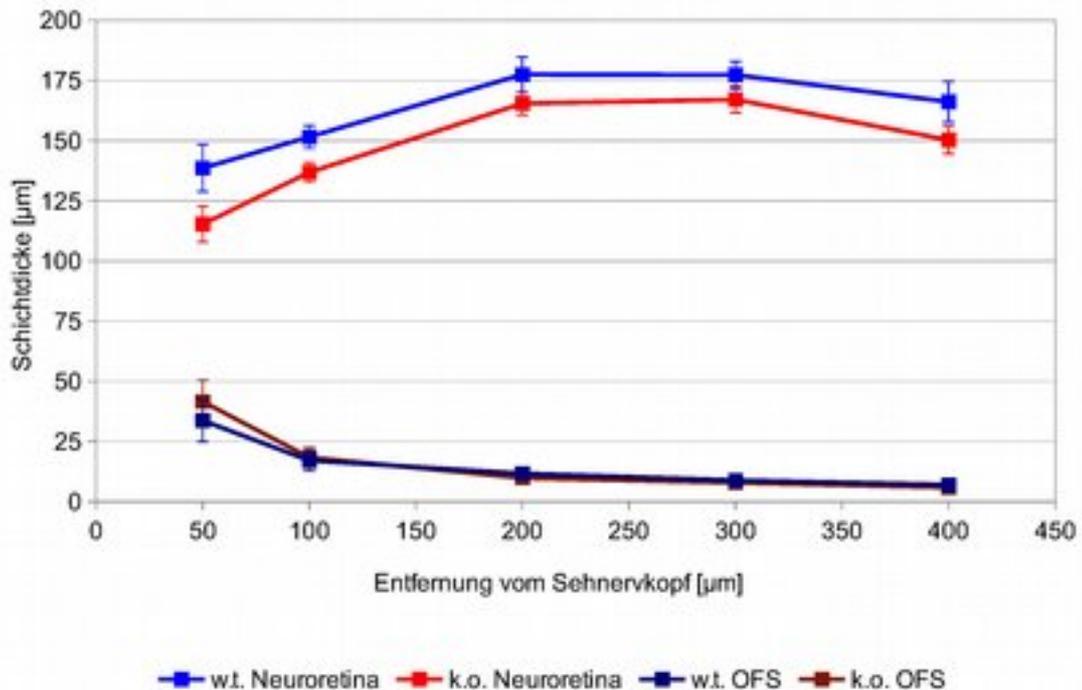


Abbildung 19: Schichtdicke der Neuroretina und der OFS in Abhängigkeit von der Entfernung vom SNK.

Die Dicke der gesamten Neuroretina nimmt mit der Entfernung vom SNK zunächst zu und dann im weniger differenzierten Bereich der peripheren Retina ab. Die Neuroretina ist im k.o. zentral deutlich dünner als im w.t.: Sie misst bei 50 µm Abstand im w.t.  $138 \pm 10$  µm und nur  $115 \pm 7$  µm (83% des Wertes im w.t.) im k.o. ( $p < 0,01$ ); bei 100 µm Abstand  $152 \pm 5$  µm im w.t. und  $137 \pm 4$  µm (90%) im k.o. ( $p < 0,01$ ); bei 200 µm Abstand  $178 \pm 7$  µm im w.t. und  $166 \pm 5$  µm (93%) im k.o. ( $p < 0,05$ ); bei 300 µm Abstand  $177 \pm 6$  µm im w.t. und  $167 \pm 6$  µm (94%) im k.o. ( $p < 0,05$ ); bei 400 µm Abstand  $166 \pm 9$  µm im w.t. und  $150 \pm 6$  µm (90%) im k.o. ( $p < 0,05$ ). Stichprobenhafte Messungen in ungeschnittenen, mit 2P-Mikroskopie dokumentierten w.t.-Retinae bestätigen diese in Schnitten gemessenen Dicken (siehe 4.3). Die Dicke von ÄNBS und INBS wurde nicht vermessen, da die Grenze diffus verläuft.

### 3 RGZ-Axon-Faszikulierung in der Retina

#### 3.1 Automatisierte Quantifizierung von Axonfaszikeln liefert zuverlässige Ergebnisse

Um das im k.o. möglicherweise veränderte Faszikelmuster der OFS (siehe Abbildung 27) quantifizieren zu können, werden Anzahl und Durchmesser von Faszikeln bestimmt. Zentral um den SNK (bis ca. 150  $\mu\text{m}$  Abstand) sind einzelne Faszikel kaum zu unterscheiden. Peripher (in den äußersten Bereichen der OFS) sind E14,5 kaum Faszikel vorhanden, obwohl sich die OFS selbst bis  $736 \pm 80 \mu\text{m}$  vom Mittelpunkt des SNK erstreckt (siehe 1.2). Daher wurde die Faszikeldicke in den Entfernungen 300 und 400  $\mu\text{m}$  vom Mittelpunkt des SNK evaluiert. Aufgrund der Radiärsymmetrie der Retina erfolgte die Auswertung auf Kreisbögen. Um möglichst viele Retinae auswerten zu können, wurde eine automatisierte Auswertung entwickelt. Die automatisierte Auswertung errechnet die Faszikeldicken aus den Schnittpunkten des Fluoreszenzintensitätsplots der L1CAM-Färbung und einer (an den lokalen Hintergrund angepassten) Medianlinie der Fluoreszenzintensität (siehe II 15.1, Abbildung 10, Abbildung 27). Die gemessenen Faszikel werden nach ihrem Durchmesser in die Kategorien dünn ( $d \leq 2,5 \mu\text{m}$ ), mittel ( $2,5 \mu\text{m} < d < 10 \mu\text{m}$ ) und dick ( $d \geq 10 \mu\text{m}$ ) eingeteilt.

Im Vergleich einer automatisierten Auswertung mit der manuellen Auswertung durch drei Personen zeigt sich ein Nachteil für Erstere: Die automatisierte Auswertung ignoriert in wenigen Fällen (ca. vier Faszikel pro Retina) besonders schwach fluoreszierende Faszikel, die zwischen dicken, stark fluoreszierenden Faszikeln verlaufen (siehe Abbildung 20). Dies kann einen Unterschied in der Anzahl kleiner, schwach fluoreszierender Faszikel zwischen w.t. und k.o. verringern. Personen übersehen allerdings ebenfalls dünne Faszikel, sodass dieser Fehler im Vergleich zur automatisierten Auswertung keinen signifikanten Unterschied hervorruft. Demgegenüber steht eine relativ hohe Variabilität der gemessenen Durchmesser und der Faszikelanzahl im manuellen Verfahren. Der Mensch kann zwar die

Umgebung des Faszikels in die Bewertung einfließen lassen, allerdings ist die Messung weniger akkurat und von der vermessenden Person abhängig. Wegen der hohen Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der automatisierten Auswertung sowohl hinsichtlich der Durchmesser Kategorien als auch hinsichtlich der Gesamtzahl der Faszikel wurden die Retinae mit Hilfe des automatisierten Systems evaluiert.

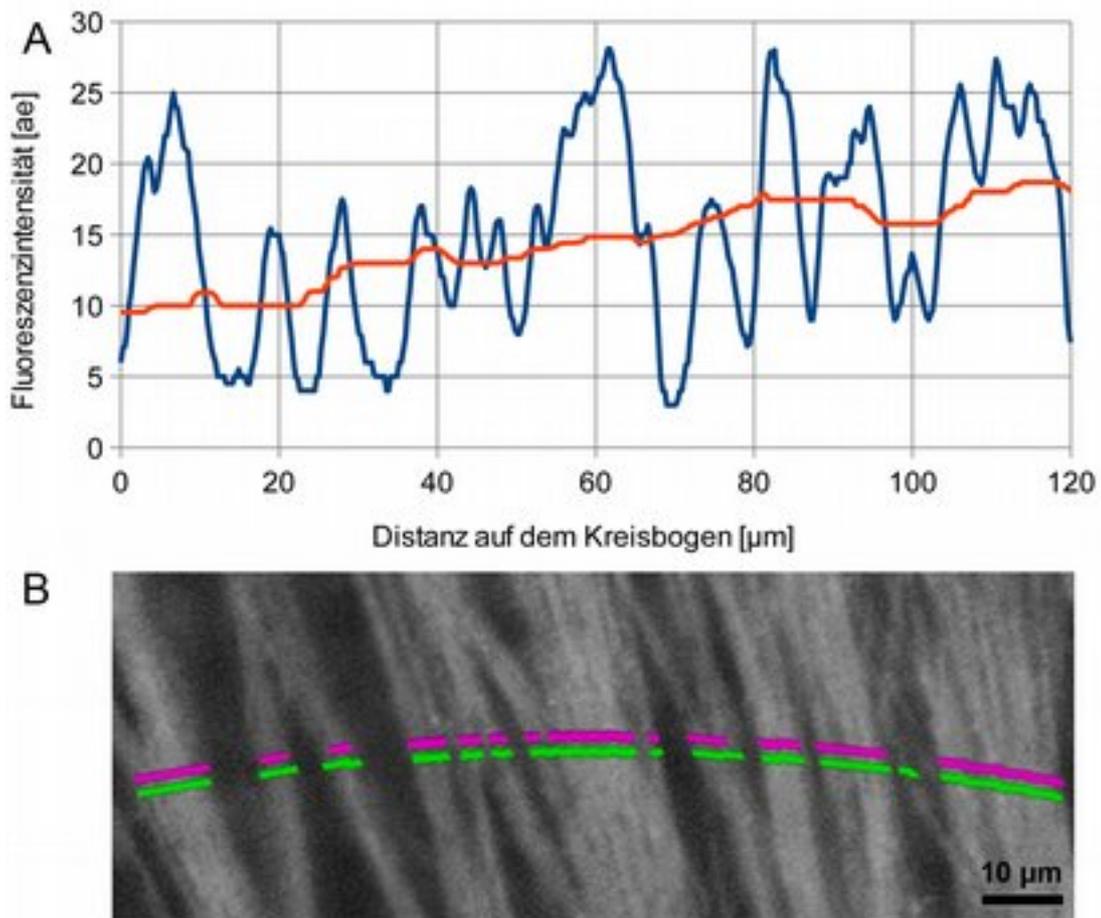


Abbildung 20: Manuelle und automatisierte Erfassung der Faszikeldurchmesser im Vergleich: Detailausschnitt von 120 µm (ca. 20°) entlang des 300-µm-Kreisbogens um den Mittelpunkt des SNK. Die Fluoreszenzintensität der L1CAM-Färbung (blau) und die lokal angepasste Messlinie zur Bestimmung der Faszikelbreite mit der automatisierten Auswertung (rot) sind abgebildet (A). Die mit Fiji von einer Person manuell (grün) gemessenen und die mittels der automatisierten Auswertung (magenta) gemessenen Faszikelbreiten sind zum Vergleich in das fluoreszenzmikroskopische Bild eingezeichnet (B).

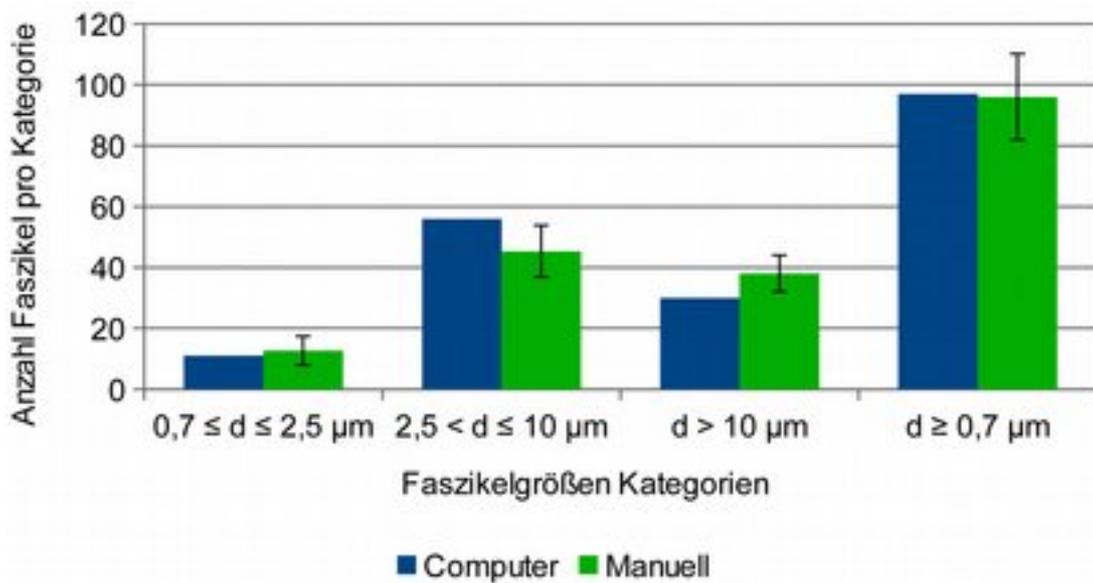


Abbildung 21: Messung einer halben Retina bei 300  $\mu\text{m}$  Abstand vom Mittelpunkt des SNK. Vergleich der Computer-Messung mit dem Durchschnitt der Messungen von drei Personen. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Auswertungsverfahren.

### 3.2 Die Anzahl dünner Faszikel in der optischen Faserschicht ist im k.o. erhöht

Um die Zusammensetzung der OFS aus unterschiedlich dicken Faszikeln zu bestimmen, werden Faszikeldurchmesser in w.t. und k.o.-Retinae gemessen und in Kategorien eingeteilt (siehe II 15.1). Die Faszikelanzahl wird für 10 Retinae von 8 w.t.-Embryonen und 20 Retinae von 14 k.o.-Embryonen aus insgesamt 8 Würfen von Verpaarungen heterozygoter Elterntiere bestimmt. Die Retinae der jeweiligen Würfe wurden gemeinsam präpariert, fixiert, gefärbt und dokumentiert. Retinae von MAP1B-heterozygoten Embryonen werden nicht in die Auswertung einbezogen.

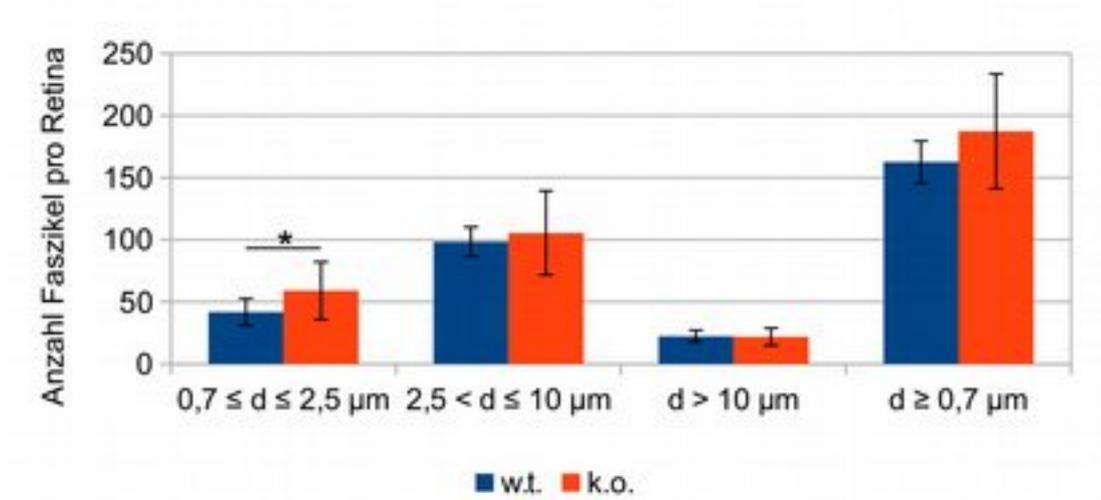


Abbildung 22: Anzahl der Faszikel in w.t. und k.o.-Retinae, gemessen 300  $\mu\text{m}$  vom Mittelpunkt des SNK und in den Kategorien dünn, mittel, dick eingeteilt, sowie als Gesamtzahl der Faszikel ( $d \geq 0,7 \mu\text{m}$ ) verglichen.

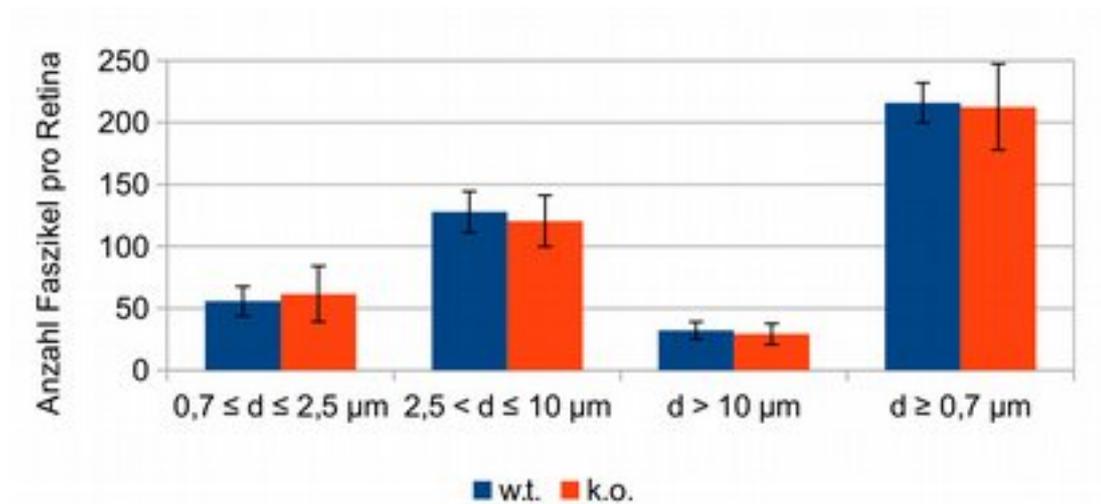


Abbildung 23: Anzahl der Faszikel in w.t. und k.o.-Retinae, gemessen 400  $\mu\text{m}$  vom Mittelpunkt des SNK und in den Kategorien dünn, mittel, dick eingeteilt, sowie als Gesamtzahl der Faszikel ( $d \geq 0,7 \mu\text{m}$ ) verglichen.

Die durchschnittliche Anzahl der dünnen Faszikel in 300  $\mu\text{m}$  Entfernung um den SNK beträgt im w.t.  $40 \pm 9$  und ist im k.o. auf  $56 \pm 21$  (144% des w.t.-Wertes) erhöht ( $p < 0,05$ ). In allen anderen Kategorien und bei 400  $\mu\text{m}$  Entfernung sind keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl festzustellen.

Auffällig ist die Standardabweichung der Datensätze. Bei 400  $\mu\text{m}$  Entfernung zum SNK zeigt sich, dass die Standardabweichung der Gesamtzahl an Faszikeln mit  $\sigma = 6$  im w.t. und  $\sigma = 9$  im k.o. höher ist im k.o. (F-Test;  $p < 0,05$ ). Bei 300  $\mu\text{m}$  Entfernung vom SNK ergibt sich eine Standardabweichung von  $\sigma = 11$  im w.t. und  $\sigma = 23$  im k.o. (209% des w.t.-Wertes) für die durchschnittliche Anzahl dünner Faszikel. Der k.o. zeigt trotz der doppelt so hohen Probenanzahl ( $n = 20$  statt  $n = 10$ ) eine signifikant höhere Varianz (F-Test;  $p < 0,05$ ). Das gleiche Bild ergibt sich für die Standardabweichung der durchschnittlichen Anzahl der mittleren Faszikel bei 300  $\mu\text{m}$ :  $\sigma = 12$  im w.t. stehen  $\sigma = 34$  (283% des w.t.-Wertes) Faszikel im k.o. gegenüber (F-Test;  $p < 0,01$ ). Kein Unterschied zeigt sich bei den großen Faszikeln mit  $\sigma = 5$  im w.t. bzw.  $\sigma = 7$  im k.o. Dennoch ist die Standardabweichung der Gesamtzahl an Faszikeln mit  $\sigma = 17$  im w.t. gegen  $\sigma = 46$  (270% des w.t.-Wertes) im k.o. erhöht (F-Test;  $p < 0,01$ ). Diese erhöhte Varianz der Faszikelzahlen im k.o. bedeutet, dass die individuellen Werte pro Retina im k.o. doppelt so stark vom Durchschnittswert abweichen. Die durchschnittliche Faszikelanzahl unterscheidet sich zwischen w.t. und k.o. bei den dünnen Faszikeln in 300  $\mu\text{m}$  Abstand, jedoch finden sich unter den k.o.-Präparaten Beispiele mit erheblich mehr und andere Beispiele mit erheblich weniger dünnen Faszikeln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die OFS in k.o. Retinae bei 300  $\mu\text{m}$  Entfernung mehr dünne Faszikel aufweist. Insgesamt ist sowohl bei 300  $\mu\text{m}$  als auch bei 400  $\mu\text{m}$  Entfernung vom SNK eine mehr als doppelt so große Standardabweichung der durchschnittlichen Faszikelzahl zu beobachten. Dieser Varianzunterschied deutet darauf hin, dass der MAP1B-k.o. die Axone nicht zu einem grundlegend anderen Faszikulierungsverhalten

zwingt, sondern den Verlust einer Faszikeldickeregulierung bedeutet.

### 3.3 Die Anzahl der Defaszikulierungen und Faszikulierungen ist im k.o. erhöht

Um zu ergründen, wie die erhöhte Anzahl dünner Faszikel zustande kommt, wird die Anzahl der Faszikulierungs- und Defaszikulierungsereignisse für jeweils 10 k.o. und 10 w.t.-Retinae (E14,5) bestimmt. Diese werden manuell in einer Ringfläche zwischen 300  $\mu\text{m}$  und 400  $\mu\text{m}$  (vom Mittelpunkt des SNK) für die beiden Kategorien dünne Faszikel ( $d \leq 2,5 \mu\text{m}$ ) bzw. mittlere und große Faszikel ( $d > 2,5 \mu\text{m}$ ) gezählt.

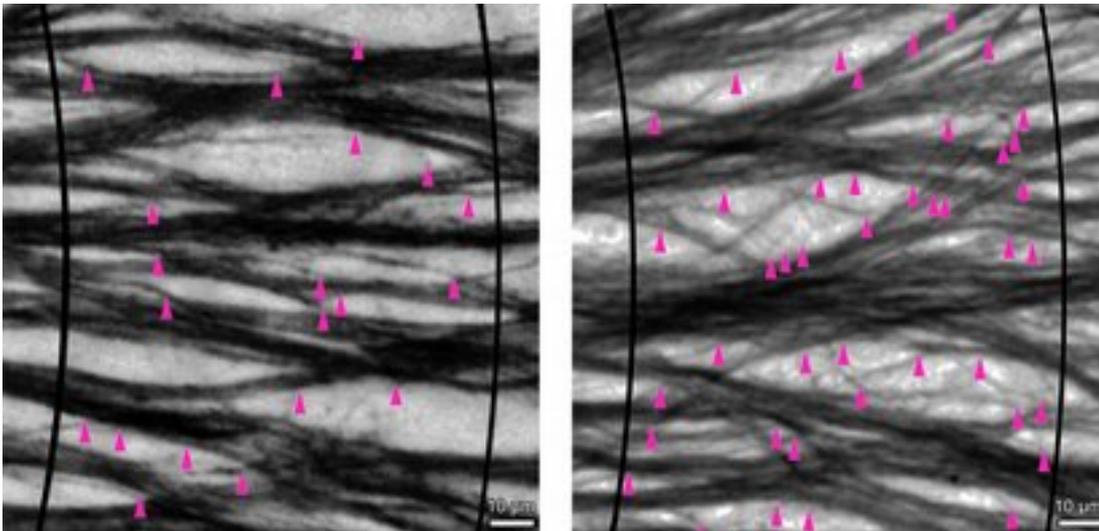


Abbildung 24: Defaszikulierungen der RGZ-Axone in w.t. (links) und k.o.-Retina (rechts) OFS. Die RGZ-Axone wachsen von der Peripherie (in den Abbildungen rechts) in Richtung des SNK (links, nicht im Bild). Darstellung für besseren Kontrast invertiert. Die Anzahl der Defaszikulierungen ist in k.o.-Retinae um Faktor 2,5 erhöht.

Die Anzahl der Defaszikulierungen ist mit  $134 \pm 30$  im w.t. zu  $327 \pm 107$  im k.o. (243% des w.t.-Wertes) erhöht ( $p < 0,001$ ). Die Anzahl der Defaszikulierungen, an denen zwei dicke Faszikel beteiligt sind, unterscheidet sich nicht. Die Anzahl der Faszikulierungen dünner Faszikel ist mit  $154 \pm 56$  im w.t. und  $400 \pm 113$  (260% des w.t.-Wertes) im k.o. erhöht ( $p < 0,001$ ). Auch bei den

Faszikulierungen gibt es keinen Unterschied bei den mittleren und dicken Bündeln. Die Varianz der Ereignisse unterscheidet sich ebenfalls: Die Anzahl der Defaszikulierungseignisse mit dünnen Faszikeln weist im w.t. eine Standardabweichung von  $\sigma = 30$  auf und ist im k.o. mit  $\sigma = 107$  (357% des w.t.-Wertes) erhöht (F-Test;  $p < 0,05$ ). Die Anzahl der Faszikulierungen mit dünnen Faszikeln weist im w.t. eine Standardabweichung von  $\sigma = 56$  auf und ist im k.o. mit  $\sigma = 113$  (202% des w.t.-Wertes) ebenfalls erhöht ( $p < 0,001$ ). Der Quotient von Faszikulierungen zu Defaszikulierungen ist mit  $1,16 \pm 0,35$  im w.t. und  $1,27 \pm 0,31$  im k.o. für dünne Faszikel nicht signifikant unterschiedlich. Der Quotient ist auch für Faszikulierungen zu Defaszikulierungen der Kategorie dicke und mittlere Faszikel im k.o. nicht verändert.

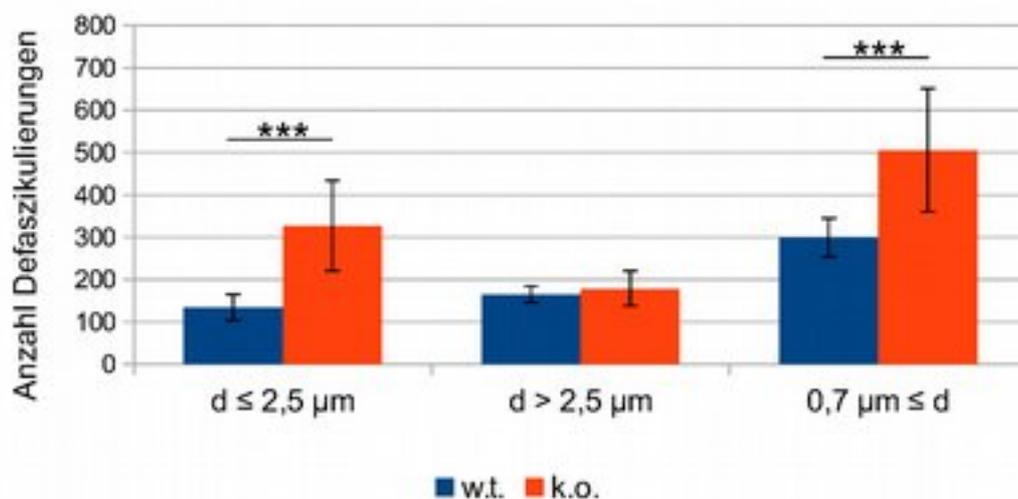


Abbildung 25: Anzahl der Defaszikulierungseignisse in w.t. und k.o.-Retinae. Gezählt wurden die Ereignisse, bei denen sich (innerhalb der Ringfläche 300 bis 400  $\mu\text{m}$  vom SNK) Faszikel aus einem Faszikel abspalten. War eines der entstehenden Faszikel klein, wurde das Ereignis in der Kategorie  $d \leq 2,5 \mu\text{m}$  erfasst, waren die entstehenden Faszikel alle  $d > 2,5 \mu\text{m}$ , wurde das Ereignis in der Kategorie  $d > 2,5 \mu\text{m}$  erfasst. Es wurden 11 w.t. und 13 k.o.-Retinae aus 10 Embryonen pro Genotyp ausgewertet.

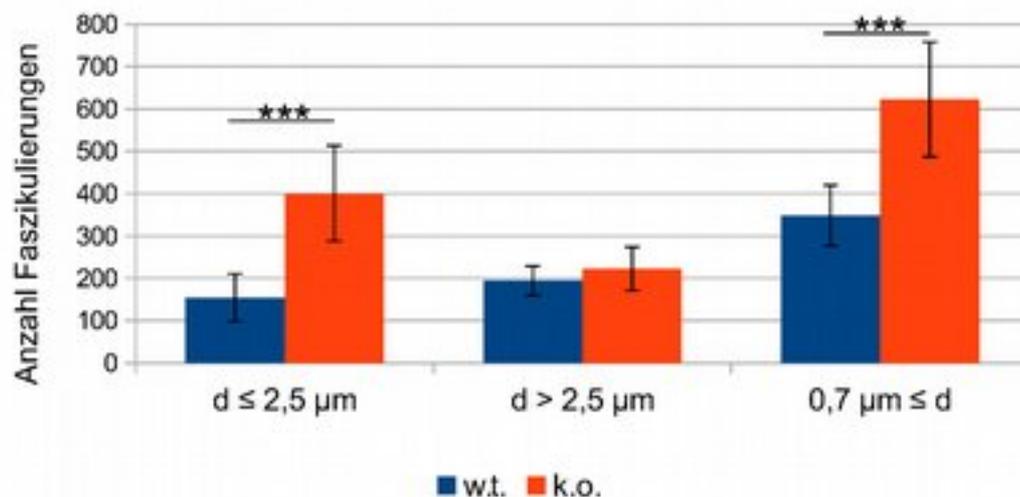


Abbildung 26: Anzahl der Faszikulierungsereignisse in w.t. und k.o.-Retinae. Gezählt wurden die Ereignisse, bei denen sich (innerhalb der Ringfläche 300 bis 400  $\mu\text{m}$  vom SNK) mehrere Faszikel zu einem Faszikel zusammenschließen. Es wurden 11 w.t. und 13 k.o.-Retinae aus 10 Embryonen pro Genotyp ausgewertet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in k.o.-Retinae 2,5-mal häufiger dünne Faszikel defaszikulieren und auch wieder faszikulieren. Die Quotienten von Faszikulierungen zu Defaszikulierungen sind auf der Strecke zwischen den Messpunkten nicht erhöht. Die Faszikulierungsereignisse ergeben sich fast zwangsläufig aus den Defaszikulierungsereignissen. Verlässt ein Axon sein Faszikel, stößt es zwangsläufig wieder auf ein anderes Faszikel. Die höhere Anzahl von dünnen Faszikeln in der k.o.-Retina (siehe 3.3) entsteht also nicht durch ein Wachsen von dünnen Faszikeln parallel zu den dickeren Faszikeln, sondern durch häufigeres Abspalten der dünnen Faszikel. Dies deutet ebenfalls auf einen Verlust der Regulierung der Faszikeldicke hin.

### 3.4 Anzahl und Fläche der Faszikelzwischenräume ist unverändert

Neben der Betrachtung der Faszikel wurde auch die freie Fläche zwischen den Faszikeln bestimmt, um mit der freien Fläche ein drittes Maß für das Muster der OFS zu erhalten. In den drei analysierten w.t.-Retinae ergeben sich im Durchschnitt  $197 \pm 43$  Zwischenräume mit einer durchschnittlichen Fläche von  $233 \pm 30 \mu\text{m}^2$ . Die drei k.o.-Retinae weisen mit  $252 \pm 43$  Zwischenräumen und freien Flächen von  $228 \pm 45 \mu\text{m}^2$  keinen signifikanten Unterschied auf.

Die verwendete lineare Kontrastierung erreicht wegen der lokal unterschiedlichen Hintergründe schnell ihre Grenzen: In nicht homogen gefärbten Präparaten sind immer nur Teilbereiche der Retina kontrastierbar. Fortgeschrittene Software wie das trainierbare *Interactive Learning and Segmentation Toolkit* (ilastik) könnten hier Abhilfe schaffen (Kreshuk et al., 2011).

## 4 Navigation der RGZ-Axone am SNK

### 4.1 Subpopulationen von RGZ-Axonen fehlnavigieren im k.o. am SNK

Beim Erreichen des SNK in der Retina vollziehen RGZ-Axone ein Navigationsmanöver, bei dem sie in annähernd rechtem Winkel in den SNK abtauchen, wo sie die Retina verlassen und den Sehnerv bilden. Um zu untersuchen, ob dieses Manöver durch das Fehlen von MAP1B beeinflusst wird, werden lokale Subpopulationen von RGZ-Axonen markiert, die den SNK bereits erreicht haben. Die Bilder der w.t.-Retina-Gesamtpräparate zeigen, dass die Axone beim Erreichen des SNK erfolgreich abtauchen. Da sie die Retina im rechten Winkel zur Bildebene verlassen, scheinen sie am SNK zu enden (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). In den k.o.-Retina-Gesamtpräparaten dagegen sind einzelne Axone und dünne Bündel zu sehen, die nicht in den optischen Nerv abtauchen (d.h. nicht aus der Bildebene verschwinden), sondern die in etwa in der Fokusebene bleiben und fehlnavigieren. In etwas mehr als der Hälfte der Fälle verlassen die Axone den Bereich des SNK mit geringer Änderung ihrer Richtung. In einem Drittel dieser Fälle sind auch fehlnavigierende Axone zu beobachten, die zwar abtauchen und den SNK verlassen, aber zusätzlich ihre Richtung deutlich ändern (siehe Abbildung 27 und Abbildung 29).

In 9 von 15 k.o.-Retina-Gesamtpräparaten waren fehlnavigierende Axone zu beobachten; in 3 dieser 9 Retinae auch fehlnavigierende Axone, die deutlich ihre Richtung am SNK ändern. Unter den w.t.-Retina-Gesamtpräparaten war eine Retina unter 10 mit fehlnavigierenden Axonen. Bei einer weiteren aus den 10 w.t.-Retinae waren scheinbar fehlnavigierende Axone zu sehen. Mit einer Analyse der Tiefe der fehlnavigierenden Axone kann ausgeschlossen werden, dass es sich um das gleiche Phänomen handelt wie im k.o. (siehe 4.2). Die Anzahl der Präparate mit fehlnavigierenden Axonen ist im k.o. mit 66% (9 Retinae mit, 6 Retinae ohne fehlnavigierende Axone) im Vergleich zu Retinae des w.t. mit 10% (1 mit, 9 ohne) signifikant erhöht (exakter Fisher-Test, zweiseitig;  $p < 0,02$ ).

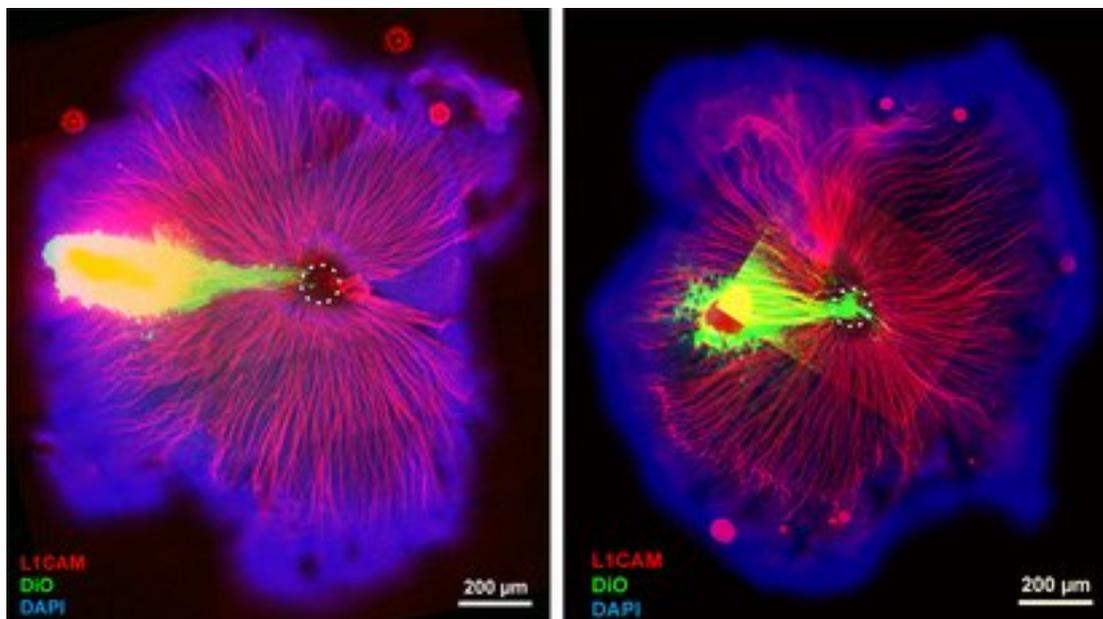


Abbildung 27: Axonnavigation am SNK, Übersicht: w.t.-Retina (links) und k.o.-Retina (rechts). Gesamtretnafärbung (DAPI, blau), Gesamtfärbung der RGZ-Axone (L1CAM, rot) und Färbung der Axon-Subpopulation (DiO, grün). Der stark fluoreszierende Bereich im direkten Umfeld des Kristalls wurde aus einer Übersichtsaufnahme ergänzt. Am SNK (gestrichelter Kreis, weiß) im k.o. (rechts) fehl navigierende Axone, die den SNK nach unten rechts verlassen.

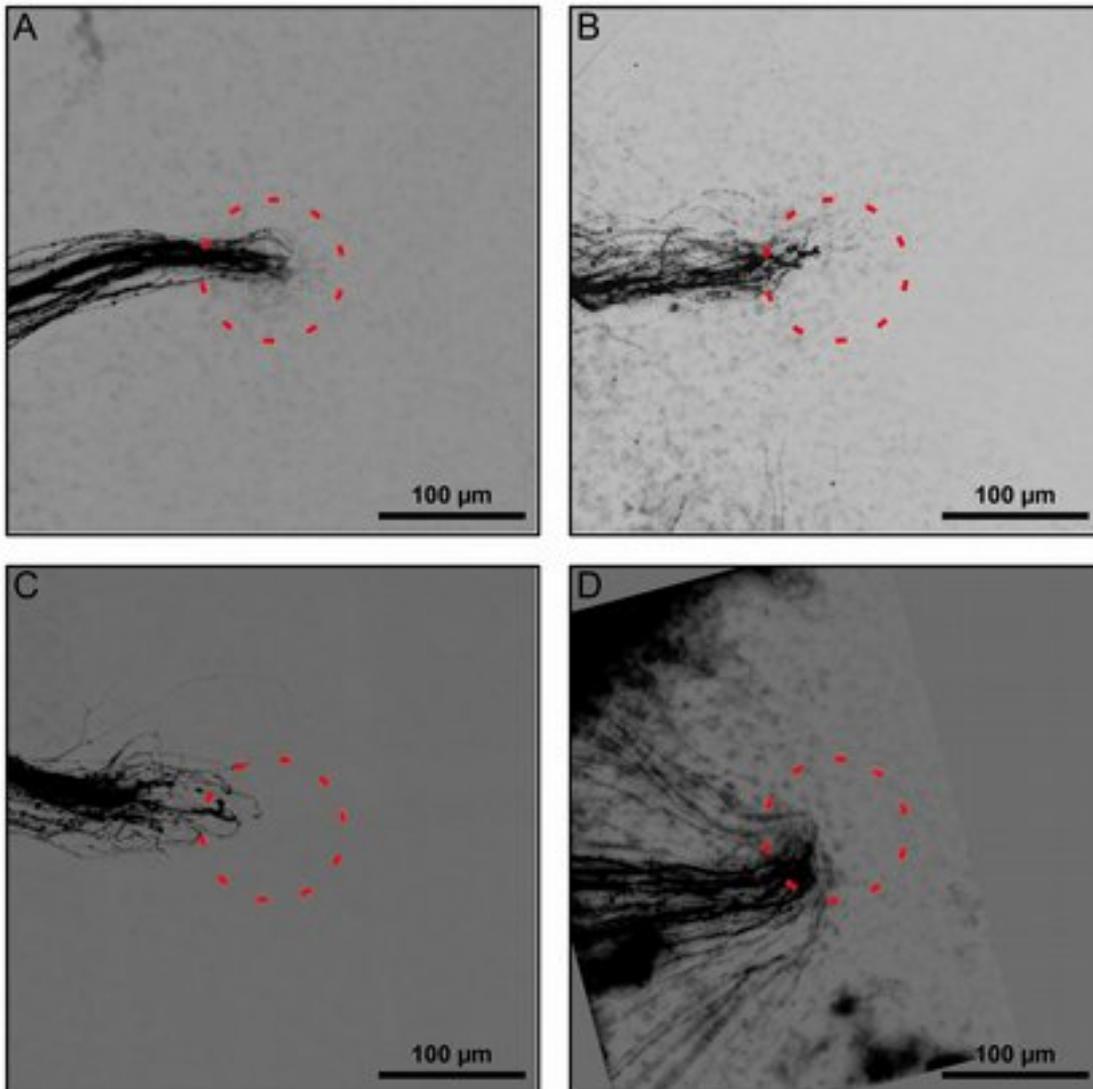


Abbildung 28: Markierte Axon-Subpopulationen in repräsentativen w.t.-Retinae (A - D) erreichen den SNK (gestrichelter Kreis, rot) und verlassen die Bildebene im Zentrum des SNK.

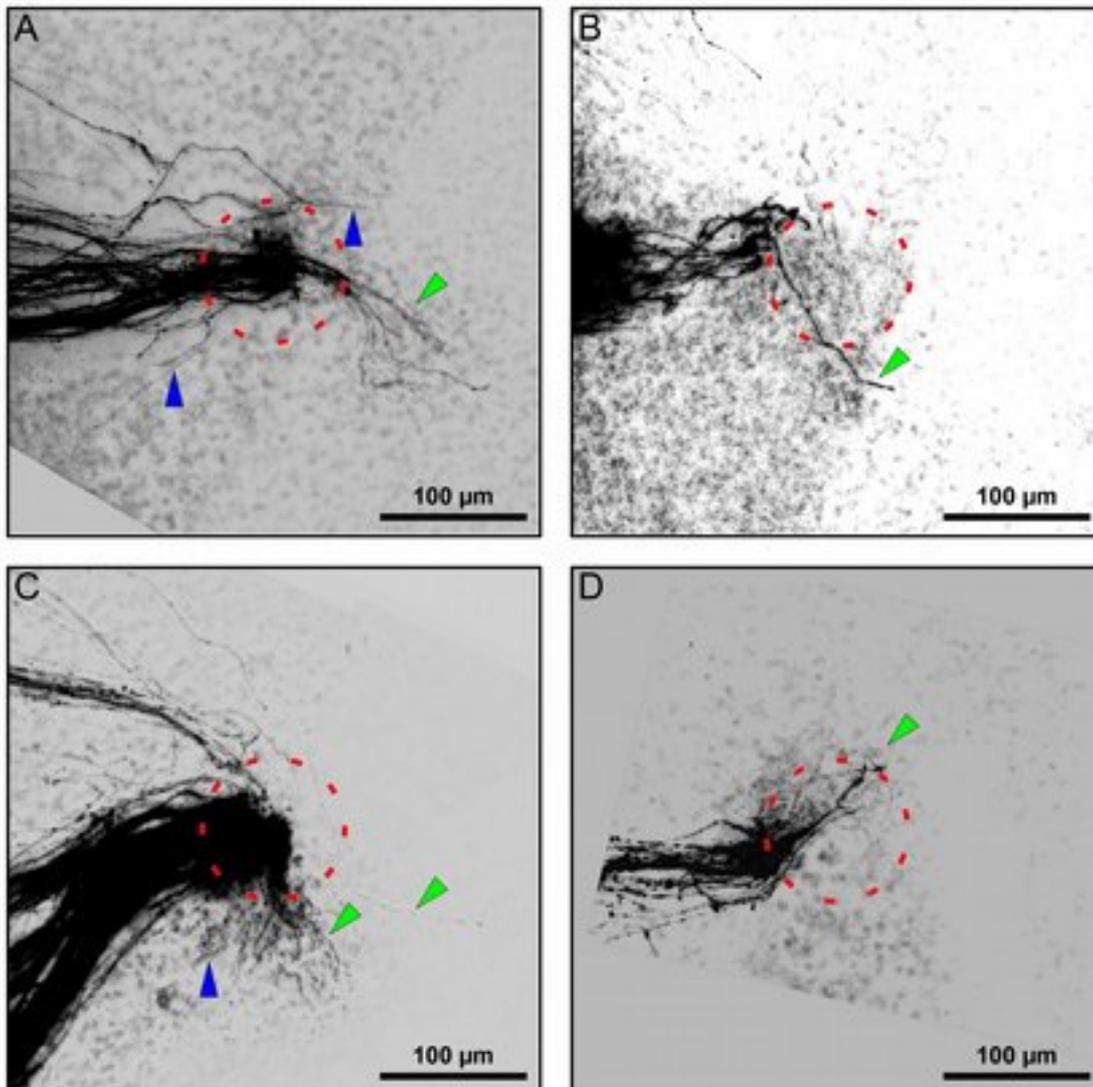


Abbildung 29: Markierte Axon-Subpopulationen in repräsentativen k.o. Retinae (A – D) erreichen den SNK (gestrichelter Kreis, rot) und tauchen aus der Bildebene weg. Einzelne Axone bzw. dünne Faszikel fehlnavigieren und verlassen das Gebiet des SNK (A – D, grüne Pfeilköpfe) ohne erhebliche Richtungsänderung. In einem Drittel dieser Retinae verlassen fehlnavigierende Axone den SNK entgegen ihrer ursprünglichen Richtung (A, C, blaue Pfeilköpfe).

#### **4.2 Fehl Navigierende RGZ-Axone tauchen in den SNK ein, verlassen diesen jedoch wieder, um in die gegenüberliegende Retina einzudringen**

Um zu analysieren, in welchem Bereich des SNK die Axone fehl navigieren, wurden Z-Stapel Bilder aufgenommen, die von der Ebene der OFS bis zu 85  $\mu\text{m}$  tief in das Retina-Gesamtpräparat eindringen. In den Z-Stapeln von w.t.-Retinae sind die RGZ-Axone am SNK nach etwa 30  $\mu\text{m}$  statt als längliche, in der Bildebene verlaufende Struktur nur noch als punktförmige (im rechten Winkel zur Bildebene verlaufende) Strukturen zu erkennen. In den k.o.-Retinae, in denen fehl navigierende RGZ-Axone markiert wurden, tauchen diese zunächst auch am SNK ab, ändern ihre Richtung jedoch erneut in durchschnittlich  $51 \pm 10 \mu\text{m}$  Tiefe in der Retina (n=9). Sie fehl navigieren damit nicht in die OFS der gegenüberliegenden Seite der Retina. Die RGZ-Axone wachsen im Übergangsbereich zwischen innerer und äußerer neuroblastischen Schicht in Richtung Peripherie.

2 von 10 w.t.-Retinae zeigen fehl navigierende Axone am SNK. Für eines der Präparate zeigt die Tiefenvermessung, dass die scheinbar fehl navigierenden Axone in nur 26  $\mu\text{m}$  Tiefe und damit noch in der OFS vom erwarteten Verlauf abweichen. Daher sollte es sich bei den fehl navigierenden Axonen um ein anderes Phänomen als bei den durchweg tiefer im Präparat fehl navigierenden Axonen im MAP1B-k.o. handeln. Die fehl navigierenden Axone in der anderen w.t.-Retina befinden sich jedoch mit 72  $\mu\text{m}$  Tiefe im Bereich dessen, was auch beim k.o. beobachtet wird, und fehl navigieren ebenfalls in den Übergangsbereich zwischen INBS und ANBS.

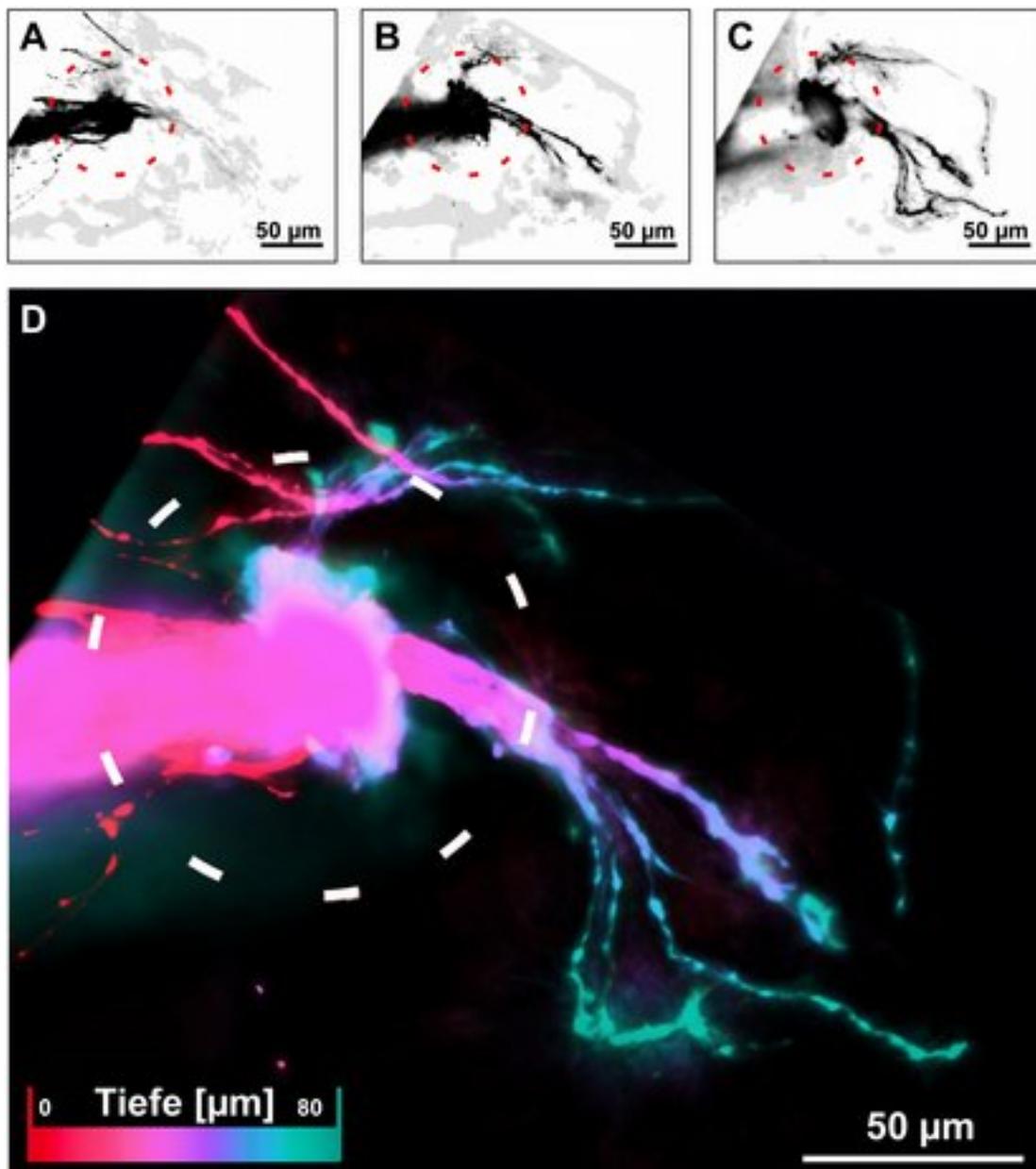


Abbildung 30: Tiefenvisualisierung einer Z-Stapel-Aufnahme navigierender Axone am SNK (gestrichelter Kreis). Erweiterte-Schärfentiefe-Darstellung („extended depth-of-field“) des oberen (A), mittleren (B) und tieferen (C) Teils eines 80 µm umfassenden Z-Stapels (27 µm je Teil). Gesamtdarstellung (D) des Stapels mit farbkodierter Tiefe: von der Glaskörperseite des OFS (Tiefe 0 µm, rot) bis zu den am tiefsten im SNK gelegenen Axonen (Tiefe 80 µm, türkis). Im SNK tauchen korrekt navigierende Axone durch alle Ebenen aus der Retina ab und verlassen diese (Überlagerung von Rot, Magenta und Türkis zu weißen Bereichen). Fehl Navigierende Axone verlassen den Bereich des SNK erst in einer Tiefe von ca. 70 µm (hellblau und türkis).

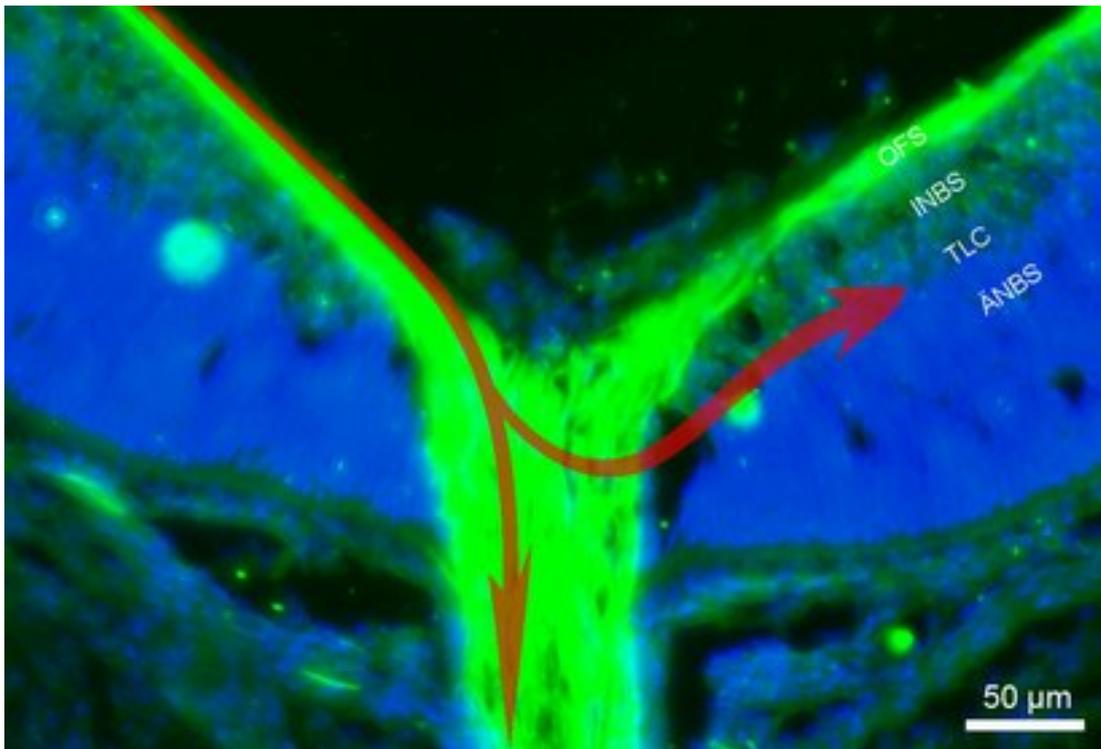


Abbildung 31: Routenverlauf der fehlnavigierenden Axone. Detailansicht des SNK eines k.o. Auges im Kryostatschnitt. Axone mit L1CAM gefärbt (grün), Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Als weitere Strukturen sind Blutgefäße auf der OFS und Pigmentepithel unterhalb der Neuroretina zu erkennen (Autofluoreszenz, blassgrün, und Zellkerne, blau). Der Großteil der Axone navigiert auch im k.o. korrekt und verlässt das Auge in den optischen Nerv (roter Pfeil nach unten). Fehl Navigierende Axone verlassen den Bereich des SNK (roter Pfeil zur rechten Seite) in einer Tiefe von durchschnittlich  $51 \pm 10 \mu\text{m}$  in das TLC in der gegenüberliegende Retina.

### 4.3 Dreidimensionale Mikroskopie von Augen-Gesamtpräparaten

Aufgrund des ungewöhnlichen Phänotyps wird eine detaillierte dreidimensionale Aufklärung der Lage der fehlnavigierenden Axone nötig. In dieser Arbeit wird eine Methode entwickelt, lokale Subpopulationen von Axonen in der intakten (ungeschnittenen) Retina mit Dil zu markieren und in einer Auflösung von  $0,388 \times 0,388 \times 1 \mu\text{m}$  den gesamten Bereich des SNK zu dokumentieren (siehe Abbildung 32). In den 3 untersuchten w.t.-Augen fanden sich keine Anzeichen für fehlnavigierende Axone. Aus den Daten können dann aussagekräftige 3D-Bilder erstellt werden, die den exakten Verlauf fehlnavigierender Axone in der Neuroretina wiedergeben. Die ermittelte optimale Anregungswellenlänge für Dil im verwendeten Multiphotonenmikroskop beträgt 950 nm. Diese Auflösung ist ausreichend, um einzelne Axone im SNK-Gewebe zu visualisieren. Im Rahmen der Arbeit war es nicht mehr möglich, eine Analyse von Dil markierten RGZ-Axonen von k.o.-Embryonen mit dieser Methode durchzuführen.

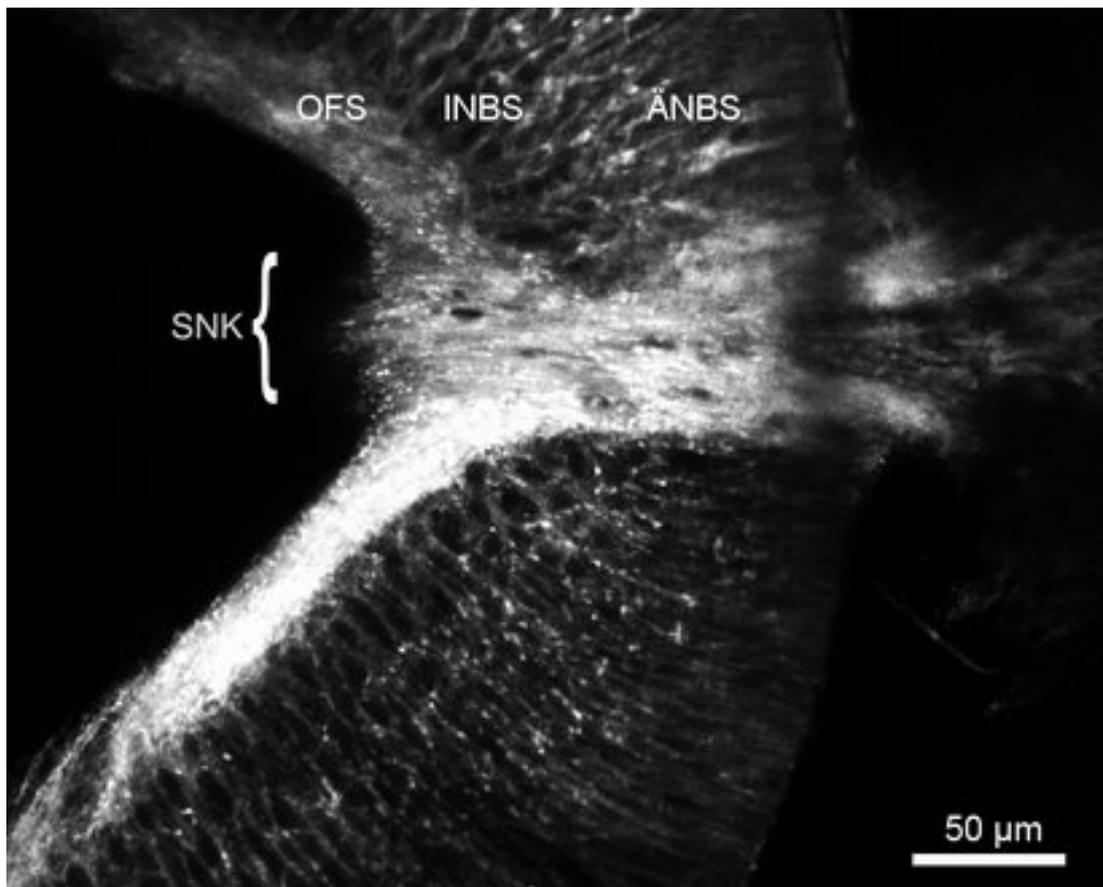


Abbildung 32: Detailansicht einer unbeschädigten (ungeschnittenen) Neuroretina (Gesamtpräparat), mit 2-Photonen Mikroskopie dokumentiert. Axone der OFS, die von unten links zum SNK wachsen, mit Dil markiert. Weiterhin sind die OFS auf der gegenüberliegenden Seite des SNK sowie innere (INBS) und äußere neuroblastische Schicht (ÄNBS) zu erkennen. Im Bildstapel sind keine in die gegenüberliegende Neuroretina fehl navigierenden RGZ-Axone zu erkennen.

## 5 RGZ-Axon-Verhalten in vitro

### 5.1 Die Wachstumsdynamik von RGZ-Axonon variiert stärker im k.o.

Um zu klären, wie die erhöhte Anzahl von Defaszikulierungen und möglicherweise das Fehl Navigieren am SNK zustande kommen, wurde die Dynamik der RGZ-Axone auf homogenem Laminin-Substrat untersucht. Das Substrat mimikriert die Laminin enthaltende Basallamina an der Grenze der OFS zum Glaskörper, an der die RGZ-Axone entlangwachsen. Bei der Analyse ergeben sich für die jeweils 9 Spuren keine Unterschiede in den Durchschnittswerten der Spurlänge (w.t.  $115 \pm 46 \mu\text{m}$ ; k.o.  $142 \pm 43 \mu\text{m}$ ), der zurückgelegten Distanz (w.t.  $29 \pm 26 \mu\text{m}$ ; k.o.  $34 \pm 38 \mu\text{m}$ ) oder der sich aus dem Quotient von Distanz und Spurlänge ergebenden Wachstumseffizienz (w.t.  $0,25 \pm 0,19$ ; k.o.  $0,21 \pm 0,22$ ). Es zeigt sich ebenfalls kein Unterschied zwischen w.t. und k.o. im Winkelunterschied zwischen der Distanzlinie (Verbindung von Start- und Endpunkt der Spur) und der Trendlinie (lineare Regression der Wachstumsrichtung), was auf ein stärker zur Seite abweichendes Wachstum hingedeutet hätte. Die Winkelabweichung beträgt im w.t.  $11 \pm 12^\circ$  und im k.o.  $18 \pm 21^\circ$ .

Es fällt erneut auf, dass die Spuren der MAP1B-k.o. RGZ-Axone im Gegensatz zum w.t. sehr inhomogen sind. Die Standardabweichung der durchschnittlichen Dauer der Vorwärtsphasen ist mit  $\sigma = 48 \text{ s}$  im w.t. und  $\sigma = 140 \text{ s}$  (292% des w.t.-Wertes) im k.o. fast um Faktor drei erhöht (F-Test;  $p < 0,01$ ). Die maximale Y-Bewegung in den Stoppphasen (Seitwärtsbewegung des Wachstumskegel-Halses, während keine Bewegung in Wachstumsrichtung stattfindet) ist im Durchschnitt der Spuren mit  $0,8 \pm 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$  im w.t. und  $2,1 \pm 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  nicht signifikant unterschiedlich. Die Standardabweichung ist gegenüber dem w.t. mit  $\sigma = 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$  im k.o. mit  $\sigma = 2,3 \mu\text{m}/\text{min}$  (288% des w.t.-Wertes) erhöht (F-Test;  $p < 0,01$ ). Die durchschnittliche Y-Bewegung in den Rückzugsphasen (Seitwärtsbewegung des Wachstumskegel-Halses, während er sich gegen die Wachstumsrichtung bewegt) ist mit  $0,1 \pm 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$  im w.t. und  $0,2 \pm 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$  im k.o. nicht signifikant unter-

schiedlich. Auch hier ist jedoch die Standardabweichung mit  $\sigma = 0,3 \mu\text{m}/\text{min}$  für den w.t. im k.o. mit  $\sigma = 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$  (267% des w.t.-Wertes) signifikant erhöht ( $p < 0,01$ ). Die Dynamik des Wachstumskegel-Halses ist im Durchschnitt im k.o. nicht signifikant verändert, weist jedoch eine um Faktor zwei bis drei erhöhte Varianz in manchen Parametern auf.

Die Unterschiede in der Dynamik führen zu sehr unterschiedlichen Spuren der k.o.-Axone: Zwei der 9 k.o.-Spuren erreichen die doppelte Distanz der längsten w.t.-Spuren (siehe Abbildung 33 B). Einige der k.o.-Axon Spuren sind den langen w.t.-Axon Spuren hingegen sehr ähnlich (siehe Abbildung 34). Die kürzesten Axon Spuren sind im k.o. kürzer als im w.t., weichen zudem deutlich weiter zu den Seiten ab als die kürzesten w.t.-Axon Spuren (siehe Abbildung 35 C).



Abbildung 33: Wachstumskegel-Spuren auf homogenem Laminin: Jeweils 9 Spuren von w.t. (A) und k.o.-Wachstumskägeln (B) auf  $10\ \mu\text{g}$  Lamininsubstrat. Spuren starten am Ursprungspunkt (0,0) und wurden so gedreht, dass der Wachstumstrend (lineare Regressionslinie der Spur) der X-Achse entspricht. Jeder Punkt auf der Spur entspricht der Position des Wachstumskegels alle 60 s (Gesamtdauer jeder Beobachtung 30 min).

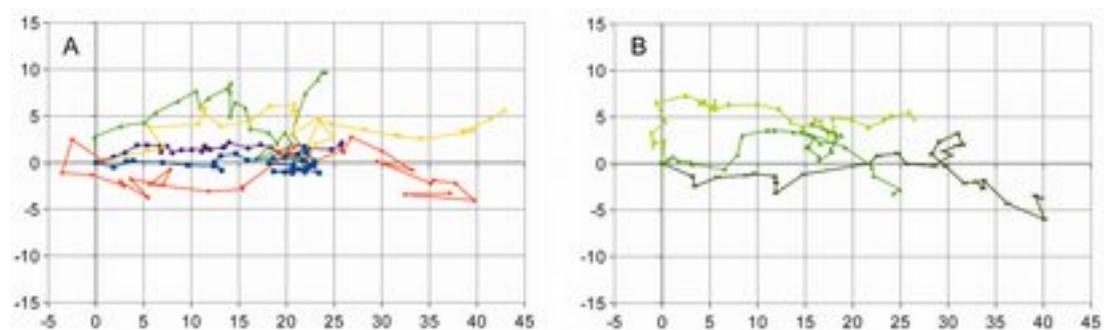


Abbildung 34: Darstellung der Spuren mittlerer Distanz: Spuren von w.t. (A) und k.o. (B) mit einer Länge in Trendrichtung von 20 bis  $45\ \mu\text{m}$ . Eine Minute pro Punkt, Gesamtdauer der verfolgten Spuren 30 Minuten.

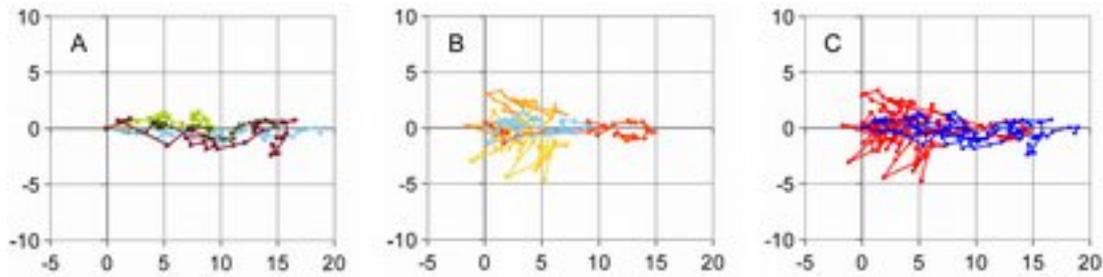


Abbildung 35: Darstellung der Spuren kurzer Distanz: Spuren von w.t. (A) und k.o.-Axonen (B) mit einer Länge in Trendrichtung von  $< 20 \mu\text{m}$ . Kombination der w.t. (blau) und k.o.-Spuren (rot) (C). Eine Minute pro Punkt, Gesamtdauer der verfolgten Spuren 30 Minuten.

Um die Axon-Dynamik weiter zu charakterisieren, werden Dynamogramme der Zeitrafferaufnahmen erstellt. Diese Analyse kategorisiert die Axon-Dynamik als Vorwärts-, Stopp- und Rückwärtsphasen. Dies ermöglicht die Auswertung der durchschnittlichen Dauer der Phasen, deren Häufigkeit pro Stunde sowie die Analyse der Parameter Geschwindigkeit der Bewegung und minimale bzw. durchschnittliche Abweichung von der Wachstumsrichtung in Abhängigkeit vom aktuellen Verhalten des Axons. Der Vergleich der Durchschnittswerte der Dynamogramm-Parameter ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen w.t. und k.o.-Axonen. Dass es sich bei den deutlich veränderten Parametern wie z.B. der durchschnittlichen Dauer der Vorwärtsphasen von 129 s im w.t. und 178 s (138% des w.t.-Wertes) im k.o. und der durchschnittlichen Geschwindigkeit in der Rückwärtsphase von  $-73 \mu\text{m}/\text{min}$  im w.t. und  $-91 \mu\text{m}/\text{min}$  (125% des w.t.-Wertes) im k.o. nicht um signifikante Unterschiede handelt, ist den großen Standardabweichungen geschuldet.

Aus den Dynamogrammen können weitere Dynamikunterschiede abgelesen werden. Während es im gesamten w.t.-Datensatz nur drei Rückzugsphasen gibt, die länger sind als eine Minute, enthält der k.o.-Datensatz davon sieben. Trotz der hohen Zahl langer Rückzugsphasen gibt es im k.o.-Datensatz die Spuren 1 und 2, die so gut wie keine Rückzugsphasen und sehr lange Vorwärtsphasen enthalten, sie resultieren in zwei sehr langen Spuren (siehe

Abbildung 33 B, dunkelrote und violette Spur). Obwohl die k.o. Dynamogramme insgesamt nur zwei Pausephasen von mehr als zwei Minuten enthalten, die w.t.-Dynamogramme jedoch sieben, ergeben sich deutlich kürzere und weiter seitwärts gefächerte Spuren im k.o. (siehe Abbildung 35 C).

Abschließend lässt sich sagen, dass sowohl die Spuren als auch die Dynamogramme von k.o.-Axonen eine höhere Varianz und damit stärker vom Durchschnitt abweichende Fälle aufweisen als jene von w.t.-Axonen.

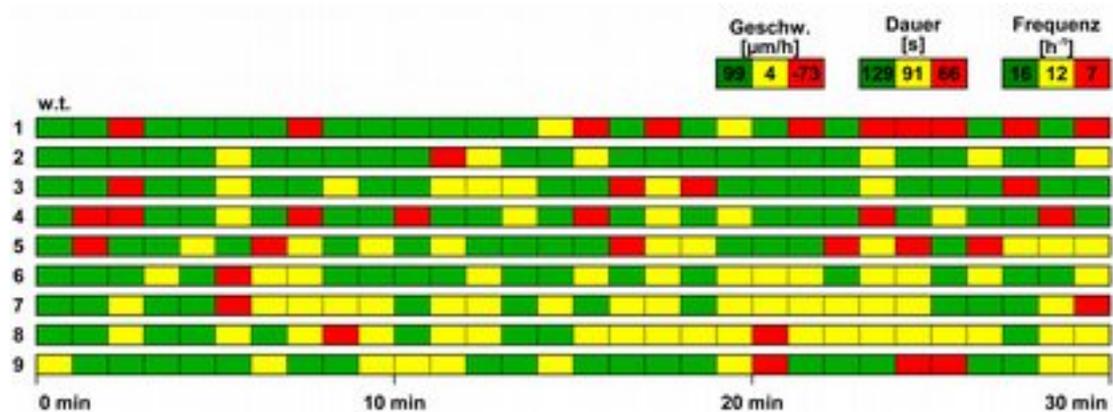


Abbildung 36: Dynamogramm der 9 w.t.-Axon Zeitrifferaufnahmen. Grün entspricht einer Vorwärtsphase, Gelb einer Stoppphase, Rot einer Rückzugsphase des Axons.

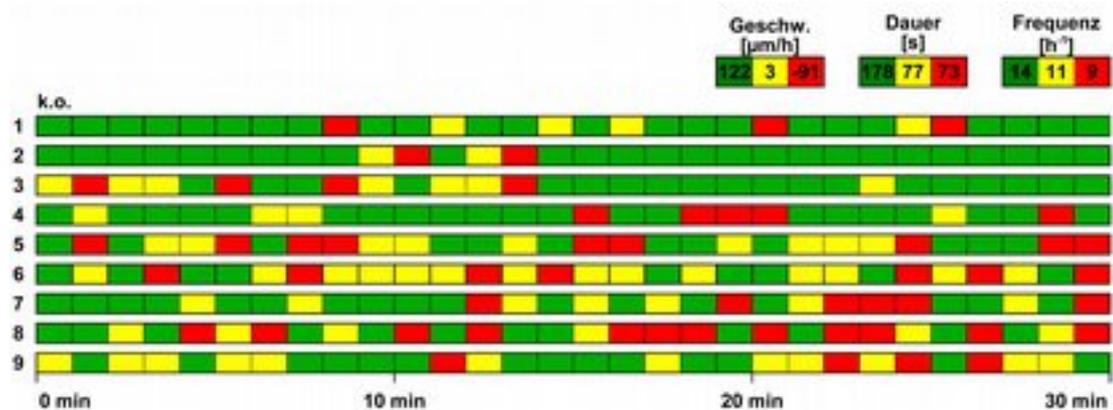


Abbildung 37: Dynamogramm der 9 k.o.-Axon Zeitrifferaufnahmen. Grün entspricht einer Vorwärtsphase, Gelb einer Stoppphase, Rot einer Rückzugsphase des Axons.

## 5.2 Die Wachstumskegel-Asymmetrie variiert stärker im k.o.

Durch einen größeren Wachstumskegel oder durch längere, die Umgebung in einem größeren Radius sondierende Filopodien könnte häufiger Kontakt mit einem Nachbarbündel hergestellt werden. In der Folge könnte ein häufigeres Wechseln auf ein Nachbarbündel in der OFS verursacht werden. Die Auswertung der Wachstumskegel-Dynamik zeigt, dass es in den Dimensionen beim Grundumfang des Wachstumskegels (w.t.  $57 \pm 15 \mu\text{m}$ ; k.o.  $66 \pm 18 \mu\text{m}$ ) und im Gesamtumfang inklusive aller Filopodien (w.t.  $118 \pm 58 \mu\text{m}$ ; k.o.  $128 \pm 44 \mu\text{m}$ ) keinen signifikanten Unterschied gibt. Auch die durchschnittliche Anzahl der Filopodien (w.t.  $9 \pm 5$ ; k.o.  $9 \pm 3$ ) und deren durchschnittliche Länge (w.t.  $3 \pm 1 \mu\text{m}$ ; k.o.  $4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ) und maximale Länge (w.t.  $30 \pm 10 \mu\text{m}$ ; k.o.  $36 \pm 16 \mu\text{m}$ ) unterscheiden sich nicht signifikant zwischen w.t. und k.o.-Wachstumskegeln. Die Grundflächen der Wachstumskegel (w.t.  $57 \pm 17 \mu\text{m}^2$ ; k.o.  $58 \pm 24 \mu\text{m}^2$ ) unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant. Die Rechts-links-Asymmetrie der Wachstumskegelflächen (w.t.  $50 \pm 3 \%$ ; k.o.  $55 \pm 10 \%$ ), sowie deren durchschnittliche (w.t.  $16 \pm 5 \%$ ; k.o.  $17 \pm 6 \%$ ) und maximale Asymmetrieänderung (w.t.  $30 \pm 10 \%$ ; k.o.  $37 \pm 16 \%$ ) sind im w.t. und k.o. nicht signifikant unterschiedlich.

Die Rechts-links-Asymmetrie der Wachstumskegel schwankt im w.t. zwischen 30% (die linke Fläche des Wachstumskegels macht 30%, die rechte Fläche 70% der Gesamtfläche aus) und 78% (linke Fläche 78%, rechte Fläche 22% der Gesamtfläche) bei einem Durchschnitt von  $50 \pm 3 \%$ . In k.o.-Wachstumskegeln schwankt sie zwischen 21% und 90% bei einem Durchschnitt von  $55 \pm 10 \%$ . Der Unterschied der Standardabweichung von  $\sigma = 3\%$  im w.t. und  $\sigma = 10\%$  (333% des w.t.-Wertes) ist signifikant ( $p < 0,05$ ).

Es kann somit vermutet werden, dass die Wachstumskegel von RGZ-Axonon im MAP1B-k.o. gegenüber den w.t.-RGZ-Axonon ihre Umgebung durch die größere Varianz ihrer Flächenasymmetrie weiträumiger erkunden können.

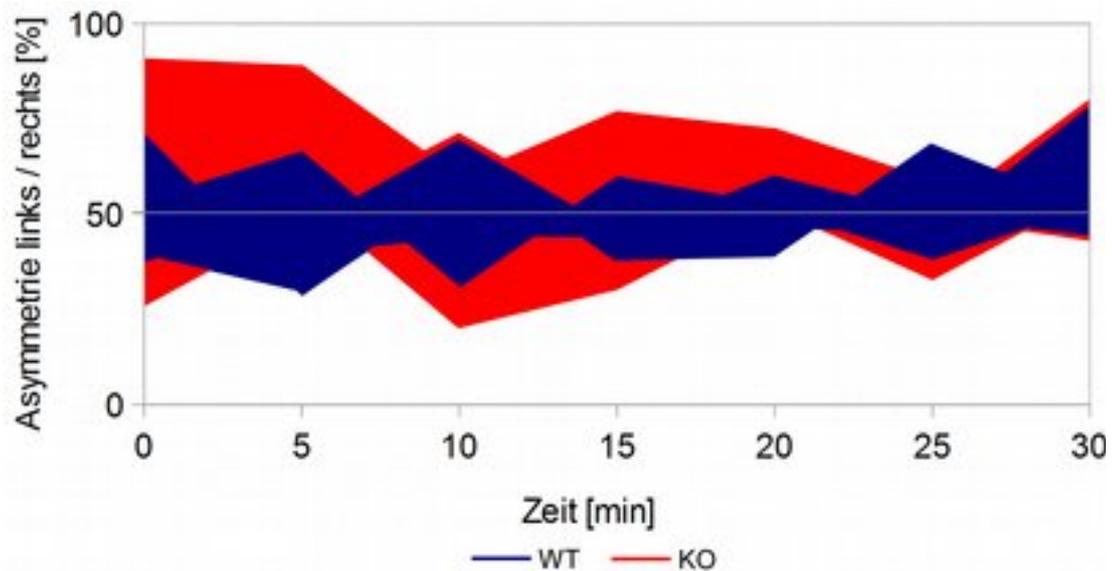


Abbildung 38: Dynamik der Rechts-links-Flächenasymmetrie im Verlauf von 30 min in jeweils 5 w.t. (blau) und k.o.-Wachstumskegeln (rot). Die Fläche stellt die Schwankungsbreite aller 5 Wachstumskegel zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Die w.t.-Wachstumskegel weichen weniger oft stark vom Durchschnitt ab als die k.o. Wachstumskegel.

### 5.3 RGZ-Axone bevorzugen Mikrostreifen mit ALCAM und faszikulieren auf diesen

Um der in vivo Situation näherzukommen als auf homogenem Laminin, wurde ein Präferenz-Assay für Maus Retinaexplantate im Labor etabliert. Die biomimetischen Muster stellen die RGZ-Axone vor die Wahl zwischen dem Wachsen auf Laminin (mimikriert Kontakt mit der Basal-Lamina) und Laminin plus ALCAM (mimikriert den gleichzeitigen Kontakt mit Basal-Lamina und anderen Axonen). Hierzu werden 100  $\mu\text{m}$  breite Substratstreifen mit ALCAM beschichtet und zusätzlich die gesamte Oberfläche homogen mit Laminin beschichtet. Das Zelladhäsionsmolekül ALCAM befindet sich auf RGZ-Axonen in der Retina und trägt dort zu Wegfindung und Faszikulierung bei. Die RGZ-Axone bevorzugen Streifen, die ALCAM enthalten, gegenüber den Streifen, die nur mit Laminin beschichtet sind. Die Axone faszikulieren auf den ALCAM-Streifen zu Bündeln, wobei einzelne Axone und dünne

Faszikel auch in der Lage sind, das ALCAM-Substrat zu verlassen. Axone, die aus den peripheren Bereichen der Explantate ( $> 600 \mu\text{m}$  von der Mitte) auswachsen, verlassen häufiger und früher die ALCAM-Substrat-Streifen.

In diesem Assay ist es sowohl möglich, eine verstärkte Präferenz der Axone (weniger Axone verlassen das ALCAM-Substrat) als auch eine reduzierte Präferenz (mehr Axone verlassen das ALCAM-Substrat) zu erkennen. Eine gestörte Faszikulierung wäre in dem Experiment ebenfalls erkennbar. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Präferenzversuche mit Explantaten aus MAP1B-k.o.-Retinae mehr durchgeführt werden.

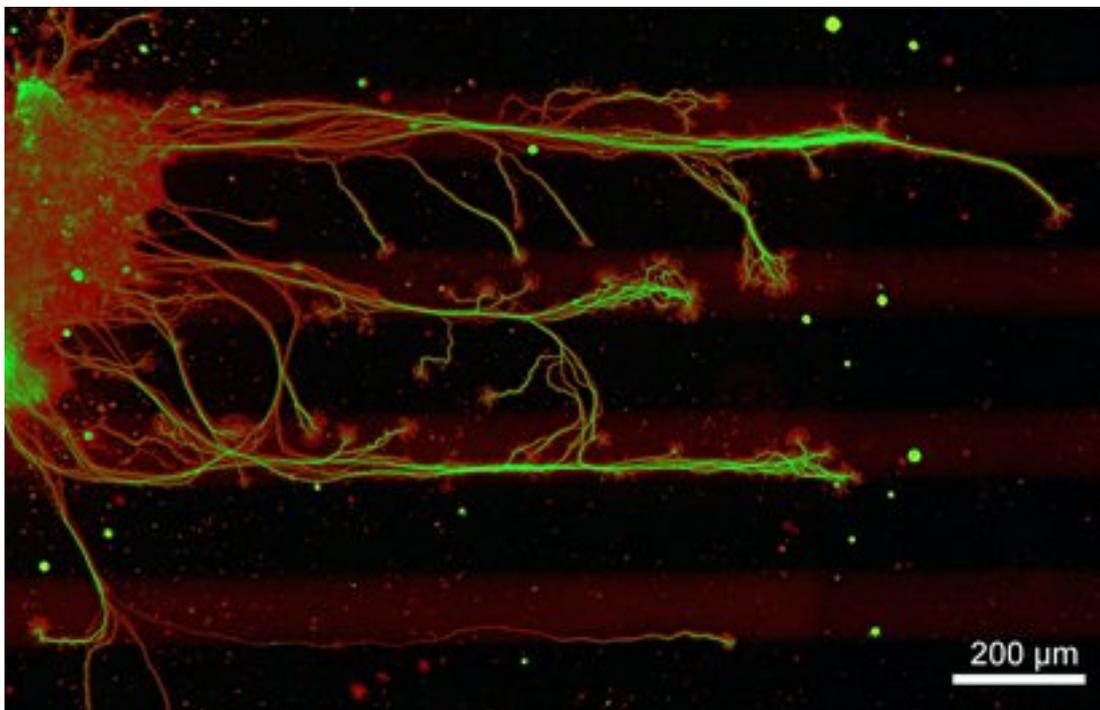


Abbildung 39: RGZ-Axone im Präferenz-Assay: Axone von RGZ aus Retinaexplantaten (E14,5). ALCAM auf den Substratstreifen und der Oberfläche der Axone (rot) und  $\beta$ III-Tubulin (grün) gefärbt. Im unteren Teil des Bildes sind deutlich peripher auswachsende Axone zu sehen, die Substratstreifengrenzen weniger respektieren.

## 6 RGZ-Axon-Verhalten in vivo

### 6.1 Wachstumskegel in Retina-Gesamtpräparaten wachsen dreimal so effizient wie auf Laminin-Substrat

Zur Aufklärung der Axon-Dynamik in der embryonalen Retina wurde die Lebendbeobachtung von einzelnen RGZ-Axonon in Retina-Gesamtpräparaten der Mausretinae etabliert. Durch das Stecken von DiO-Kristallen in den peripheren Bereich der Retina wurden Axon-Subpopulationen markiert und Zeitrafferaufnahmen einzelner Wachstumskegel gemacht. Die Aufnahmen wurden ähnlich den Aufnahmen von Wachstumskegeln auf homogenem Substrat quantifiziert und ausgewertet.

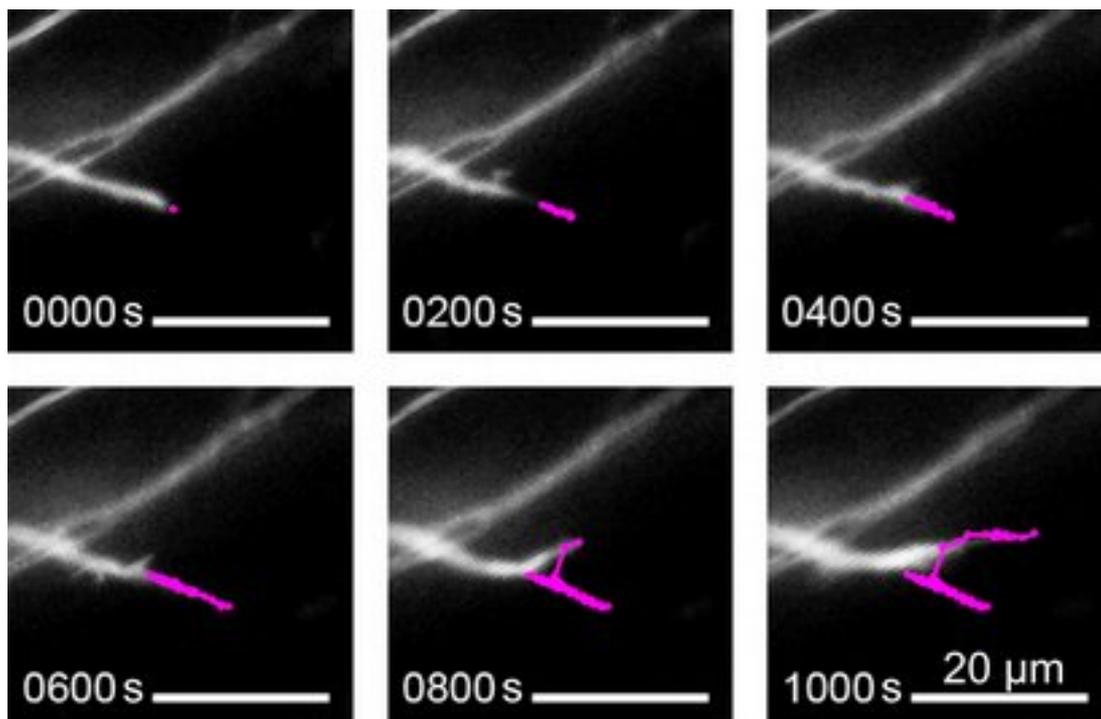


Abbildung 40: Axon-Dynamik im Retina-Gesamtpräparat. Serienbilder alle 200 s aus einer Zeitrafferaufnahme von 1200 s (20 min). Position der Wachstumskegel-Spitze alle 20 s markiert (Punkt, magenta) und Wachstumskegel-Spur (magenta).

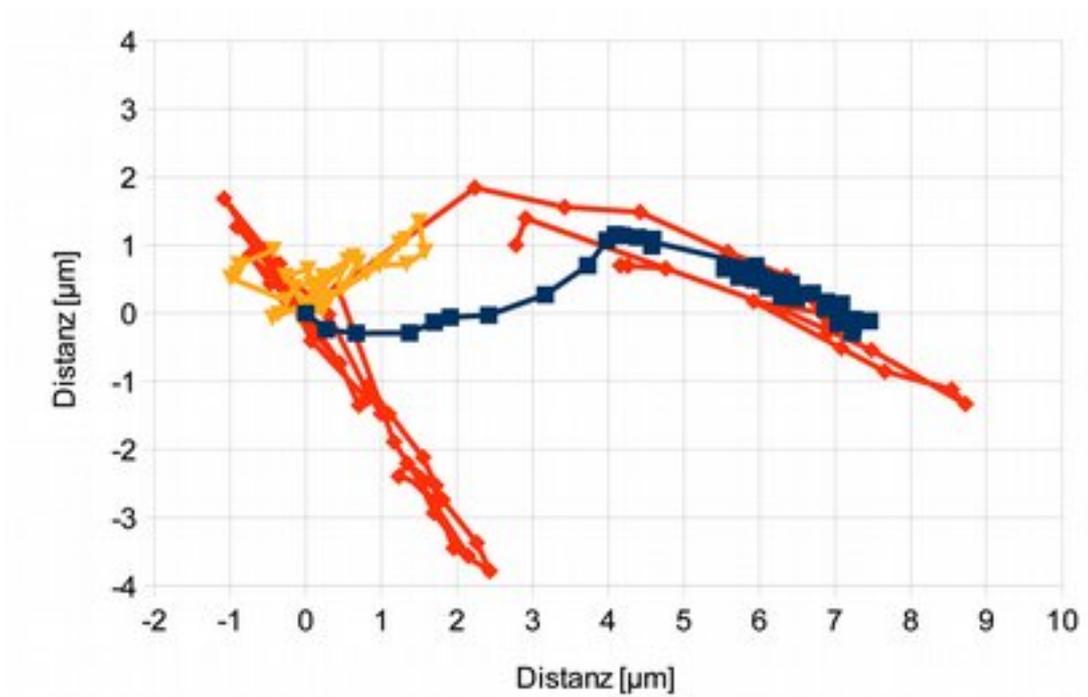


Abbildung 41: Spuren von 3 Wachstumskegeln in unterschiedlichen w.t.-Retina-Gesamtpräparaten. Alle Spuren starten im Ursprung (0,0) und sind mit der Trendlinie (lineare Regression) auf die X-Achse gedreht, sodass sie von links nach rechts wachsen. Gesamtlänge der Filme 20 Minuten.

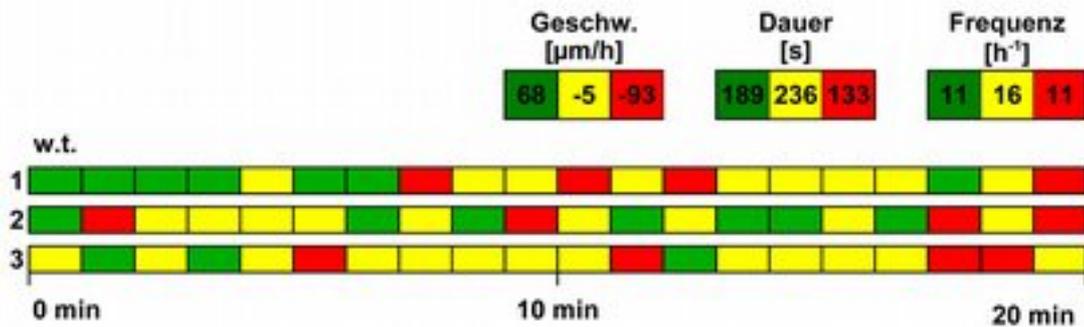


Abbildung 42: Axon-Dynamogramm der Spuren aus Retina-Gesamtpräparaten.

Die Filme liefern Daten zur Axon-Dynamik von Maus RGZ in der embryonalen Retina. Die durchschnittliche Länge der Spuren der beiden deutlich vorwärts wachsenden Wachstumskegel beträgt  $17\ \mu\text{m}$  und die Distanz  $13\ \mu\text{m}$ . Die sich ergebende Wachstumseffizienz liegt mit  $0,77$  dreimal höher als die der w.t.-Wachstumskegel auf Laminin-Substrat mit  $0,25$ . Das Drehen der Tracks und eine erste, automatisierte Auswertung erweisen sich als schwierig. Manche Wachstumskegel wachsen geradeaus an einem Bündel entlang (siehe Abbildung 41, blaue Spur), während andere Wachstumskegel sich (vermutlich auf einem Bündel, auf dem sie gewachsen sind) zurückziehen und dann eine andere Richtung einschlagen (siehe Abbildung 40 und Abbildung 41, rote Spur). Im Rahmen der Arbeit konnten keine Filme von Axonen in MAP1B-k.o.-Retinae mehr aufgenommen werden.

## **IV Diskussion**

### **1 Entwicklung der Neuroretina unter MAP1B-k.o.**

MAP1B wird u.a. bereits von neuronalen Vorläuferzellen, den Neuroepithelialzellen, exprimiert und in seiner Expression und Typ-I Phosphorylierung erst im adulten Nervensystem reduziert (Cheng et al., 1999; Gonzalez-Billault et al., 2001; Riederer et al., 1993; Schoenfeld et al., 1989). Der k.o. von MAP1B betrifft daher die gesamte undifferenzierte Neuroretina (OFS + INBS + ÄNBS). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Neuroretina E14,5 im k.o. peripher 10%, zentral 20% dünner ist als die w.t.-Neuroretina. Die Dicke der OFS und ihre zentral-periphere Ausbreitung entsprechen in k.o.-Embryonen derjenigen in w.t.-Embryonen. Eine reduzierte Differenzierung von RGZ würde sich in einer reduzierten Anzahl von RGZ-Axonen und somit einer dünneren OFS widerspiegeln. Eine verzögerte Differenzierung würde wahrscheinlich auch eine Verschiebung des zentral-peripheren Differenzierungsgradienten bewirken. Die maximale periphere Ausbreitung der Neuroretina ist jedoch in k.o. und w.t. annähernd gleich. Da beides nicht der Fall ist, bleiben als mögliche Erklärungen für die dünne Neuroretina im k.o. eine verringerte Proliferation bzw. erhöhte Apoptose von Neuroepithelialzellen, eine Verdichtung des Gewebes durch eine Störung von Zellwanderungen oder eine Volumenabnahme der Zellen. Eine Volumenabnahme der Zellen ist die unwahrscheinlichste Möglichkeit. Das Zellvolumen ist für RGZ strikt reguliert, selbst in Einzelzellkultur *in vitro* behalten RGZ ihr Volumen bei. Die Einzelzellkulturen von k.o.-Retinae enthielten ebenfalls nicht auffällig kleine Zellen.

An der in dieser Arbeit verwendeten MAP1B-k.o.-Mauslinie wurde ein Regenerations-Assay mit Schwanzzellen (die MAP1B während der Wundheilung exprimieren, proliferieren und dann in die Wunde einwandern) durchgeführt. Im k.o. ist die Proliferation der Schwanzzellen (BrdU-Inkorporation) nicht verändert, sie wandern jedoch deutlich langsamer und

weniger weit in die Wunde ein (Bouquet et al., 2007). In der Untersuchung an einer weiteren MAP1B-k.o.-Mauslinie, die noch eine verkürzte Form von MAP1B exprimiert, wurde festgestellt, dass sich die Anzahl der in Zellkultur differenzierten Neuroblasten, die Neurite ausprägen, im k.o. nicht vom w.t. unterscheidet. In der gleichen Untersuchung wurden Zellwanderungsdefekte im MAP1B-k.o. beschrieben, die zu einem Aufspalten der CA1 Region des Hippocampus führen (Takei et al., 2000). Die Schichten der Neuroretina im adulten MAP1B-k.o. sind unauffällig (Meixner et al., 2000) Es scheint daher unwahrscheinlich, dass eine reduzierte Zellwanderung im MAP1B-k.o. zu einer dichter gepackten und damit dünneren Neuroretina E14,5 führt. Ein Effekt durch dichter gepackte Neuroepithelzellen ist jedoch nicht auszuschließen. Ein Zeitrafferfilm markierter Neuroepithelialzellen in Retina-Gesamtpräparaten würde das Migrationsverhalten der Vorläuferzellen aufklären können. In hochauflösenden Mikroskopaufnahmen könnten die Größe und der Abstand der Neuroepithelialzellen quantifiziert werden um diese Möglichkeit weiter zu untersuchen.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Daten zur Rolle von MAP1B in der Apoptose. Zum einen gibt es Belege für eine aktive Beteiligung von MAP1B an Apoptose (Allen et al., 2005; Fifre, 2005; Harrison et al., 2008), zum anderen Belege für eine vor Apoptose schützende Funktion von MAP1B (Lee et al., 2008). Ein Fehlen von MAP1B könnte also in der MAP1B-k.o.-Maus eine erhöhte Apoptose der Neuroepithelialzellen hervorrufen. In einer anderen als der verwendeten MAP1B-k.o.-Mauslinie wurde nach der Geburt ein 20% niedrigeres Gehirngewicht im MAP1B-k.o. festgestellt (Takei et al., 2000). Eine reduzierte Proliferation oder eine erhöhte Apoptose im k.o. sind also anzunehmen. In der Retina finden die prenatalen Apoptosewellen E10 und E17 statt. Die Apoptosewelle der Retinazellen E10 findet im zentralen Bereich der Retina statt, wenn sich der SNK bildet. Embryonales Gewebe ist sehr regenerationsfähig. Stichverletzungen, z.B. bei der Injektion von DNA für eine Transfektion, verheilen, ohne Spuren zu hinterlassen (Odani et al.). In dieser Arbeit wurde

gezeigt, dass die Retina zentral 20% dünner ist im k.o. und der Unterschied zum w.t. sich nach peripher verringert. Es ist daher anzunehmen, dass in der E10 Apoptosewelle im MAP1B-k.o. mehr Neuroepithelialzellen sterben als im w.t. und dies durch eine Umverteilung der peripheren Zellen so weit ausgeglichen wird, dass E14,5 ein normal gebautes Auge mit einer dünneren Neuroretina vorliegt.

Klarheit über eine eventuell reduzierte Proliferation der Neuroepithelialzellen im k.o. könnte ein Versuch mit BrdU – einem Farbstoff, der mit der DNA von Zellen interkaliert, die durch eine S-Phase gegangen sind – bringen. Der Farbstoff kann der trächtigen Maus intraperitoneal injiziert werden und färbt dann auch die proliferierenden retinalen Zellen der Embryonen. Diese Technik ist für Augen von Mausembryonen bereits angewendet worden (Liu et al., 2012). Für die Untersuchung der Apoptose in der embryonalen Retina kann eine TUNEL Färbung verwendet werden, bei der ein Farbstoff die freien 3'-OH Gruppen der in der Apoptose fragmentierten DNA markiert. Auch diese Technik ist bei embryonalen Mausretinae bereits angewendet worden (Péquignot et al., 2003). Der Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf dem Verhalten der Axone, daher wurden diese Ansätze nicht weiter verfolgt.

## 2 Verhalten der RGZ-Wachstumskegel in vitro

MAPB1 ist im Wachstumskegel in der Embryonalentwicklung und in der Regeneration des Nervensystems exprimiert und Typ-I phosphoryliert. Es kann Mikrotubuli in einem Teil des Wachstumskegels stabilisieren und in einem anderen Teil an den Aktin-Rückfluss koppeln und zurückziehen. All diese Funktionen erfüllt es unter der Kontrolle von Kinasen und Phosphatasen, die Signale wichtiger Botenstoffe integrieren und vermitteln, z.B. Netrin und Semaphorin. Trotz dieser zentralen Rolle und vielseitigen Funktionen von MAP1B hat der k.o. einen verhältnismäßig milden Phänotyp: Das *Corpus callosum* fehlt, was auf Defekte in der Axonavigation hindeutet, Ausdauer und Erkundungsverhalten sind reduziert, und einige Tiere sterben vor dem Erreichen des Erwachsenenalters. Dennoch verfügen die Tiere über ein funktionierendes Nervensystem und sind im Großen und Ganzen gesund und lebensfähig.

Andere Mikrotubuli-stabilisierende MAPs sind teilweise mit überlappender Funktion beschrieben (Bosc et al., 1996; Gleeson et al., 1999; Jean et al., 2012; Koester et al., 2007; Slaughter & Black, 2003). Es ist jedoch bekannt, dass in neonatalen und erwachsenen homozygoten MAP1B-k.o.-Mäusen keine Veränderung in der Expression der klassischen MAPs (MAP2a, b, c und Tau) stattfindet, die das Fehlen von MAP1B kompensieren könnte (Meixner et al., 2000). Es scheint unwahrscheinlich, dass sich für Tau oder MAP2 bei k.o.-Tieren E14,5 von den neonatal festgestellten Expressionen Abweichungen ergeben, da auch in der neonatalen Maus Neurone Axone aussenden und im w.t. MAP1B exprimieren. Eine Bestimmung der relativen Proteinmengen von MAP2, Tau, Doublecortin, Mtap6 und APC bei MAP1B-k.o.-Tieren an E14,5 könnte aber zusätzliche Hinweise ergeben.

Die Dynamik von RGZ-Axonon im MAP1B-k.o. ist generell betrachtet wenig auffällig. Die Geschwindigkeit des Axonwachstums, die Seitwärtsbewegung während des Axonwachstums und die Asymmetrie des Wachstumskegels

unterscheiden sich im Durchschnitt nicht von w.t.-Wachstumskegeln. Erhebliche Unterschiede zwischen w.t. und k.o. zeigen sich in der Varianz des Wachstumskegel-Verhaltens. Betrachtet man die von den Axonen zurückgelegten Spuren, so fällt auf, dass sowohl die längsten Spuren (doppelt so lang wie sämtliche w.t.-Spuren) als auch die kürzesten Spuren von k.o.-Axonen zurückgelegt wurden (siehe III 5.1). Auch die Seitwärtsbewegung des Axons und die Asymmetrie des Wachstumskegels variieren im k.o. stärker als im w.t. (siehe Abbildung 38). Eine Varianzanalyse zeigt, dass diese Unterschiede signifikant sind.

Die durchschnittliche Dauer der Vorwärtsphasen im k.o. (138% des w.t.-Wertes) und die durchschnittliche Geschwindigkeit in der Rückzugsphase (125% des w.t.-Wertes) in k.o.-Axonen sind nicht signifikant unterschiedlich zu w.t.-Axonen. Bei den unerwartet hohen Varianzen der Parameter im k.o. sind signifikante Unterschiede nur mit hohen Versuchszahlen nachweisbar. Eine weitere Erhöhung der Versuchszahlen würde Klarheit bringen, ob die sich abzeichnenden Unterschiede signifikant sind, da sich die Standardabweichung nicht weiter verändern, aber ein Unterschied deutlicher hervortreten sollte. In dieser explorativen Studie kann nur gemutmaßt werden, wie die einzelnen ausgewerteten Parameter miteinander zusammenhängen. Daher ist es schwierig bis unmöglich, in der statistischen Auswertung für die Zahl durchgeführter T- und F-Tests (z.B. nach der Bonferroni-Methode) zu kompensieren (Bender & Lange, 2001).

Die Varianz der Wachstumsphasendauer ist im k.o. erhöht, die Standardabweichung ist fast dreimal so hoch wie die der w.t.-Axone. Die Standardabweichung der maximalen Seitwärtsgeschwindigkeit in Stoppphasen ist im k.o. fast um Faktor drei erhöht gegenüber w.t.-Axonen. Die Standardabweichung der durchschnittlichen Seitwärtsbewegung in Rückzugsphasen ist um Faktor zweieinhalb erhöht bei k.o.-Axonen gegenüber den w.t.-Axonen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die k.o.-Axone wie die w.t.-Axone voranwachsen und eine generelle Richtung beibehalten. Sie bewegen sich jedoch unregelmäßiger vorwärts und mehr seitwärts. Die Rechts-links-Symmetrie der k.o.-Wachstumskegel ist geringer. Die Axonen der k.o.-RGZ wachsen weniger strikt reguliert, da ihnen MAP1B fehlt, um die Varianz ihrer Seitwärtsbewegungen auf das w.t.-Maß zu reduzieren. Diese Aufgabe von MAP1B kann nicht vollständig von den übrigen MAPs kompensiert werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Hinterwurzelganglien-Axone (HWG) der MAP1B-k.o.-Maus zwar auf die gleiche durchschnittliche Länge wie die w.t.-Axone wachsen, sich jedoch doppelt so oft seitlich verzweigen (Bouquet, 2004). In w.t.-Retina-Gesamtpräparaten konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass sich Wachstumskegel bei Richtungsänderungen zunächst auf dem Faszikel, auf dem sie gewachsen sind, zurückziehen und dann eine neue Richtung einschlagen (siehe Abbildung 40). Bei RGZ-Axonen ist die Wachstumskegel-Verzweigung streng reguliert und geschieht erst im Zielgebiet, die Mechanismen sind jedoch nicht genau beschrieben. Wo HWG-Axone ihren Wachstumskegel zweiteilen, bewegt sich vermutlich der RGZ-Wachstumskegel nur hin und her. Daher gibt es vermutlich eine Ähnlichkeit mit dem häufigeren Zweiteilen der k.o.-HWG-Wachstumskegel und der Seitwärtsbewegung und Asymmetrie der k.o.-RGZ-Wachstumskegel. MAP1B ist jedoch nicht alleine für das Verhindern des Zweiteilens des Wachstumskegels zuständig, denn es wurde kein einziger Fall einer Zweiteilung in den k.o.-Axonen beobachtet.

Eine Form des Rückzugs von Axonen, die durch Stickoxid ausgelöst wird, ist im MAP1B-k.o. inhibiert (Tojima et al., 2009). Ein Rückzugssignal könnte ohne Gabe hoher Mengen Signalstoffe spontan und sehr abgeschwächt auftreten. Eine solche Reaktion könnte in ihrer weniger drastischen Form einem Stopp anstatt eines vollständigen Kollapses gleichkommen. Dies würde die unregelmäßigere (und vielleicht verlängerte) Dauer der Wachs-

tumsphasen in den k.o.-Wachstumskegeln erklären, da die k.o.-Axone weniger häufig darin unterbrochen würden.

In dieser Arbeit wurde ein Präferenz-Experiment mit sich abwechselnden Substratstreifen für Retina-Explantate aus Maus etabliert. Das Grundsubstrat ist Laminin, um generell ein Auswachsen der RGZ-Wachstumskegel zu ermöglichen. Jeder zweite Substratstreifen bietet zusätzlich das Zelladhäsionsmolekül ALCAM an, das auf RGZ-Axonen vorkommt. RGZ-Wachstumskegel der Mausretina bevorzugen ALCAM-Substrat und faszikulieren häufig in der Mitte der ALCAM-Streifen, was bereits von Huhn-Axonen bekannt ist (Avci et al., 2004). Die Konzentrationen von ALCAM und Laminin wurden experimentell so bestimmt, dass ein Teil der w.t.-Wachstumskegel sowohl das Axonbündel als auch den Axonbündel-mimikrierenden ALCAM-Streifen verlassen kann, (siehe Abbildung 39). Hiermit ist die Grundlage hergestellt, im MAP1B-k.o. Defaszikulierungen *in vitro* zu untersuchen. Verändert man die Anordnung der Streifen von einem linearen zu einem Zickzack-Muster, konfrontiert man alle wachsenden Wachstumskegel häufig mit Substratgrenzen, sodass auch Wendemanöver von MAP1B-k.o.-Axonen im Zeitraffer gefilmt werden können. Diese Versuche werden zurzeit mit Axonen aus k.o.-Embryonen durchgeführt und könnten Aufschluss über die Rolle von MAP1B bei diesen Wendemanövern geben.

Für diese Experimente werden Streifen aus der E14,5 Neuroretina von Maus gehackt. Diese Retina-Explantat-Streifen enthalten zentral RGZ, deren Axone den SNK vor der Entnahme bereits erreicht hatten (siehe Abbildung 17). Die aus dem zentralen Teil des Explantats wachsenden Axone sind also mit hoher Wahrscheinlichkeit regenerierende Axone. Die aus dem peripheren Teil des Explantats auswachsenden Axone sind dagegen Axone, die von den RGZ in der Kultur zum ersten Mal ausgeschickt werden. In den Experimenten mit w.t.-Retina-Explantaten deutet sich an, dass peripher auswachsende Axone seltener die ALCAM-Streifen respektieren (siehe

Abbildung 39). Die Experimente könnten nicht nur Aufschluss über das Regenerationsverhalten und Erstauswachsen von RGZ-Axonon liefern, sondern auch einen Einblick in die Rolle geben, die MAP1B dabei spielt.

MAP1B spielt eine zentrale Rolle in Wendemanövern. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass die Wachstumskegel von k.o.-HWG-Axonon an der Grenze zu einer Oberfläche, auf der sie keinesfalls wachsen können, Schwierigkeiten haben, ein Wendemanöver zu vollziehen: Ein Großteil der w.t.-Axone vollziehen eine Wende vom Substrat weg. Die Mehrheit der k.o.-Axone hält sich an der Grenze auf, ohne zu wenden (Bouquet, 2004). Konfrontiert man Wachstumskegel mit zwei Substraten, die ein Wachstum erlauben, von denen eines vom Wachstumskegel bevorzugt wird, ist die Typ-I phosphorylierte Isoform von MAP1B auf den Teil des Wachstumskegels beschränkt, der sich auf dem bevorzugten Substrat befindet (Mack, 2000). Die lokale Inaktivierung dieser Phosphoisoform von MAP1B führt zu einer Richtungsänderung des Wachstumskegels (Mack, 2000). In dieser Arbeit zeigen die k.o.-Wachstumskegel bereits auf homogenem Substrat, dass sie Probleme bei der Feinregulierung des Wachstums und der Regulierung der Rechts-links-Symmetrie haben. Diese Unterschiede des k.o. zum w.t. sollten deutlicher zu Tage treten, wenn die k.o.- Wachstumskegel bei dem Wendemanöver an Substratgrenzen untersucht werden.

### 3 Faszikulierung und Navigation der RGZ-Axone in der Retina *in vivo*

Für Mauslinien mit homozygotem MAP1B-k.o. ist das Fehlen des Corpus callosum beschrieben. Diese Gehirnstruktur setzt sich ausschließlich aus Axonen zusammen, die über die Mittellinie des Körpers navigieren müssen. (Edelmann et al., 1996; González-Billault et al., 2000; Meixner et al., 2000). Es finden sich fehlgeleitete myelinisierte Axonbündel im Gehirn der k.o.-Mäuse (Meixner et al., 2000). Wird einer der unvollständigen MAP1B-k.o. mit einem Tau-k.o. zu einem Doppel-k.o. gekreuzt, verstärken sich die Phänotypen enorm: Es kommt zum Fehlen weiterer axonaler Strukturen im Gehirn, bei deren Bildung die Mittellinie überschritten wird (Takei et al., 2000). Bei der Navigation von Axonen über die Mittellinie des Körpers spielen – wie am SNK – das Netrin/DCC/Unc-System und Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise L1CAM eine entscheidende Rolle (Kaprielian et al., 2001). Diese Befunde und die Beobachtungen in dieser Arbeit zur Dynamik von Wachstumskegeln *in vitro* legen nahe, dass es im MAP1B-k.o. zu Veränderungen der intra-retinalen Wegfindung und der Navigation von RGZ-Axonen am SNK kommen könnte.

Diese Arbeit zeigt, dass in den Retina-Gesamtpräparaten von MAP1B-k.o.-Embryonen die Anzahl der Defaszikulierungsereignisse mit der Beteiligung dünner Bündel auf das zweieinhalbfache erhöht ist gegenüber w.t.-Retinae. Die Anzahl dünner Faszikel ( $d < 2,5 \mu\text{m}$ ) ist in k.o.-Retinae erhöht (siehe III 3.2, III 3.3), und die Anzahl der dünnen Bündel weist im k.o. eine erheblich höhere Varianz auf als im w.t. Die Retina zeigt also ein Bild, in welchem die Axone weniger auf ihren Faszikeln verbleiben. Die erhöhte Anzahl besonders der dünnen Faszikel und die erhöhten (De)faszikulierungen im k.o. lassen sich auf drei Arten erklären:

Es ist möglich, dass einige Axone einer Subpopulation von RGZ aufgrund des MAP1B-k.o. häufiger das Faszikel verlassen und die dünnen Faszikel

vornehmlich aus diesen Axonen bestehen. Diese Subpopulation müsste andere Signalwege, die auf MAP1B enden, aufweisen, z.B. durch eine andere Rezeptorausstattung. Subpopulationen von RGZ mit unterschiedlicher Rezeptorausstattung sind für Ephrine und Ephrinrezeptoren beschrieben (Tessier-Lavigne, 1995). Deren Signale münden u.a. auf die Kinase Cdk5 (Cheng et al., 2003), welche u.a. MAP1B phosphoryliert (Kawauchi et al., 2005). Die unterschiedliche Ausstattung der Zellen mit Ephrin und Ephrinrezeptoren liegt jedoch in globalen Gradienten über die gesamte Retina vor. Wären Unterschiede in den Ephrinrezeptoren die Ursache dafür, dass manche RGZ-Axone ihren Faszikel verlassen und andere nicht, müsste dies in manchen Teilen der Retina gehäuft und in anderen nicht auftreten. Es ist jedoch kein Unterschied in der Verteilung der (De-)Faszikulierungen zu erkennen, weshalb dies die Daten nicht erklären kann.

Betrachtet man nicht lokale Subpopulationen, sondern Subtypen von RGZ, die in der gesamten Retina vorkommen, kann man mindestens 22 Subtypen in der Maus unterscheiden (Völgyi et al., 2009) die in weitere, zum Teil sehr unterschiedliche Unterkategorien getrennt werden können (Rivlin-Etzion et al., 2011). Die Einteilung in Subtypen erfolgt nach der Morphologie ihrer Dendriten und ihrem elektrophysiologischen Verhalten. Beides ist E14,5 jedoch noch nicht ausreichend ausgeprägt. Ein Subtyp von RGZ, der ein anderes finales Zielgebiet aufweist als die übrigen RGZ-Axone (*Nucleus suprachiasmaticus* im Hypothalamus zur Regulation der circadianen Rhythmen), sind die intrinsisch photosensitiven RGZ (ipRGZ) (Berson et al., 2002; Semo et al., 2003; Sernagor, 2005). Hierzu verfügen sie über eine andere Rezeptorausstattung. Sie exprimieren bereits bei der Entstehung der ersten RGZ den bei einer Wellenlänge von 470 nm lichtempfindlichen Farbstoff Melanopsin (Tartelin et al., 2003). Die Signale von Melanopsin beeinflussen den Calciumspiegel der Zelle (Hartwick et al., 2007; Sekaran et al., 2003). Damit besitzen die Melanopsine das Potential, die calciumsensitiven Phosphatasen von MAP1B zu aktivieren. Es sind jedoch nur schätzungsweise 1% der RGZ Melanopsin exprimierende Zellen (Hattar

et al., 2002), und kurzwelliges Licht von 470 nm wird sehr gut von lebendem Gewebe absorbiert. Es dringt wahrscheinlich nicht tief genug in die Maus ein, um im Embryo innerhalb des Mutterleibs Signale auszulösen, die ein abweichendes Verhalten der ipRGZ hervorrufen würden. Diese Erklärung kann nicht ausgeschlossen werden, erscheint jedoch auch unwahrscheinlich.

Eine zweite Möglichkeit, die zu einer erhöhten Anzahl von (De-)Faszikulierungen führt, wäre, dass Faszikel im MAP1B-k.o. weniger kompakt sind. Damit würden sie weniger positive Signale durch Zelladhäsionsmoleküle und mechanische Reize an den Wachstumskegel vermitteln. Die Kompaktheit der Faszikel kann in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Retina-Gesamtpräparaten nicht bestimmt werden, hierfür wären elektronenmikroskopische Aufnahmen nötig. Lockere Bündel, die weniger Führung für den Wachstumskegel bieten, würden jedoch nicht nur zu einer erhöhten Anzahl dünner Bündel führen. Diese Arbeit zeigt, dass die Anzahl der breiten Faszikel im k.o. gegenüber dem w.t. nicht erhöht ist, wie in einer solchen Situation zu erwarten wäre. Auch die durchschnittliche Breite der Faszikel unterscheidet sich zwischen w.t. und k.o. nicht. Die Möglichkeit loserer Faszikel, die dazu führen, dass Axone nicht genug Führung haben, ist daher unwahrscheinlich.

Die dritte mögliche Erklärung könnte sein, dass die dünnen Faszikel zwischen den dicken Faszikeln dadurch zustande kommen, dass sich spät in der Entwicklung der OFS einzelne Axone von großen Faszikeln defaszikulieren. Spalten sich Axone in einer frühen Phase der Entwicklung der OFS von ihrem Faszikel ab, haben auf dem Faszikel nachfolgende Axone eine Gelegenheit, am abgespaltenen RGZ-Axon entlangzuwachsen. Damit tragen sie zum Durchmesser eines neuen, dicken Faszikels bei. Das Abspalten der RGZ-Axone, die in den Retinae die dünnen Faszikel ausmachen, muss also spät in der Entwicklung der OFS geschehen. Wachstumskegel in Retina-Gesamtpräparaten zeigen in Wachstumsphasen eine schlanke Struktur, die auf einem Axonfaszikel entlangwächst. Diese Phasen sind

unterbrochen von Phasen der Orientierung und des Faszikelwechsels, in denen die Wachstumskegel auf eine ähnliche Weise wie in der *in vitro* Situation breit auffächern (Brittis et al., 1995). Dieses Verhalten kann bereits durch die Inhibition eines einzelnen Adhäsionsmolekültyps deutlich gestört werden (Brittis et al., 1995). Bei einer solchen Inhibition erhöht sich das Volumen der Wachstumskegel, und bei mehr Wachstumskegeln wird eine hohe Zahl Fortsätze beobachtet (Zelina, 2005).

Die RGZ-Axone spalten sich im k.o. spät in der OFS-Entwicklung und häufiger als im w.t. ab. Sie wachsen global betrachtet *in vitro* im w.t. wie im k.o. Die MAP1B-k.o.-Wachstumskegel zeigen jedoch ein heterogeneres und häufiger weit lateral raumgreifendes Verhalten *in vitro*, ohne dabei insgesamt breiter zu sein. Im w.t. kann MAP1B durch Kopplung der Mikrotubuli an den Rückzug von Aktin helfen, das Zytoskelett und damit den Wachstumskegel von einem nicht bevorzugten Substrat zurückzuziehen (Bouquet et al., 2007). Dieses nicht bevorzugte Substrat wäre *in vivo* der Bereich zwischen den Faszikeln, auf dem die Wachstumskegel nur Laminin vorfinden. Im w.t. würde MAP1B die Mikrotubuli und damit den Wachstumskegel auf dem bevorzugten Substrat stabilisieren und damit zum Verbleib auf dem Substrat beitragen (Mack, 2000). Das bevorzugte Substrat wäre *in vivo* der Faszikel, auf dem der Wachstumskegel zusätzlich zum Laminin positive Signale von den Zelladhäsionsmolekülen und der haptischen Führung erhält. Im k.o. kann MAP1B diese Funktionen nicht erfüllen. Der Wachstumskegel würde in einem stochastischen Prozess häufiger defaszikulieren und dann beim Auftreffen auf den benachbarten Faszikel wieder faszikulieren. Dies würde auch zum Verlassen dicker Faszikel spät in der Entwicklung der OFS führen, was eine elegante Erklärung darstellt sowohl für die erhöhte Anzahl der (De-)Faszikulierungen als auch für die höhere Anzahl und höhere Varianz der Anzahl dünner Bündel.

Bei der Navigation der RGZ-Axone am SNK zeigt sich, dass im k.o. eine Vielzahl der Axone korrekt in den SNK eintauchen und in den Sehnerv

einwachsen. In der Mehrzahl der untersuchten k.o.-Retinae wachsen jedoch Axone bzw. dünne Axonfaszikel – nachdem sie bereits in den SNK eingetaucht sind – in den Grenzbereich zwischen INBS und ÄNBS. Zwischen INBS und ÄNBS befindet sich eine temporäre Struktur, die somatafreie TSC. Die TSC besteht aus den Fortsätzen neuronaler Zellen (Smelser et al., 1973), vermutlich der zukünftigen Amakrinzellen und Bipolarzellen, und enthält axonale Zelladhäsionsmoleküle (Wolburg et al., 1991). In der Literatur herrscht keine Einigkeit über Funktion und genauen Aufbau der TSC (Provis et al., 1998). Es lässt sich jedoch vermuten, dass Axone zwischen den Fortsätzen in der TSC besser wachsen als in der dicht gepackten ÄNBS. Um in die TSC zu gelangen, müssen die RGZ-Axone im k.o. jedoch zunächst fehlnavigieren und den SNK verlassen.

Am SNK sind Netrin-1 und Semaphorine an der attraktiven bzw. repulsiven Leitung der Axone beteiligt. Netrin-1 ist ein diffusibles Molekül, das sich am SNK findet und attraktiv auf RGZ-Axone wirkt (Deiner et al., 1997). Die attraktive Wirkung von Netrin-1 beruht auf einer Typ-I Phosphorylierung von MAP1B durch die Phosphorylierung von Gsk3 $\beta$  (Serin und Tyrosin) und Cdk5 (Del Río et al., 2004). In Netrin-1- bzw. DCC-k.o.- und -Inhibitionsexperimenten zeigen sich Fehlnavigationen kommissuraler Axone (Serafini et al., 1996) sowie von Axonen im Thalamus (Braisted et al., 2000) und Hippocampus (Barallobre et al., 2000). Es ist die Axonprojektion, aber nicht das Wachstum der Axone selbst betroffen (Fazeli et al., 1997). Im Netrin-1-k.o. zeigen sich eine reduzierte Attraktion und Fehlnavigationen von Axonen, die den SNK nach dem Abtauchen in die Retina hinein verlassen (Deiner et al., 1997). In einer Mauslinie, die noch eine verkürzte Form von MAP1B exprimiert, übt Netrin-1 *in vitro* eine deutlich verminderte attraktive Wirkung auf Axone aus (Del Río et al., 2004). Durch Visualisierung der mRNA von Netrin-1 wurde gezeigt, wo sich die Netrin-1 produzierenden Zellen im SNK befinden. In der unmittelbaren Umgebung der Netrin-1 abgebenden Zellen sollte die Konzentration am höchsten sein. Die Netrin-1 produzierenden Zellen liegen in der Tiefe des SNK, auf gleicher Höhe

befindet sich in der umliegenden Retina das TSC. Semaphorine sind ebenfalls im SNK vorhanden. Das diffusible Semaphorin-3a befindet sich im SNK und im Sehnerv (Ko et al., 2012). Das membrangebundene Semaphorin-5a wird im gleichen Bereich des SNK gefunden wie die Netrin-1 produzierenden Zellen. Semaphorin-5a präsentierende Zellen bilden die Abgrenzung des Sehnervs zum umgebenden Gewebe und verhindern, dass RGZ-Axone auf dem Weg zum Chiasma den Sehnerv verlassen (Oster, 2003). Die repulsive Wirkung von Semaphorin-3a wird durch eine reduzierte Phosphorylierung von Gsk3 $\beta$  (Serin) vermittelt (Eickholt, 2002).

Sowohl das attraktive Signal durch Netrin-1 als auch das repulsive Signal der Semaphorine verursacht eine Aktivierung der MAP1B-Kinasen (Gsk3 $\beta$ , Cdk5). Für das Signal durch Netrin-1 ist direkt gezeigt, dass es die Typ-I-Phosphorylierung von MAP1B, die in Navigationsmanövern wichtig ist, erhöht. Die Kinasen haben noch weitere Substrate im Wachstumskegel, darunter auch Tau (Maccioni et al., 2001). Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die fehl Navigierenden Wachstumskegel nicht in der Lage sind, die Umgebungssignale ausreichend umzusetzen. Vermutlich handelt es sich um spät in den SNK wachsende Axone, die außen an den bestehenden Axonen entlangwachsen und im entscheidenden Moment ein stark vom Durchschnitt abweichendes Verhalten zeigen. Sie müssen im Bereich des SNK eine weite Kurve wachsen, und die Umsetzung des Netrin-1- und des Semaphorin-Signal reicht wegen des Fehlens des Zielproteins MAP1B nicht aus, sie im SNK zu halten. Sie treten an diesem Punkt in die gegenüberliegende Neuroretina in das TSC ein.

## 4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Effekte des Fehlens von MAP1B auf den Wachstumskegel – vor allem bei Experimenten auf homogenem Substrat – in den Varianzen des Verhaltens erkennbar sind. Die Unterschiede zwischen MAP1B-k.o. und w.t. manifestieren sich klar durch erhöhte Varianz in Seitwärtsabweichung und Asymmetrie des Wachstumskegels. Am deutlichsten zu Tage treten die Defizite der MAP1B-k.o. Axone – und damit eine wichtige Funktion von MAP1B – in Situationen, in denen der Wachstumskegel mit einer Richtungsentscheidung konfrontiert wird. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *in vitro* Studien auf Substratmustern um solche Entscheidungen gezielt zu induzieren, sowie *in vivo* Untersuchungen notwendig sind um diese Funktion von MAP1B zu untersuchen.

In einer MAP1B-Knockdown Studie an *in vitro* frei wachsenden Axonen verringert sich im Axon die Polymerisationsgeschwindigkeit von Mikrotubuli (Tymanskyj et al., 2012). In einer anderen Studie an Axonen eines partiellen MAP1B-k.o. (González-Billault et al., 2000) und Neuroblastomzellen erhöht sich die Polymerisationsgeschwindigkeit im k.o. bzw. Knockdown von MAP1B (Tortosa et al., 2013). Die Unterschiede in den Ergebnissen hängen mit dem unterschiedlichen Design der Experimente zusammen: Unterschiedliche MAP1B-k.o. Mauslinien haben unterschiedliche EB1 Expressionen (Jiménez-Mateos et al., 2005b). Weiterhin sind die Zellen von k.o.-Mäuse, deren Zellen von Anfang an nur eine verkürzte Form von MAP1B besitzen, die jedoch auch nicht durch eine Transfektion gestört werden, nicht direkt mit einem akuten Knockdown in einer Zelllinie zu vergleichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass neben dem Verhalten stationärer Zellen (Neuroblastoma, COS-7) oder frei *in vitro* wachsender Axone die Wachstumskegel-Navigation *in vivo* und *in vitro* untersucht werden muss, um dem Verständnis der Funktion von MAP1B einen Schritt näher zu kommen. Die Versuche mit regenerierenden und erstauswachsenden

MAP1B-k.o.-Axonen werden auf Basis der hier geleisteten Vorarbeit zurzeit begonnen. Aufschlussreich sind vor allem Zeitrafferaufnahmen von Wendemanövern der k.o.-Axone an Substratgrenzen bzw. in der Retina.

Um mehr Klarheit über die Funktion von MAP1B während des Wendemanövers von Wachstumskegeln zu erhalten, sollte die Dynamik von Mikrotubuli in Zeitrafferaufnahmen untersucht werden. Hiermit wurde im Rahmen der Arbeit bereits begonnen. Es wurde ein Konstrukt aus End-binding Protein und GFP (Stepanova et al., 2003) zur Visualisierung und Quantifizierung der Mikrotubuli-Dynamik eingesetzt. Bisherige Studien zeigen eine direkte Verbindung zwischen MAP1B und dem Mikrotubuli-Plus-Ende-Protein (+Tip) End-Binding-1 (EB1) auf. Daher muss kontrolliert werden, was die zusätzliche Expression bewirkt. Versuche mit Tubulin-GFP, um die gesamten Mikrotubuli zu visualisieren, wurden ebenfalls durchgeführt, zeigen jedoch eine sehr hohe Hintergrundfluoreszenz, und Tubulin-GFP stört vermutlich auch die Mikrotubulistabilität mehr als EB-GFP. Die Verwendung eines roten Fluorophors in einer nicht dimerisierenden Variante würde es erlauben, bei den Aufnahmen eine langwelligeres, weniger zellschädliches Anregungslicht zu verwenden.

Zusätzlich könnte mit *LiveAct-GFP*, einer künstlichen Peptidsequenz, die Aktin sichtbar macht, ohne die Dynamik zu stören, die Aktin-Dynamik quantifiziert werden (Riedl et al., 2008). Dies ermöglicht zum einen die Dokumentation der Aktin-Dynamik zusätzlich zur Mikrotubuli-Dynamik, zeigt zum anderen aber auch präzise die Umrisse der Wachstumskegel bis in die Filopodien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde cytosolisches Cherry (rot fluoreszierendes Protein) verwendet, dass diese Aufgabe suboptimal erfüllt. Ein solche exakte Darstellung des Umriss ist nötig, da schon einzelne Filopodien, die Kontakt mit einer Substratgrenze aufnehmen, Calcium-Signale und damit Wendemanöver im Wachstumskegel auslösen können (Gomez, 2001).

Die automatisierte Spurverfolgungssoftware für die polymerisierenden Plus-Enden (plus tip tracker, pTT (Matov et al., 2010)) legt an jedes EB1 Signal ein Suchfenster an. In diesen Suchfenstern erwartet pTT im nächsten Bild der Zeitrafferaufnahme vorwärts gewachsene oder geschrumpfte Mikrotubuli. Nach einer Bewertung der detektierten Signale verbindet pTT so die Einzelsignale zu Spuren, was eine schnelle und umfangreiche Quantifizierung erlaubt. Die Anpassung einer anderen Software, die Signale über einen selbstlernenden Algorithmus erkennt und verbindet, wurde mit dem Hersteller bereits besprochen (SVCell Tracking von DRVision Technologies).

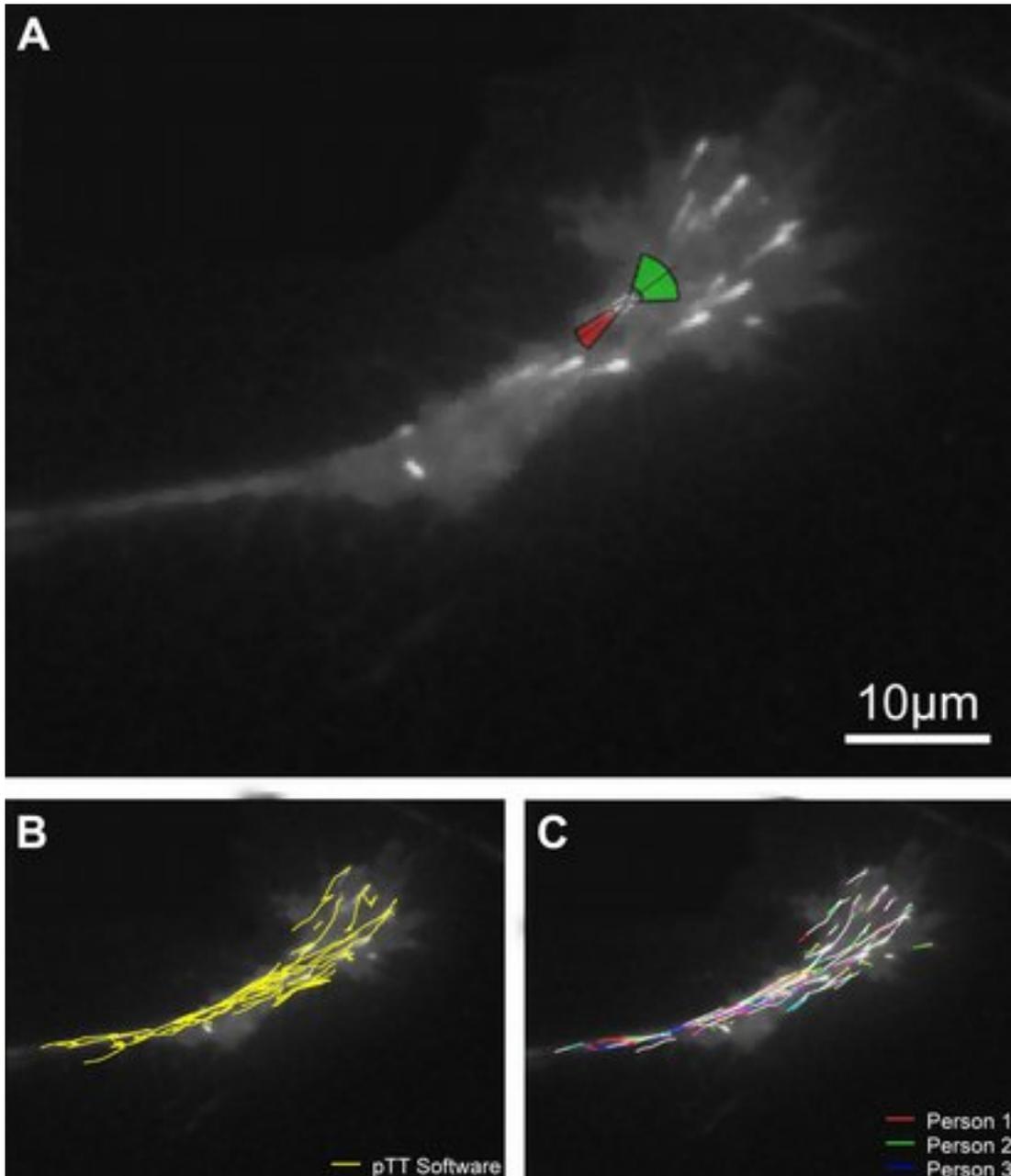


Abbildung 43: Aufnahme eines Wachstumskegels, dessen Mikrotubuli Plus-Enden im Rahmen dieser Arbeit mit EB1-GFP markiert wurden. Suchfenster der Software pTT für die automatisierte Spurverfolgung (A). Mikrotubulispuren im Wachstumskegel (B). Personen beurteilen bei der Nachverfolgung der EB1 Signale konservativer und neigen somit dazu, die Spuren kürzer nachzuzeichnen (C).

MAP1B wird in der Embryogenese und in der Regeneration von Neuronen exprimiert, und zwar sowohl in den Neuronen als auch in den umgebenden Schwannzellen (Book et al., 1996; Dieterich et al., 2002). Versuche zur Präferenz der regenerierenden bzw. erstmals auswachsenden (k.o.-)Axone für unterschiedliche Substrate bei gleichzeitiger Dokumentation der Zytoskelettdynamik könnten ein neues Licht auf die Rolle von MAP1B in der Regeneration des zentralen und peripheren Nervensystems werfen. Ein zuverlässiges Verfahren zur Quantifizierung der Mikrotubuli-Dynamik im Wachstumskegel eröffnet ein ganzes Feld von Möglichkeiten: Denkbar sind z.B. Untersuchungen zu Alterungsvorgängen, neurodegenerativen Erkrankungen, Plastizität des Nervensystems und depressiven Störungen, bei denen neu gebildete Neurone und deren Wachstumskegel eine Rolle spielen.

## V Literaturverzeichnis

**Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O.** (2008). Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 309–322.

**Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O.** (2010). Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 3415–3419.

**Allen, E., Ding, J., Wang, W., Pramanik, S., Chou, J., Yau, V., and Yang, Y.** (2005). Gigaxonin-controlled degradation of MAP1B light chain is critical to neuronal survival. *Nature* 438, 224–228.

**Atilgan, E., Wirtz, D., and Sun, S.X.** (2005). Morphology of the lamellipodium and organization of actin filaments at the leading edge of crawling cells. *Biophys. J.* 89, 3589–3602.

**Avci, H.** (2005). Die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls DM-GRASP für Wachstum und Orientierung von Retinaganglienzell-Axononen. Heidelberg, Univ., Diss., 2005.

**Avci, H.X., Zelina, P., Thelen, K., and Pollerberg, G.E.** (2004). Role of cell adhesion molecule DM-GRASP in growth and orientation of retinal ganglion cell axons. *Dev. Biol.* 271, 291–305.

**Barallobre, M.J., Del Río, J.A., Alcántara, S., Borrell, V., Aguado, F., Ruiz, M., Carmona, M.A., Martín, M., Fabre, M., and Yuste, R.** (2000). Aberrant development of hippocampal circuits and altered neural activity in netrin 1-deficient mice. *Development* 127, 4797–4810.

**Barallobre, M.J., Pascual, M., Del Río, J.A., and Soriano, E.** (2005). The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res. Rev.* 49, 22–47.

**Barnat, M., Enslin, H., Propst, F., Davis, R.J., Soares, S., and Nothias, F.** (2010). Distinct roles of c-Jun N-terminal kinase isoforms in neurite initiation and elongation during axonal regeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 7804–7816.

**Baye, L.M., and Link, B.A.** (2008). Nuclear migration during retinal development. *Brain Res.* 1192, 29–36.

**Bender, R., and Lange, S.** (2001). Adjusting for multiple testing—when and how? *J. Clin. Epidemiol.* 54, 343–349.

**Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M.** (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073.

- Billups, D., Hanley, J.G., Orme, M., Attwell, D., and Moss, S.J.** (2000). GABAC receptor sensitivity is modulated by interaction with MAP1B. *J. Neurosci.* *20*, 8643–8650.
- Book, A.A., Fischer, I., Yu, X.J., Iannuzzelli, P., and Murphy, E.H.** (1996). Altered expression of microtubule-associated proteins in cat trochlear motoneurons after peripheral and central lesions of the trochlear nerve. *Exp. Neurol.* *138*, 214–226.
- Bosc, C., Cronk, J.D., Pirollet, F., Watterson, D.M., Haiech, J., Job, D., and Margolis, R.L.** (1996). Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 2125–2130.
- Bottenstein, J.E., and Sato, G.H.** (1979). Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *76*, 514–517.
- Bouquet, C.** (2004). Microtubule-Associated Protein 1B Controls Directionality of Growth Cone Migration and Axonal Branching in Regeneration of Adult Dorsal Root Ganglia Neurons. *J. Neurosci.* *24*, 7204–7213.
- Bouquet, C., Ravaille-Veron, M., Propst, F., and Nothias, F.** (2007). MAP1B coordinates microtubule and actin filament remodeling in adult mouse Schwann cell tips and DRG neuron growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* *36*, 235–247.
- Braisted, J.E., Catalano, S.M., Stimac, R., Kennedy, T.E., Tessier-Lavigne, M., Shatz, C.J., and O’Leary, D.D.** (2000). Netrin-1 promotes thalamic axon growth and is required for proper development of the thalamocortical projection. *J. Neurosci.* *20*, 5792–5801.
- Brittis, P.A., Canning, D.R., and Silver, J.** (1992). Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science* *255*, 733–736.
- Brittis, P.A., Lemmon, V., Rutishauser, U., and Silver, J.** (1995). Unique changes of ganglion cell growth cone behavior following cell adhesion molecule perturbations: a time-lapse study of the living retina. *Mol. Cell. Neurosci.* *6*, 433–449.
- Cheng, A., Krueger, B.K., and Bambrick, L.L.** (1999). MAP5 expression in proliferating neuroblasts. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *113*, 107–113.
- Cheng, Q., Sasaki, Y., Shoji, M., Sugiyama, Y., Tanaka, H., Nakayama, T., Mizuki, N., Nakamura, F., Takei, K., and Goshima, Y.** (2003). Cdk5/p35 and Rho-kinase mediate ephrin-A5-induced signaling in retinal ganglion cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 632–645.
- Chow, R.L., and Lang, R.A.** (2001). Early eye development in vertebrates.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17, 255–296.

**Collins, M.O., Yu, L., Coba, M.P., Husi, H., Campuzano, I., Blackstock, W.P., Choudhary, J.S., and Grant, S.G.N.** (2005). Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 5972–5982.

**Cueille, N., Blanc, C.T., Riederer, I.M., and Riederer, B.M.** (2007). Microtubule-Associated Protein 1B Binds Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *J. Proteome Res.* 6, 2640–2647.

**Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., and Sretavan, D.W.** (1997). Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19, 575–589.

**Dieterich, D.C., Trivedi, N., Engelmann, R., Gundelfinger, E.D., Gordon-Weeks, P.R., and Kreutz, M.R.** (2002). Partial regeneration and long-term survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush is accompanied by altered expression, phosphorylation and distribution of cytoskeletal proteins. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1433–1443.

**Ding, J.** (2002). Microtubule-associated protein 1B: a neuronal binding partner for glixonin. *J. Cell Biol.* 158, 427–433.

**Edelmann, W., Zervas, M., Costello, P., Roback, L., Fischer, I., Hammarback, J.A., Cowan, N., Davies, P., Wainer, B., and Kucherlapati, R.** (1996). Neuronal abnormalities in microtubule-associated protein 1B mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1270–1275.

**Eickholt, B.J.** (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J. Cell Biol.* 157, 211–217.

**Fazeli, A., Dickinson, S.L., Hermiston, M.L., Tighe, R.V., Steen, R.G., Small, C.G., Stoeckli, E.T., Keino-Masu, K., Masu, M., Rayburn, H., et al.** (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 796–804.

**Fifre, A.** (2005). Microtubule-associated Protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 Proteolysis during Soluble Amyloid -Peptide-induced Neuronal Apoptosis: SYNERGISTIC INVOLVEMENT OF CALPAIN AND CASPASE-3. *J. Biol. Chem.* 281, 229–240.

**Flanagan, L.A., Ju, Y.-E., Marg, B., Osterfield, M., and Janmey, P.A.** (2002). Neurite branching on deformable substrates. *Neuroreport* 13, 2411.

**Forster, B., Van De Ville, D., Berent, J., Sage, D., and Unser, M.** (2004). Complex wavelets for extended depth-of-field: a new method for the fusion of multichannel microscopy images. *Microsc. Res. Tech.* 65, 33–42.

- Franzen, R., Tanner, S.L., Dashiell, S.M., Rottkamp, C.A., Hammer, J.A., and Quarles, R.H.** (2001). Microtubule-associated protein 1B: a neuronal binding partner for myelin-associated glycoprotein. *J. Cell Biol.* *155*, 893–898.
- Gallo, G., and Letourneau, P.C.** (2004). Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J. Neurobiol.* *58*, 92–102.
- Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., and Walsh, C.A.** (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* *23*, 257–271.
- Godement, P., Vanselow, J., Thanos, S., and Bonhoeffer, F.** (1987). A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Dev. Camb. Engl.* *101*, 697–713.
- Gomez, T.M.** (2001). Filopodial Calcium Transients Promote Substrate-Dependent Growth Cone Turning. *Science* *291*, 1983–1987.
- Gonzalez-Billault, C., Avila, J., and Cáceres, A.** (2001). Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2087–2098.
- Gonzalez-Billault, C., Jimenez-Mateos, E.M., Caceres, A., Diaz-Nido, J., Wandosell, F., and Avila, J.** (2004). Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system. *J. Neurobiol.* *58*, 48–59.
- González-Billault, C., Demandt, E., Wandosell, F., Torres, M., Bonaldo, P., Stoykova, A., Chowdhury, K., Gruss, P., Avila, J., and Sánchez, M.P.** (2000). Perinatal lethality of microtubule-associated protein 1B-deficient mice expressing alternative isoforms of the protein at low levels. *Mol. Cell. Neurosci.* *16*, 408–421.
- Goold, R.G., Owen, R., and Gordon-Weeks, P.R.** (1999). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J. Cell Sci.* *112*, 3373–3384.
- Gordon-Weeks, P.R., and Fischer, I.** (2000). MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc. Res. Tech.* *48*, 63–74.
- Goswami, C., Schmidt, H., and Hucho, F.** (2007). TRPV1 at nerve endings regulates growth cone morphology and movement through cytoskeleton reorganization: Regulation of growth cone motility by TRPV1. *FEBS J.* *274*, 760–772.
- Hahn, C.M., Kleinholz, H., Koester, M.P., Grieser, S., Thelen, K., and Pollerberg, G.E.** (2005). Role of cyclin-dependent kinase 5 and its activator P35 in local axon and growth cone stabilization. *Neuroscience* *134*, 449–465.

- Halfter, W., Newgreen, D.F., Sauter, J., and Schwarz, U.** (1983). Oriented axon outgrowth from avian embryonic retinae in culture. *Dev. Biol.* 95, 56–64.
- Halfter, W., Reckhaus, W., and Kroger, S.** (1987). Nondirected axonal growth on basal lamina from avian embryonic neural retina. *J. Neurosci.* 7, 3712–3722.
- Halpain, S., and Dehmelt, L.** (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7, 224.
- Hanley, J.G., Koulen, P., Bedford, F., Gordon-Weeks, P.R., and Moss, S.J.** (1999). The protein MAP-1B links GABA(C) receptors to the cytoskeleton at retinal synapses. *Nature* 397, 66–69.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N.** (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491.
- Harlow, E., and Lane, D.** (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (CSHL Press).
- Harrison, B., Kraus, M., Burch, L., Stevens, C., Craig, A., Gordon-Weeks, P., and Hupp, T.R.** (2008). DAPK-1 Binding to a Linear Peptide Motif in MAP1B Stimulates Autophagy and Membrane Blebbing. *J. Biol. Chem.* 283, 9999–10014.
- Hartwick, A.T.E., Bramley, J.R., Yu, J., Stevens, K.T., Allen, C.N., Baldrige, W.H., Sollars, P.J., and Pickard, G.E.** (2007). Light-evoked calcium responses of isolated melanopsin-expressing retinal ganglion cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13468–13480.
- Hatakeyama, J., and Kageyama, R.** (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 83–89.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., and Yau, K.W.** (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.
- Heidemann, S.R., Landers, J.M., and Hamborg, M.A.** (1981). Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* 91, 661–665.
- Henríquez, D.R., Bodaleo, F.J., Montenegro-Venegas, C., and González-Billault, C.** (2012). The light chain 1 subunit of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is responsible for Tiam1 binding and Rac1 activation in neuronal cells. *PLoS One* 7, e53123.
- Holt, C.E.** (1989). A single-cell analysis of early retinal ganglion cell differentiation in *Xenopus*: from soma to axon tip. *J. Neurosci.* 9, 3123–3145.

- Höpker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., and Holt, C.** (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* *401*, 69–73.
- Jährling, S.** (2009). Die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls DM-GRASP für Zelladhäsion und Axonwachstum. Heidelberg, Univ., Diss., 2009.
- Janke, C., and Bulinski, J.C.** (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 773–786.
- Jay, D.G.** (2000). The clutch hypothesis revisited: ascribing the roles of actin-associated proteins in filopodial protrusion in the nerve growth cone. *J. Neurobiol.* *44*, 114–125.
- Jean, D.C., Baas, P.W., and Black, M.M.** (2012). A novel role for doublecortin and doublecortin-like kinase in regulating growth cone microtubules. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 5511–5527.
- Jiménez-Mateos, E.M., Paglini, G., González-Billault, C., Cáceres, A., and Avila, J.** (2005a). End binding protein-1 (EB1) complements microtubule-associated protein-1B during axonogenesis. *J. Neurosci. Res.* *80*, 350–359.
- Jiménez-Mateos, E.M., Wandosell, F., Reiner, O., Avila, J., and González-Billault, C.** (2005b). Binding of microtubule-associated protein 1B to LIS1 affects the interaction between dynein and LIS1. *Biochem. J.* *389*, 333–341.
- Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C.** (2011). Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *46*, 9–20.
- Kaprielian, Z., Runko, E., and Imondi, R.** (2001). Axon guidance at the midline choice point. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *221*, 154–181.
- Kaverina, I., and Straube, A.** (2011). Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 968–974.
- Kawauchi, T., Chihama, K., Nishimura, Y.V., Nabeshima, Y., and Hoshino, M.** (2005). MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25, and JNK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *331*, 50–55.
- Ko, J.-A., Mizuno, Y., Shibasaki, M., Yamane, K., Chikama, T., Sonoda, K.-H., and Kiuchi, Y.** (2012). Differential expression of semaphorin 3A and its receptors during mouse retinal development: EXPRESSION OF SEMA3A AND RECEPTORS DURING DEVELOPMENTAL MOUSE RETINA. *Cell Biochem. Funct.* *30*, 563–568.
- Koester, M.P., Müller, O., and Pollerberg, G.E.** (2007). Adenomatous

polyposis coli is differentially distributed in growth cones and modulates their steering. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12590–12600.

**Kreshuk, A., Straehle, C.N., Sommer, C., Koethe, U., Cantoni, M., Knott, G., and Hamprecht, F.A.** (2011). Automated detection and segmentation of synaptic contacts in nearly isotropic serial electron microscopy images. *PLoS One* 6, e24899.

**Kutschera, W., Zauner, W., Wiche, G., and Propst, F.** (1998). The mouse and rat MAP1B genes: genomic organization and alternative transcription. *Genomics* 49, 430–436.

**Langkopf, A., Hammarback, J.A., Müller, R., Vallee, R.B., and Garner, C.C.** (1992). Microtubule-associated proteins 1A and LC2. Two proteins encoded in one messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 267, 16561–16566.

**Lee, S.-Y., Kim, J.-W., Jeong, M.-H., An, J.-H., Jang, S.-M., Song, K.-H., and Choi, K.-H.** (2008). Microtubule-associated Protein 1B Light Chain (MAP1B-LC1) negatively regulates the activity of tumor suppressor p53 in neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 582, 2826–2832.

**Liu, C., Bakeri, H., Li, T., and Swaroop, A.** (2012). Regulation of retinal progenitor expansion by Frizzled receptors: implications for microphthalmia and retinal coloboma. *Hum. Mol. Genet.* 21, 1848–1860.

**Lowery, L.A., and Vactor, D.V.** (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 332–343.

**Lucas, F.R., Goold, R.G., Gordon-Weeks, P.R., and Salinas, P.C.** (1998). Inhibition of GSK-3 $\beta$  leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium. *J. Cell Sci.* 111, 1351–1361.

**Maccioni, R.B., Otth, C., Concha, I.I., and Munoz, J.P.** (2001). The protein kinase Cdk5. *Eur. J. Biochem.* 268, 1518–1527.

**Mack, T.** (2000). The Microtubule-Associated Protein MAP1B Is Involved in Local Stabilization of Turning Growth Cones. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 51–65.

**Maness, P.F., and Schachner, M.** (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10, 19–26.

**Marchbank, K., Waters, S., Roberts, R.G., Solomon, E., and Whitehouse, C.A.** (2012). MAP1B Interaction with the FW Domain of the Autophagic Receptor Nbr1 Facilitates Its Association to the Microtubule Network. *Int. J. Cell Biol.* 2012.

**Matov, A., Applegate, K., Kumar, P., Thoma, C., Krek, W., Danuser, G., and Wittmann, T.** (2010). Analysis of microtubule dynamic instability using a

plus-end growth marker. *Nat. Methods* 7, 761–768.

**Meixner, A., Haverkamp, S., Wässle, H., Führer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R.E., Lassmann, H., Wiche, G., and Propst, F.** (2000). MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J. Cell Biol.* 151, 1169–1178.

**Mitchell, C.B., Gasperini, R.J., Small, D.H., and Foa, L.** (2012). STIM1 is necessary for store-operated calcium entry in turning growth cones: STIM1 is necessary for growth cone turning and collapse. *J. Neurochem.* 122, 1155–1166.

**Nakamura, M., Zhou, X.Z., and Lu, K.P.** (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr. Biol. CB* 11, 1062–1067.

**Nothias, F., Fischer, I., Murray, M., Mirman, S., and Vincent, J.D.** (1996). Expression of a phosphorylated isoform of MAP1B is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity. *J. Comp. Neurol.* 368, 317–334.

**Odani, N., Hou, X., and Nakamura, H.** In *Ovo Electroporation as a Useful Tool to Pursue Molecular Mechanisms of Neural Development in Chick Embryos*. In *Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology*, H. Nakamura, ed. (Tokyo: Springer Japan), pp. 9–16.

**Opal, P.** (2003). Mapmodulin/Leucine-rich Acidic Nuclear Protein Binds the Light Chain of Microtubule-associated Protein 1B and Modulates Neuritogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 34691–34699.

**Oster, S.F.** (2003). Invariant Sema5A inhibition serves an ensheathing function during optic nerve development. *Development* 130, 775–784.

**Pangratz-Fuehrer, S., Bubna-Littitz, H., Propst, F., and Reitsamer, H.** (2005). Mice deficient in microtubule-associated protein MAP1B show a distinct behavioral phenotype and altered retina function. *Behav. Brain Res.* 164, 188–196.

**Pedrotti, B., and Islam, K.** (1996). Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett.* 388, 131–133.

**Pei, Y.F., and Rhodin, J.A.G.** (1970). The prenatal development of the mouse eye. *Anat. Rec.* 168, 105–125.

**Péquignot, M.O., Provost, A.C., Sallé, S., Taupin, P., Sainton, K.M., Marchant, D., Martinou, J.C., Ameisen, J.C., Jais, J.-P., and Abitbol, M.** (2003). Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 228, 231–238.

- Pigino, G., Paglini, G., Ulloa, L., Avila, J., and Cáceres, A.** (1997). Analysis of the expression, distribution and function of cyclin dependent kinase 5 (cdk5) in developing cerebellar macroneurons. *J. Cell Sci.* *110* ( Pt 2), 257–270.
- Pollerberg, G.E., Thelen, K., Theiss, M.O., and Hochlehnert, B.C.** (2013). The role of cell adhesion molecules for navigating axons: Density matters. *Mech. Dev.* *130*, 359–372.
- Provis, J.M., Diaz, C.M., and Dreher, B.** (1998). Ontogeny of the primate fovea: a central issue in retinal development. *Prog. Neurobiol.* *54*, 549–580.
- Ramón-Cueto, A., and Avila, J.** (1997). Differential expression of microtubule-associated protein 1B phosphorylated isoforms in the adult rat nervous system. *Neuroscience* *77*, 485–501.
- Riederer, B.M.** (2007). Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res. Bull.* *71*, 541–558.
- Riederer, B.M., Moya, F., and Calvert, R.** (1993). Phosphorylated MAP1b, alias MAP5 and MAP1x, is involved in axonal growth and neuronal mitosis. *Neuroreport* *4*, 771–774.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al.** (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* *5*, 605–607.
- Del Río, J.A., González-Billault, C., Ureña, J.M., Jiménez, E.M., Barallobre, M.J., Pascual, M., Pujadas, L., Simó, S., La Torre, A., and Wandosell, F.** (2004). MAP1B is required for Netrin 1 signaling in neuronal migration and axonal guidance. *Curr. Biol.* *14*, 840–850.
- Rivlin-Etzion, M., Zhou, K., Wei, W., Elstrott, J., Nguyen, P.L., Barres, B.A., Huberman, A.D., and Feller, M.B.** (2011). Transgenic mice reveal unexpected diversity of on-off direction-selective retinal ganglion cell subtypes and brain structures involved in motion processing. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 8760–8769.
- Round, J., and Stein, E.** (2007). Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Curr. Opin. Neurobiol.* *17*, 15–21.
- Sasaki, Y., Welshhans, K., Wen, Z., Yao, J., Xu, M., Goshima, Y., Zheng, J.Q., and Bassell, G.J.** (2010). Phosphorylation of Zipcode Binding Protein 1 Is Required for Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling of Local -Actin Synthesis and Growth Cone Turning. *J. Neurosci.* *30*, 9349–9358.
- Sato-Yoshitake, R., Shiomura, Y., Miyasaka, H., and Hirokawa, N.** (1989). Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron* *3*,

229–238.

**Schoenfeld, T.A., McKerracher, L., Obar, R., and Vallee, R.B.** (1989). MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *9*, 1712–1730.

**Sekaran, S., Foster, R.G., Lucas, R.J., and Hankins, M.W.** (2003). Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr. Biol. CB* *13*, 1290–1298.

**Semo, M., Peirson, S., Lupi, D., Lucas, R.J., Jeffery, G., and Foster, R.G.** (2003). Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 1793–1801.

**Seog, D.-H.** (2004). Glutamate receptor-interacting protein 1 protein binds to the microtubule-associated protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *68*, 1808–1810.

**Serafini, T., Colamarino, S.A., Leonardo, E.D., Wang, H., Beddington, R., Skarnes, W.C., and Tessier-Lavigne, M.** (1996). Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell* *87*, 1001–1014.

**Sernagor, E.** (2005). Retinal development: second sight comes first. *Curr. Biol. CB* *15*, R556–559.

**Shen, W.-W., and Demaurex, N.** (2012). Morphological and functional aspects of STIM1-dependent assembly and disassembly of store-operated calcium entry complexes. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 112–118.

**Shibasaki, K., Murayama, N., Ono, K., Ishizaki, Y., and Tominaga, M.** (2010). TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 4601–4612.

**Slaughter, T., and Black, M.M.** (2003). STOP (stable-tubule-only-polypeptide) is preferentially associated with the stable domain of axonal microtubules. *J. Neurocytol.* *32*, 399–413.

**Smelser, G.K., Ozanics, V., Rayborn, M., and Sagun, D.** (1973). The fine structure of the retinal transient layer of Chievitz. *Invest. Ophthalmol.* *12*, 504–512.

**Snow, D.M., Watanabe, M., Letourneau, P.C., and Silver, J.** (1991). A chondroitin sulfate proteoglycan may influence the direction of retinal ganglion cell outgrowth. *Dev. Camb. Engl.* *113*, 1473–1485.

**Soares, S., Fischer, I., Ravaille-Veron, M., Vincent, J.D., and Nothias, F.**

(1998). Induction of MAP1B phosphorylation in target-deprived afferent fibers after kainic acid lesion in the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 396, 193–210.

**Stepanova, T., Slemmer, J., Hoogenraad, C.C., Lansbergen, G., Dortland, B., De Zeeuw, C.I., Grosveld, F., van Cappellen, G., Akhmanova, A., and Galjart, N.** (2003). Visualization of microtubule growth in cultured neurons via the use of EB3-GFP (end-binding protein 3-green fluorescent protein). *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 2655–2664.

**Stepien, E., Stanisz, J., and Korohoda, W.** (1999). Contact guidance of chick embryo neurons on single scratches in glass and on underlying aligned human skin fibroblasts. *Cell Biol. Int.* 23, 105–116.

**Stier, H., and Schlosshauer, B.** (1995). Axonal guidance in the chicken retina. *Development* 121, 1443–1454.

**Stroissnigg, H., Tranciková, A., Descovich, L., Fuhrmann, J., Kutschera, W., Kostan, J., Meixner, A., Nothias, F., and Propst, F.** (2007). S-nitrosylation of microtubule-associated protein 1B mediates nitric-oxide-induced axon retraction. *Nat. Cell Biol.* 9, 1035–1045.

**Sun, K.L.W., Correia, J.P., and Kennedy, T.E.** (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 138, 2153–2169.

**Takei, Y., Kondo, S., Harada, A., Inomata, S., Noda, T., and Hirokawa, N.** (1997). Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J. Cell Biol.* 137, 1615–1626.

**Takei, Y., Teng, J., Harada, A., and Hirokawa, N.** (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J. Cell Biol.* 150, 989–1000.

**Tartelin, E.E., Bellingham, J., Bibb, L.C., Foster, R.G., Hankins, M.W., Gregory-Evans, K., Gregory-Evans, C.Y., Wells, D.J., and Lucas, R.J.** (2003). Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp. Eye Res.* 76, 393–396.

**Tessier-Lavigne, M.** (1995). Eph receptor tyrosine kinases, axon repulsion, and the development of topographic maps. *Cell* 82, 345–348.

**Thelen, K., Jaehrling, S., Spatz, J.P., and Pollerberg, G.E.** (2012). Depending on Its Nano-Spacing, ALCAM Promotes Cell Attachment and Axon Growth. *PLoS ONE* 7, e40493.

**Tint, I., Fischer, I., and Black, M.** (2005). Acute inactivation of MAP1b in growing sympathetic neurons destabilizes axonal microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton* 60, 48–65.

**Tögel, M., Wiche, G., and Propst, F.** (1998). Novel features of the light

chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J. Cell Biol.* 143, 695–707.

**Tojima, T., Itofusa, R., and Kamiguchi, H.** (2009). The Nitric Oxide-cGMP Pathway Controls the Directional Polarity of Growth Cone Guidance via Modulating Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Signals. *J. Neurosci.* 29, 7886–7897.

**Tojima, T., Hines, J.H., Henley, J.R., and Kamiguchi, H.** (2011). Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 191–203.

**Tortosa, E., Galjart, N., Avila, J., and Sayas, C.L.** (2013). MAP1B regulates microtubule dynamics by sequestering EB1/3 in the cytosol of developing neuronal cells. *EMBO J.* 32, 1293–1306.

**Tymanskyj, S.R., Scales, T.M.E., and Gordon-Weeks, P.R.** (2012). MAP1B enhances microtubule assembly rates and axon extension rates in developing neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 110–119.

**Uchida, A., and Brown, A.** (2004). Arrival, reversal, and departure of neurofilaments at the tips of growing axons. *Mol. Biol. Cell* 15, 4215–4225.

**Ulloa, L., Avila, J., and Díaz-Nido, J.** (1993a). Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J. Neurochem.* 61, 961–972.

**Ulloa, L., Dombrádi, V., Díaz-Nido, J., Szücs, K., Gergely, P., Friedrich, P., and Avila, J.** (1993b). Dephosphorylation of distinct sites on microtubule-associated protein MAP1B by protein phosphatases 1, 2A and 2B. *FEBS Lett.* 330, 85–89.

**Vielmetter, J., Stolze, B., Bonhoeffer, F., and Stuermer, C.A.** (1990). In vitro assay to test differential substrate affinities of growing axons and migratory cells. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Expérimentation Cérébrale* 81, 283–287.

**Vitriol, E.A., and Zheng, J.Q.** (2012). Growth Cone Travel in Space and Time: the Cellular Ensemble of Cytoskeleton, Adhesion, and Membrane. *Neuron* 73, 1068–1081.

**Völgyi, B., Chheda, S., and Bloomfield, S.A.** (2009). Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 512, 664–687.

**Wang, S.W., Mu, X., Bowers, W.J., and Klein, W.H.** (2002). Retinal ganglion cell differentiation in cultured mouse retinal explants. *Methods* 28, 448–456.

**Welshhans, K., and Bassell, G.J.** (2011). Netrin-1-Induced Local -Actin Synthesis and Growth Cone Guidance Requires Zipcode Binding Protein 1.

J. Neurosci. 31, 9800–9813.

**Wen, Y., Eng, C.H., Schmoranzer, J., Cabrera-Poch, N., Morris, E.J.S., Chen, M., Wallar, B.J., Alberts, A.S., and Gundersen, G.G.** (2004). EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat. Cell Biol.* 6, 820–830.

**Weschenfelder, M., Weth, F., Knöll, B., and Bastmeyer, M.** (2013). The stripe assay: studying growth preference and axon guidance on binary choice substrates in vitro. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1018, 229–246.

**Wolburg, H., Willbold, E., and Layer, P.G.** (1991). Müller glia endfeet, a basal lamina and the polarity of retinal layers form properly in vitro only in the presence of marginal pigmented epithelium. *Cell Tissue Res.* 264, 437–451.

**Yamagata, M., and Sanes, J.R.** (2012). Expanding the Ig Superfamily Code for Laminar Specificity in Retina: Expression and Role of Contactins. *J. Neurosci.* 32, 14402–14414.

**Young, R.W.** (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* 212, 199–205.

**Yuan, A., Rao, M.V., Veeranna, and Nixon, R.A.** (2012). Neurofilaments at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 3257–3263.

**Zelina, P.** (2005). Functional analysis of NrCAM and DM-GRASP in the chick embryo visual system. Heidelberg, Univ., Diss., 2005.

**Zelina, P., Avci, H.X., Thelen, K., and Pollerberg, G.E.** (2005). The cell adhesion molecule NrCAM is crucial for growth cone behaviour and pathfinding of retinal ganglion cell axons. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3609–3618.

**Zhou, F.-Q., Walzer, M., Wu, Y.-H., Zhou, J., Dedhar, S., and Snider, W.D.** (2006). Neurotrophins support regenerative axon assembly over CSPGs by an ECM-integrin-independent mechanism. *J. Cell Sci.* 119, 2787–2796.

## **Eigene Publikationen**

G.E. Pollerberg, K. Thelen\*, **M.O. Theiss\***, B.C. Hochlehnert, The role of cell adhesion molecules for navigating axons: Density matters, Mechanisms of Development, Volume 130, Issues 6–8, June–August 2013, Pages 359-372)

\* These authors contributed equally to this work.