

# **Der Einfluss von Plasticity Related Gene 2 auf die Bildung und Stabilisierung von Zellausläufern in Neuro2a**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades und Titels einer Doktorin der  
Medizin (Dr. med)

an der Fakultät für Medizin und  
Gesundheitswissenschaften der Carl von Ossietzky  
Universität Oldenburg

vorgelegt von

Dora Maria Schwetje

geboren am 10.02.1999 in Oldenburg

Die folgende Arbeit wurde während eines Forschungsprojektes in der Arbeitsgruppe Anatomie der Universität Oldenburg unter der Leitung und Betreuung durch Frau Prof. Dr. Anja Bräuer verfasst. Während des Zeitraumes von Februar 2022 bis März 2023 arbeitete ich in Vollzeit als Doktorandin vor Ort im S2-Labor. Im Anschluss erfolgte die schriftliche Ausarbeitung. Zur Seite standen mir als Promotionskomitee freundlicherweise zudem Herr Prof. Dr. Torsten Plösch (als Zweitbetreuer) sowie Herr Prof. Dr. Axel Heep und Frau Dr. Nicola Brandt.

Erstbetreuerin: Frau Prof. Dr. Anja Bräuer

Zweitbetreuer: Herr Prof. Dr. Torsten Plösch

Weitere Mitglieder des Promotionskomitees: Herr Prof. Dr. Axel Heep, Frau Dr. Nicola Brandt

Disputationstermin: 17.09.2025

Für meine Familie.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 Einleitung</b>                                                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Plasticity Related Genes (PRGs) – wirbeltierspezifische Proteine des zentralen Nervensystems</b>              | <b>2</b>  |
| 1.1.1 Struktur                                                                                                       | 2         |
| 1.1.2 Subzelluläre Lokalisation                                                                                      | 3         |
| 1.1.3 Expressionsmuster                                                                                              | 4         |
| <b>1.2 Lysophosphatidsäuren (LPA) – multifunktionale bioaktive Phospholipide</b>                                     | <b>4</b>  |
| 1.2.1 Struktur                                                                                                       | 4         |
| 1.2.2 Metabolismus                                                                                                   | 5         |
| 1.2.3 Interaktion mit Rezeptoren in der Plasmamembran                                                                | 6         |
| <b>1.3 Mögliche Interaktionen von PRGs mit LPA</b>                                                                   | <b>7</b>  |
| 1.3.1 Ebenen möglicher Interaktion                                                                                   | 7         |
| 1.3.2 Interaktion mit dem LPA-Metabolismus                                                                           | 8         |
| 1.3.3 Interaktion mit LPA-induzierten Signalwegen                                                                    | 9         |
| <b>1.4 Funktionelle Implikationen der Interaktion von PRGs mit LPA während der Entwicklung neuronaler Netzwerke</b>  | <b>15</b> |
| 1.4.1 Die Funktion von LPA während der Entwicklung neuronaler Netzwerke                                              | 15        |
| 1.4.2 Die Funktion von PRGs während der Entwicklung neuronaler Netzwerke                                             | 16        |
| <b>1.5 Funktionelle Implikationen der Interaktion von PRGs mit LPA während der Regeneration neuronaler Netzwerke</b> | <b>17</b> |
| 1.5.1 Die Funktion von LPA während der Regeneration neuronaler Netzwerke                                             | 18        |
| 1.5.2 Die Funktion von PRGs während der Regeneration neuronaler Netzwerke                                            | 19        |
| <b>1.6 Forschungsfrage und Hypothesen</b>                                                                            | <b>21</b> |
| <b>2 Material und Methoden</b>                                                                                       | <b>22</b> |
| <b>2.1 Material</b>                                                                                                  | <b>22</b> |
| 2.1.1 Chemikalien                                                                                                    | 22        |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien                                                                                          | 22        |
| 2.1.3 Geräte/Software                                                                                                | 23        |
| 2.1.4 Medien/Medienzusätze/Lipide/Puffer und Lösungen                                                                | 25        |
| 2.1.5 Zelllinien/Transfektion                                                                                        | 27        |
| 2.1.6 Plasmide/Plasmidherstellung                                                                                    | 28        |
| 2.1.7 Material Immunzytochemie/Antikörper                                                                            | 30        |
| 2.1.8 Material für RNA Isolation/cDNA Synthese/PCR/qRT-PCR                                                           | 31        |
| <b>2.2. Methoden</b>                                                                                                 | <b>33</b> |
| 2.2.1 Zellbiologische Methoden                                                                                       | 33        |
| 2.2.2 Molekularbiologische Methoden                                                                                  | 42        |
| 2.2.3 Immunzytochemie und mikroskopische Auswertung                                                                  | 46        |
| 2.2.4 Statistik                                                                                                      | 48        |
| <b>3 Ergebnisse</b>                                                                                                  | <b>49</b> |
| <b>3.1 Neuro2a- und HEK293T-Zellen unter Standardbedingungen</b>                                                     | <b>49</b> |
| 3.1.1 Neuro2a-Zellen                                                                                                 | 49        |
| 3.1.2 HEK293T-Zellen                                                                                                 | 52        |
| <b>3.2 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden HEK293T- und Neuro2a-Zellen</b>                                    | <b>53</b> |
| 3.2.1 Die natürliche Expression von PRGs in Neuro2a-Zellen                                                           | 53        |
| 3.2.2 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden HEK293T-Zellen                                                      | 54        |
| 3.2.3 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden Neuro2a-Zellen                                                      | 56        |
| 3.2.4 Die Morphologie von HEK293T- und Neuro2a-Zellen mit Überexpression verschiedener PRG1-Plasmide                 | 58        |



|                                                                                                      |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.5 Die Morphologie von HEK293T- und Neuro2a-Zellen mit Überexpression verschiedener PRG2-Plasmide | 61         |
| 3.2.6 Neuriten und Protrusionen in PRG-überexprimierenden, differenzierten Neuro2a_2-Zellen          | 63         |
| <b>3.3 Der LPA-induzierte Kollaps</b>                                                                | <b>66</b>  |
| 3.3.1 Die natürliche Expression von LPA-Rezeptoren in Neuro2a-Zellen                                 | 66         |
| 3.3.2 Der LPA-induzierte Kollaps in untransfizierten Neuro2a-Zellen                                  | 67         |
| 3.3.3 Der LPA-induzierte Kollaps in PRG2/PRG3-überexprimierenden Neuro2a-Zellen                      | 71         |
| <b>4 Diskussion</b>                                                                                  | <b>78</b>  |
| <b>4.1 Einordnung der Ergebnisse</b>                                                                 | <b>78</b>  |
| 4.1.1 Neuro2a unter Standardbedingungen (s. 3.1)                                                     | 78         |
| 4.1.2 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden Zelllinien (s. 3.2)                                 | 78         |
| 4.1.3 Der LPA-induzierte Kollaps (s. 3.3)                                                            | 82         |
| <b>4.2 Die Modulation LPA-induzierter Signalwege durch PRG2</b>                                      | <b>87</b>  |
| <b>5 Schlussfolgerung und Ausblick</b>                                                               | <b>92</b>  |
| <b>6 Zusammenfassung/Summary</b>                                                                     | <b>93</b>  |
| <b>Deutsch:</b>                                                                                      | <b>93</b>  |
| Hintergrund                                                                                          | 93         |
| Methoden                                                                                             | 93         |
| Resultate                                                                                            | 93         |
| Schlussfolgerung                                                                                     | 93         |
| <b>Englisch:</b>                                                                                     | <b>94</b>  |
| Background                                                                                           | 94         |
| Methods                                                                                              | 94         |
| Results                                                                                              | 94         |
| Conclusions                                                                                          | 94         |
| <b>Danksagung</b>                                                                                    | <b>95</b>  |
| <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                          | <b>96</b>  |
| <b>Anhang</b>                                                                                        | <b>109</b> |
| <b>Ergänzende Abbildungen für Einleitung und Methodenteil</b>                                        | <b>109</b> |
| <b>Sequenzierungsergebnisse und Alignments</b>                                                       | <b>114</b> |
| <b>Plasmidkarten</b>                                                                                 | <b>119</b> |
| peGFP-N1-hPrg1                                                                                       | 119        |
| peGFP-N1-rPrg2                                                                                       | 120        |
| peGFP-N1-rPrg3                                                                                       | 121        |
| peGFP-N1-mPrg4                                                                                       | 122        |
| peGFP-N1-rPrg5                                                                                       | 123        |
| Material zur Erstellung der Plasmidkarten                                                            | 124        |
| <b>Deskriptive Statistiken zu Abbildungen</b>                                                        | <b>125</b> |
| <b>Erklärungen</b>                                                                                   | <b>132</b> |
| <b>Votum informativum der Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Anja Bräuer</b>                              | <b>133</b> |
| <b>Zustimmungsbescheid gemäß Gentechnikgesetz</b>                                                    | <b>135</b> |
| <b>Anzeige der Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen und Geweben</b>                            | <b>141</b> |

# Abkürzungsverzeichnis

**AC:** Adenylylcyclase

**Akt:** Proteinkinase B

**Arp2/3:** Actin-related Protein 2/3

**ATX:** Autotaxin

**cDNA:** codierende DNA (Desoxyribonukleinsäure)

**CB1/2:** Cannabinoidrezeptoren

**dH<sub>2</sub>O:** destilliertes Reinstwasser (aus Elga-Anlage)

**DIV:** Day in vitro (Tag in Kultur)

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DNA:** Desoxyribonukleinsäure

**dNTP:** Desoxynukleosidtriphosphat

**(D)PBS:** Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline  
(Phosphat-gepufferte Salzlösung)

**ENPP:** Ectonucleotide  
Pyrophosphatase/Phosphodiesterase

**ERM:** Ezrin-Radixin-Myosin-Proteinfamilie

**FAFBSA:** Fatty Acid Free Bovine Serum  
Albumine (Fettsäure-freies Albumin)

**FBS:** fetales Rinderserum

**GAPDH:** Glycerinaldehydphosphat-  
Dehydrogenase

**GDIs:** Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors

**GEFs:** Guanine nucleotide Exchange Factors

**eGFP:** enhanced Green/cyan Fluorescent Protein

**Grb/SOS Komplex:** Growth factor receptor bound  
Protein (bildet Komplex mit SOS (son of  
sevenless))

**ICC:** Immunocytochemie

**KO:** Knockout

**LPA:** Lysophosphatidsäuren

**LPA<sub>1-6</sub>:** LPA-Rezeptoren 1-6 (Proteine)

**Lpar1-6:** LPA-Rezeptoren murin (Gene) (1)

**LPC:** Lysophosphatidylcholin

**LPP:** Lipidphosphat-Phosphatase

**LPTs:** Lipid-Phosphotransferasen

**M:** Molar

**MAG:** Monoacylglycerol

**MAPK:** Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

**mTOR:** Mechanistic Target of Rapamycin Protein

**n:** Anzahl biologische Replikate

**N:** Gesamtzahl technische Replikate

**PA:** Phosphatidsäuren

**PIE:** Polyethylenimin

**PI3K:** Phosphoinosid-3 Kinase

**PL:** Phospholipide

**PLA<sub>1/2</sub>:** Phospholipase A1/A2

**PLC:** Phospholipase C

**PLL:** Poly-L-Lysine

**PP2A:** Protein phosphatase 2A

**PFA:** Paraformaldehyd

**Rac1:** Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin  
substrate 1) Protein

**Ras:** Ras (Rat sarcoma virus) Protein

**RhoA:** Ras homolog family member A (RhoA)  
Protein

**RDX:** Radixin

**RIN:** RNA-Integrity Number

**RNA:** Ribonukleinsäure

**RT:** reverse Transkription

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism

**SP:** subplate neuron

**PCR:** Polymerase Ketten Reaktion

**Prg:** Plasticity related gene (Gen)

**PRG:** Plasticity Related Gene (Protein)

**PP2A:** Protein phosphatase 2A

**PTEN:** Phosphatase and Tensin homolog  
Phosphatase

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism

**Sp1:** Specificity protein 1 (Transkriptionsfaktor)

**qRT-PCR:** quantitative Real-time-PCR

**TRMP2:** transient receptor potential channel 2

# 1 Einleitung

Das Gehirn ist ein faszinierendes Organ, gekennzeichnet durch die ebenso komplexe wie strukturierte Vernetzung von neuronalen Zellen, deren Kommunikation durch extrazelluläre Mediatoren und andere Zelltypen moduliert wird (2). Doch dieses System ist vulnerabel. Zahlreiche Erkrankungen sowie Traumata gehen mit dem Verlust von Neuronen und neuronalen Verbindungen, der Bildung von Narben und langfristigen Defiziten einher (3–6). Neuroregeneration auf der Basis von neuronaler Plastizität ist bisher fast ausschließlich durch langfristige Trainingsprozesse (neurokognitives Training, Ergotherapie, Physiotherapie, Logopädie etc.), jedoch nicht wesentlich medikamentös beeinflussbar (s. Kapitel 1.5) (7,8).

Die Prozesse der Regeneration überschneiden sich dabei in zahlreichen Punkten mit denen der Generation, also der primären Entwicklung neuronaler Netzwerke (9). Während der embryonalen Entwicklung sind Neurone noch in der Lage, zelluläre Fortsätze auszubilden, diese gerichtet auswachsen zu lassen und zielgenau Verknüpfungen auszubilden (s. Kapitel 1.4) – Prozesse, welche nach der Schädigung ausgereifter neuronaler Netzwerke nur unzureichend gelingen (5,6,9).

Die Untersuchung von Proteinen, welche während der Entwicklung und der Regeneration verändert exprimiert werden und an der Bildung, Erhaltung und Plastizität von neuronalen Ausläufern beteiligt sind, ist einer der möglichen Zugangswege zu diesem Forschungsthema. Zu diesen Proteinen gehören die Plasticity Related Genes (PRGs) (s. Kapitel 1.1). Der erste Vertreter dieser Gruppe, PRG1, wurde auf der Suche nach Proteinen entdeckt, welche im Rattengehirn nach einer hippocampalen Läsion (Inzision zwischen dem entorhinalen Kortex und dem Hippocampus) in der primären Phase der posttraumatischen Regeneration in der lädierten Region vermehrt exprimiert werden (10).

Mit der Entdeckung dieser Proteinklasse begann die Suche nach den zugrundeliegenden zellulären Mechanismen, mithilfe welcher die fünf PRGs die Regeneration und die Entwicklung neuronaler Netzwerke beeinflussen (s. Kapitel 1.3). Da PRG1 eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu einer bekannten Proteinklasse, den Lipid Phosphat Phosphatasen (LPPs), besitzt, wurde vermutet, dass auch PRG1 in der Lage ist, in den Lipidstoffwechsel einzugreifen (10). Allerdings lassen Aminosäuremutationen in den drei in LPPs streng konservierten katalytischen Domänen eine katalytische Ektophosphatase-Aktivität der PRGs sehr unwahrscheinlich erscheinen (11). Die Interaktion mit dem Lipidphosphatmetabolismus bzw. den von Lipidphosphaten induzierten Signalwegen erfolgt somit vermutlich auf andere Weise (s. Kapitel 1.3).

Da das Gehirn neben Fettgewebe das Gewebe mit den höchsten Anteilen an Fett ist, ist gerade in diesem Organsystem die Modulation des Lipidstoffwechsels und die Dysregulation desselben unter pathologischen Umständen von besonderem Interesse (12). Lipide sind dabei nicht nur Baustoffe von Zellmembranen, sondern auch bioaktive Signalmoleküle (s. Kapitel 1.2). Interaktionen von Membranproteinen mit Lipiden mit der Folge der Kopplung der Membran an das intrazelluläre Zytoskelett sind von grundlegender Bedeutung für die Ausbildung der jeweils spezifischen Zellmorphologie (13–15). Insbesondere im zentralen Nervensystem zeichnen sich die Zellen durch eine hohe Vielfalt und einen hohen Differenzierungsgrad ihrer zellulären Fortsätze aus (15,16).

Eine Unterform von bioaktiven Lipidphosphaten, welche über die Bindung an spezifische Rezeptoren sowohl während der Entwicklung als auch im Rahmen pathologischer Prozessen innerhalb des Nervensystems u.a. die Morphologie von zellulären Ausläufern beeinflussen, sind Lysophosphatidsäuren (LPA) (17–19) (s. Kapitel 1.2). Während bei niedrigeren LPA-Konzentrationen (im nM Bereich) LPA zu einer Abwendung des Wachstumskegels neuronaler

Vorläuferzellen fort von der LPA-Quelle führt, induzieren (pathologisch) hohe LPA-Konzentrationen (im  $\mu\text{M}$  Bereich) den Kollaps von Wachstumskegeln und Neuritenretraktion (s. Kapitel 1.4 und 1.5). Anstatt axonale Wachstumskegel gerichtet zu leiten (wie es in der Entwicklung der Fall ist) (20), scheinen infolge von Neurotraumata pathologisch erhöhte LPA Konzentrationen die Regeneration zu hemmen, indem regenerierende axonale Wachstumskegel am Auswachsen gehindert werden und somit die erneute Verbindung diskonnektierter Gehirnregionen gestört wird (17–19,21).

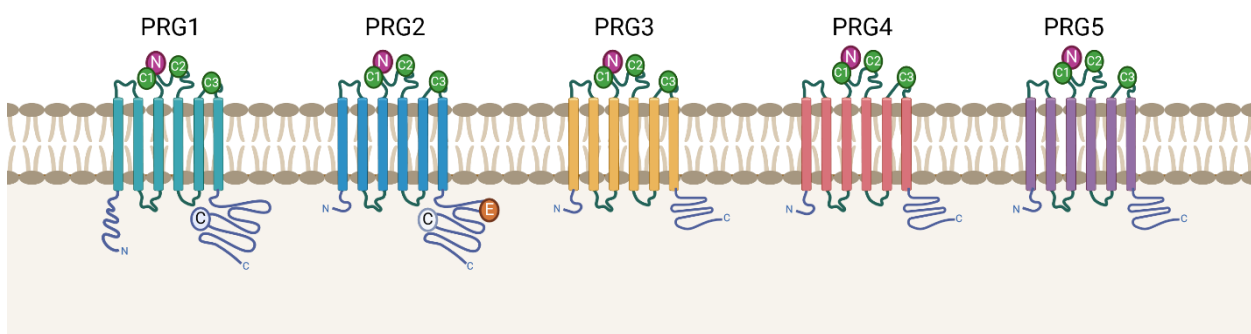
PRGs scheinen in der Lage zu sein, Auswirkungen von LPA sowohl bei niedrigen Konzentrationen während der Entwicklung (20) als auch bei hohen Konzentrationen (10,22–24) zu modulieren. Ein besseres Verständnis des durch PRGs in der Interaktion mit LPA hervorgerufenen Phänotyps und der zugrundeliegenden Signalwege könnte das Verständnis über die Vorgänge der Neuroregeneration und -entwicklung verbessern und den Weg bahnen für die Entwicklung neuer Therapien verschiedener Erkrankungen des zentralen Nervensystems.

### 1.1 Plasticity Related Genes (PRGs) – wirbeltierspezifische Proteine des zentralen Nervensystems

Bei den Plasticity Related Genes (PRGs) handelt es sich um eine Gruppe von fünf wirbeltierspezifischen Proteinen, welche vorwiegend im Gehirn exprimiert werden und an der Ausbildung, Differenzierung und Stabilisierung neuronaler Ausläufer beteiligt sind (25–27).

#### 1.1.1 Struktur

Bei den PRGs handelt es sich um Transmembranproteine mit sechs Transmembrandomänen und einem intrazellulärem N- und C-Terminus (10,25) (s. **Abbildung 1**). Während die C-terminale Aminosäurekette von PRG1 und -2 mit über 400 Aminosäuren sehr lang ist, weisen PRG3, -4 und -5 eher kurze Ketten von etwa 50 Aminosäuren auf (25). Trotz der gravierend unterschiedlichen Gesamtlänge liegen auch innerhalb des C-Terminus Areale hoher Übereinstimmung inklusive einer kurzen Sequenz mit positiven und hydrophoben Aminosäuren, einem (geladenen) Prolin-reichen Motiv und einem Cluster von phosphorylierbaren Aminosäuren vor (25). PRG2 besitzt mit einer Aneinanderreihung von 20 Glutaminsäuren im C-Terminus eine Besonderheit (28).



**Abbildung 1: Struktur der PRGs:** Die PRGs sind Transmembranproteine mit intrazellulärem N- und C-Terminus. Sie variieren insbesondere in Länge und Sequenz der intrazellulären C-terminalen Kette. Eingezeichnet sind die (von LPPs abgeleiteten) Regionen C1-C3 in der zweiten und dritten extrazellulären Schleife sowie eine (ebenfalls in LPPs vorkommende) N-Glykosylierungsstelle zwischen C1 und C3. C1-C3: Regionen, mit welchen LPPs ihre katalytische Aktivität entfalten. N: N-Glykosylierungsstelle. E: Abschnitt mit 20 Glutamat(E)-Aminosäuren. C: mutmaßlich Calmodulin bindender Abschnitt (s. (25,29,30)). PRGs: Plasticity Related Genes. LPPs: Lipidphosphat-Phosphatasen. Die Abbildung wurde erstellt in Anlehnung an (25,31) sowie mithilfe eines selbsterstellten Alignments von PRG1 bis -5 mittels Uniprot. Abbildung erstellt mit BioRender.com

Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zu den Lipidphosphat-Phosphatasen (LPPs) gehören die PRGs zur Familie der Lipid-Phosphotransferasen (LPT) (25). Trotz der Ähnlichkeiten liegen jedoch wesentliche Unterschiede

insbesondere in den extrazellulären Arealen vor, welche essentiell für die Phosphatase-Aktivität anderer Vertreter der LPT-Familie sind (11,32) (s. **Abbildung 1** und **Abbildung 2**). Mithilfe ihrer drei hochgradig konservierten enzymatischen Domänen C1-C3 spalten LPPs die Phosphatgruppe von Phospholipiden wie Lysophosphatidsäuren (LPA) mittels Hydrolyse ab (31,32). Aufgrund von Mutationen, die PRGs in diesen essentiellen Bereichen aufweisen, ist eine katalytische Aktivität auf ähnliche Weise sehr unwahrscheinlich (11,32). Eine Interaktion mit dem Lipidphosphatmetabolismus erfolgt somit vermutlich auf andere Art und Weise (s. Kapitel 1.3).

|                           | C1                          | C2   | C3            |
|---------------------------|-----------------------------|------|---------------|
| <b>Phosphatasen</b>       | SXXXTXXXKXXXXXXXXRXKXXXXXRF | XSGH | SRXXXXXHXHXXD |
| <b>rPRG4</b> (Q6W5G4)     | TTIFANAGQVVTGNPTPHFLSVCRP   | PCKD | VRVAEYRNHWSD  |
| <b>rPRG5</b> (A0A8I5ZVX2) | TDIFVNAGQVVTGNLAPHFLALCKP   | PSKE | NRVAEYRNHWSD  |
| <b>rPRG3</b> (F1LR11)     | TDIFVNAGQVVTGHLTPYFLTVCQP   | PSKH | NRVSEYRNHCSD  |
| <b>rPRG1</b> (Q7TMB7)     | TALITDIIQLATGYQAPYFLTVCKP   | PSQH | TRITQYKNHPVD  |
| <b>rPRG2</b> (Q7TMB0)     | TALVTDVIQLATGYHHPFFLTVCKP   | PSQH | TDITQYRSHPVD  |

**Abbildung 2: Die katalytischen Domänen C1-C3 in PRGs versus LPPs:** Die in LPPs hochgradig konservierten katalytischen Domänen C1-C3 (s. Phosphatasen) sind in PRGs mutiert, sodass eine katalytische Aktivität auf demselben biochemischen Weg als sehr unwahrscheinlich gilt. **C1/2/3:** katalytische Domänen der Phosphatasen. **Grün:** wichtige Aminosäuren in Referenzsequenz. **Gelb:** Mutationen zu Aminosäuren, welche nicht zwangsläufig die katalytische Aktivität blockieren (vgl. Abb. 1 (25)). **Rot:** Mutationen zu Aminosäuren, welche die Funktion der Referenzaminoasäuren nicht erfüllen können (vgl. Abb. 1 (25)). **Blau:** unbekannter Schweregrad der Einschränkung der Funktion. **r:** Ratte. Abbildung kreiert nach (11,25,31,32) sowie mithilfe eines selbsterstellten Alignment der Sequenzen mittels Uniprot (verwendete Uniprot-IDs in Klammern)

Neben der Bezeichnung als Plasticity Related Genes (PRGs) finden sich in der Literatur auch andere, abweichende Bezeichnungen entsprechend ihrer Zusammengehörigkeit zu den LPTs: Insbesondere geläufig ist die Bezeichnung als PLP(P)R(P)s/LPPR(P)s (Phospholipid/Lipid phosphate/Lysophosphatidate phosphatase related proteins) (s. Anhang, **Tabelle 37**) (25).

### 1.1.2 Subzelluläre Lokalisation

Als Membranproteine sind alle PRGs außer PRG4 soweit bekannt sowohl in intrazellulären Membranen als auch in der Plasmamembran von neuronalen und nichtneuronalen Zellen (im Rahmen von Überexpression und/oder natürlicher, basaler Expression) lokalisiert (25). Da PRG3 und -5 an der Ausbildung der zellulären Ausläufer von nichtneuronalen Zellen sowie neuronalen Vorläuferzellen (hier genannt: Filopodien) beteiligt sind und in diesen lokalisiert sind (23,33–35), ist eine Lokalisation in der Plasmamembran hier deutlicher nachweisbar als für PRG1 und -2 (22,30). Es wurde bisher erst einmalig die Plasmamembranlokalisation mithilfe eines Membranmarkers und zwar für PRG3 sicher nachgewiesen (34). Für die anderen Proteine handelt es sich bei der Behauptung einer Lokalisation in der Plasmamembran um eine begründete Annahme aufgrund von Struktur und Nachweis in Filopodien. PRG4 ist das einzige Protein der Gruppe, welches nicht in der Plasmamembran lokalisiert zu sein scheint (28,33,35).

In differenzierten Neuronen zeigen sich unterschiedliche Lokalisationen der verschiedenen PRGs: PRG2 (28) und -3 (34) finden sich insbesondere axonal, während PRG1 (26) und -5 (36) sich insbesondere in Dendriten und den davon ausgehenden Spines befinden.

Interaktionen zwischen PRGs (im Sinne Heteromultimerisation, evtl. auch Homodimerisation), die sich in ihrer Funktion abwechseln/ergänzen/multiplizieren, werden angenommen (wie für PRG3 mit PRG1, -2 und -5) (28,37). Für die Funktionalität der PRGs scheint zum einen die Lokalisierung an der Plasmamembran (, welche durch Co-Expression verstärkt werden kann (28,37)) und zum anderen der C-Terminus eine wichtige Rolle zu spielen (25,35).

### 1.1.3 Expressionsmuster

Obwohl auch in anderen Geweben wie zum Beispiel Hoden, Herz und Lunge (10,23,32,34,36,38) sowie peripherem Nervensystem (32,39) eine mRNA-Expression der *Prgs* nachgewiesen werden konnte, hat sich die Forschung bisher auf die Funktion der PRGs im zentralen Nervensystem und hier vorwiegend auf neuronale Zellen fokussiert.

Die mRNA-Expression von *Prgs* im Gehirn beginnt in frühen embryonalen Stadien, wobei die Expressionsmuster zwischen den *Prgs* variieren und sich zu ergänzen scheinen (25,33,34,36). *Prg2* zeigt bereits zu frühen embryonalen Stadien ein hohes Expressionsniveau (Höhepunkt ca. E19 (Embryonaltag 19)), *Prg3* folgt gleich darauf (Höhepunkt ca. P0 (Tag 0 post partum (nach der Geburt))) (33,34). Dahingegen zeigen *Prg1* und -5 hohe Expressionslevel insbesondere in den frühen postnatalen Stadien (*Prg5* Höhepunkt ca. P5, *Prg1* ca. P10) und *Prg4* zeigt kontinuierlich hohe Expressionslevel während Embryonal- und Postnatalentwicklung (33,36).

Innerhalb des zentralen Nervensystems wurde bisher fast ausschließlich die Funktion in (exzitatorischen) Neuronen/neuronalen Vorläuferzellen des Gehirns untersucht. Dabei werden *Prgs* nicht nur in neuronalen Zellen, sondern auch in variierendem Maße in Astrozyten und (insbesondere unreifen) Oligodendrozyten sowie in geringem Maße auch in Mikroglia exprimiert, wobei ihre Bedeutung in diesen Zelltypen noch größtenteils unbekannt ist (33,34,36).

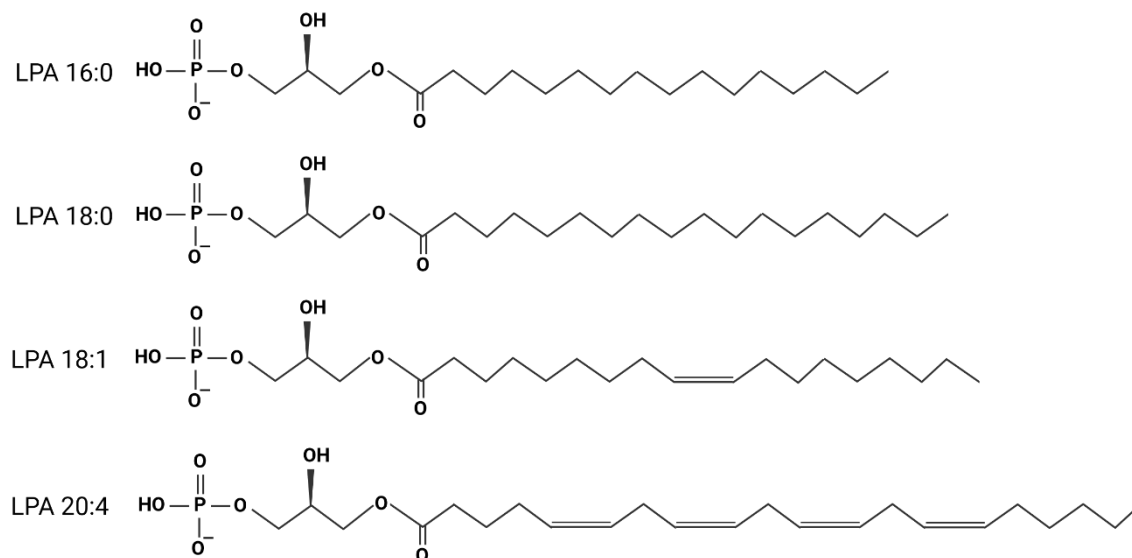
Auch in verschiedenen, nicht nur gehirnspezifischen Krebsentitäten wurden Abweichungen der *Prg*-Expression teilweise mit prognostischer Bedeutung gefunden, wobei die Pathophysiologie größtenteils noch unklar ist (40–45).

### 1.2 Lysophosphatidsäuren (LPA) – multifunktionale bioaktive Phospholipide

Phospholipide sind bekannt als essentielle Bestandteile der Zellmembran (46), doch fungieren sie nicht nur als Baustoff, sondern auch als Botenstoff. Lysophosphatidsäuren (LPA) sind biologisch aktive Phospholipide, welche multiple Funktionen in Physiologie und Pathologie besitzen (17–19).

#### 1.2.1 Struktur

LPA besitzen ein Glycerol-Grundgerüst, eine Phosphatgruppe mit freier Hydroxygruppe und eine längere Acylgruppe (Fettsäure) (47). Es kommen verschiedene LPA-Spezies vor, welche sich in der Position der Acylkette an der sn-1- oder sn-2-Position und in der Länge und Sättigung der Bindungen der Acylkette unterscheiden (47). Besonders häufig kommen bestimmte gesättigte (18:0/16:0) und ungesättigte (18:1, 20:4) Fettsäureketten innerhalb des LPA-Moleküls vor (47) (s. **Abbildung 3**). Es bestehen Unterschiede bezüglich der biologischen Funktion und Rezeptorbindungsaffinität zwischen den verschiedenen LPA-Spezies (48–51). Im Blut (und auch in den meisten experimentellen Versuchsbedingungen) ist LPA an Albumin gebunden, was ebenfalls die Bindungsaffinität zu Rezeptoren beeinflussen kann (Albumin stört etwa die Bindung von LPA an LPA<sub>3</sub> (52)).

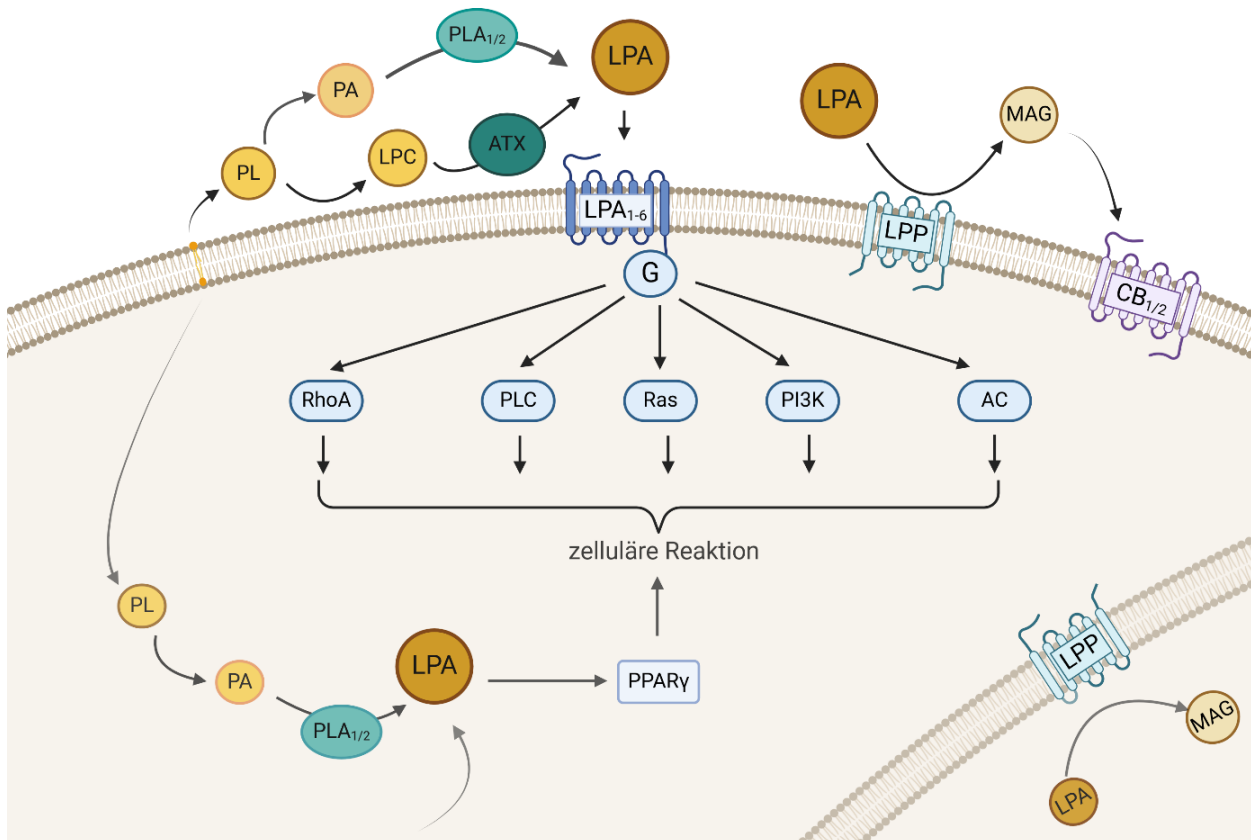


**Abbildung 3: Die häufigsten LPA-Spezies (47):** Abbildung erstellt in Anlehnung an die Strukturdarstellung durch PubChem (53,54). Abbildung erstellt mit BioRender.com

### 1.2.2 Metabolismus

Der Synthese von LPA dienen verschiedene Enzyme, wobei das sezernierte Enzym ATX (Autotaxin) als hauptsächlicher Produzent extrazellulärer LPA dient (17,19,55) (s. **Abbildung 4**). Die Konzentration von LPA in Körperflüssigkeiten variiert von 0.1-1  $\mu\text{M}$  und kann im Serum (v.a. infolge einer Ausschüttung durch Thrombozyten (56)) auch bei Werten über 10  $\mu\text{M}$  liegen (57,58). Im adulten, nicht lädierten (Ratten-)Gehirn wird ATX in Oligodendrozyten und ihren Vorläufern, Zellen des Choroidplexus und leptomeningealen Zellen exprimiert, unter pathologischen Bedingungen exprimieren auch andere Zelltypen wie z.B. aktivierte Astrozyten ATX (21). Es konnte gezeigt werden, dass Autotaxin (=ENPP2 (Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase)) im Gegensatz zu dem verwandten Protein ENPP1 kein Transmembranprotein ist, sondern erst über Sekretion extrazellulär wirksam wird (59). Die Bindung von LPA an LPA-Rezeptoren kann eine vermehrte Synthese von LPA im Sinne einer positiven Rückkopplung bedingen (49).

Der Abbau von LPA erfolgt hauptsächlich durch LPPs (Lipidphosphat-Phosphatasen), Ektophosphatasen, die in der Lage sind, Lipidphosphate zu dephosphorylieren (31,60). Auch die entstehenden Abbauprodukte (Monacylglycerol (MAG) und in der Folge auch dessen Abbauprodukte) sind biologisch aktiv und können z.B. an Cannabinoidrezeptoren binden, soweit sie extrazellulär vorliegen (61).



**Abbildung 4: LPA-Metabolismus:** LPA werden vornehmlich extrazellulär durch ATX, ein sezerniertes Enzym, synthetisiert. Es bestehen jedoch auch alternative Synthesewege, u.a. durch die Phospholipasen A1/A2. Extrazelluläre LPA können u.a. an sechs G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden und somit zahlreiche intrazelluläre Signalwege beeinflussen. Durch LPPs werden LPA zu MAG abgebaut, welches wiederum an Cannabinoid-Rezeptoren binden kann. **PL:** Phospholipide. **LPC:** Lysophosphatidylcholin. **PA:** Phosphatidsäuren. **PLA<sub>1/2</sub>:** Phospholipase A1/A2. **ATX:** Autotaxin. **LPA:** Lysophosphatidsäuren. **LPA<sub>1-6</sub>:** LPA-Rezeptoren 1-6. **G:** G-Protein. **RhoA:** RhoA-Protein. **PLC:** Phospholipase C. **Ras:** Ras-Proteine. **PI3K:** Phosphoinosid-3 Kinase. **AC:** Adenylylcyclase. **LPP:** Lipidphosphat-Phosphatase. **CB<sub>1/2</sub>:** Cannabinoidrezeptoren 1/2. **MAG:** Monoacylglycerol. **PPARγ:** Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma. Abbildung angelehnt an (17,19,61). Abbildung erstellt mit Biorender.com

### 1.2.3 Interaktion mit Rezeptoren in der Plasmamembran

Extrazelluläre LPA entfalten ihre Wirkung hauptsächlich über Bindung an die sechs G-Protein-gekoppelte Rezeptoren LPA<sub>1-6</sub>, aber auch über die Bindung an andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sowie weitere atypische Rezeptoren (17) (s. **Abbildung 4**). Inwiefern auch nach intrazellulär aufgenommene / intrazellulär synthetisierte LPA funktionell bedeutsam sind, ist noch nicht vollständig verstanden. Sie scheinen zum einen als Bauprodukt für andere Phospholipide/Glycerolipide zu dienen (17) als auch als Ligand den Transkriptionsfaktor PPARγ zu aktivieren (62).

Je nachdem, welche LPA-Rezeptoren auf einer Zelle exprimiert werden, werden verschiedene zelluläre Antworten durch LPA als Liganden ausgelöst (63). Diese Reaktionen reichen von Veränderungen basaler zellulärer Prozesse wie Proliferation, Überleben und Migration bis hin zu der Beeinflussung spezifischer Funktionen in differenzierten Zellen (17,19,57,58,64,65).

U.a. hat LPA Einfluss auf das (Re-)Arrangement des Zytoskeletts im Rahmen der Zellteilung, Migration und der Genese von Zellausläufern wie den Neuriten (64). In neuronalen Zellen wird je nach induziertem Signalweg Neuritenretraktion, Neuritenverzweigung und/oder Neuritenpolarisierung durch LPA im Rahmen eines komplexen Zusammenspiels von Aktindepolymerisation und -polymerisation induziert (63,64,66). Dabei werden scheinbar gegensätzliche Funktionen wie Neuritenretraktion und Neuritenauswachsen (67) durch verschiedene Rezeptoren und



Signalwege induziert (63,68). Die Neuritenretraktion ist dabei vermutlich hauptsächlich auf den RhoA-ROCK-Signalweg (RhoA Protein, RhoA-assoziierte Protein-Kinase) zurückzuführen (69). Alle LPA-Rezeptoren außer LPA<sub>3</sub> scheinen an der Retraktion von Neuriten und an dem Kollaps von Wachstumskegeln beteiligt zu sein, wobei die Funktion redundant durch verschiedene Rezeptoren induziert wird und auch andere Rezeptoren als die klassischen sechs eine Rolle zu spielen scheinen (25,63,65,70). So reagieren etwa retinale Ganglienzellen mit einem KO (Knockout) von Lpar1-3 weiterhin mit Wachstumskegelnkollaps und Neuritenretraktion auf LPA (71). LPA<sub>3</sub> scheint im Gegensatz dazu an dem Wachstum und der Verzweigung von Neuriten beteiligt zu sein (63).

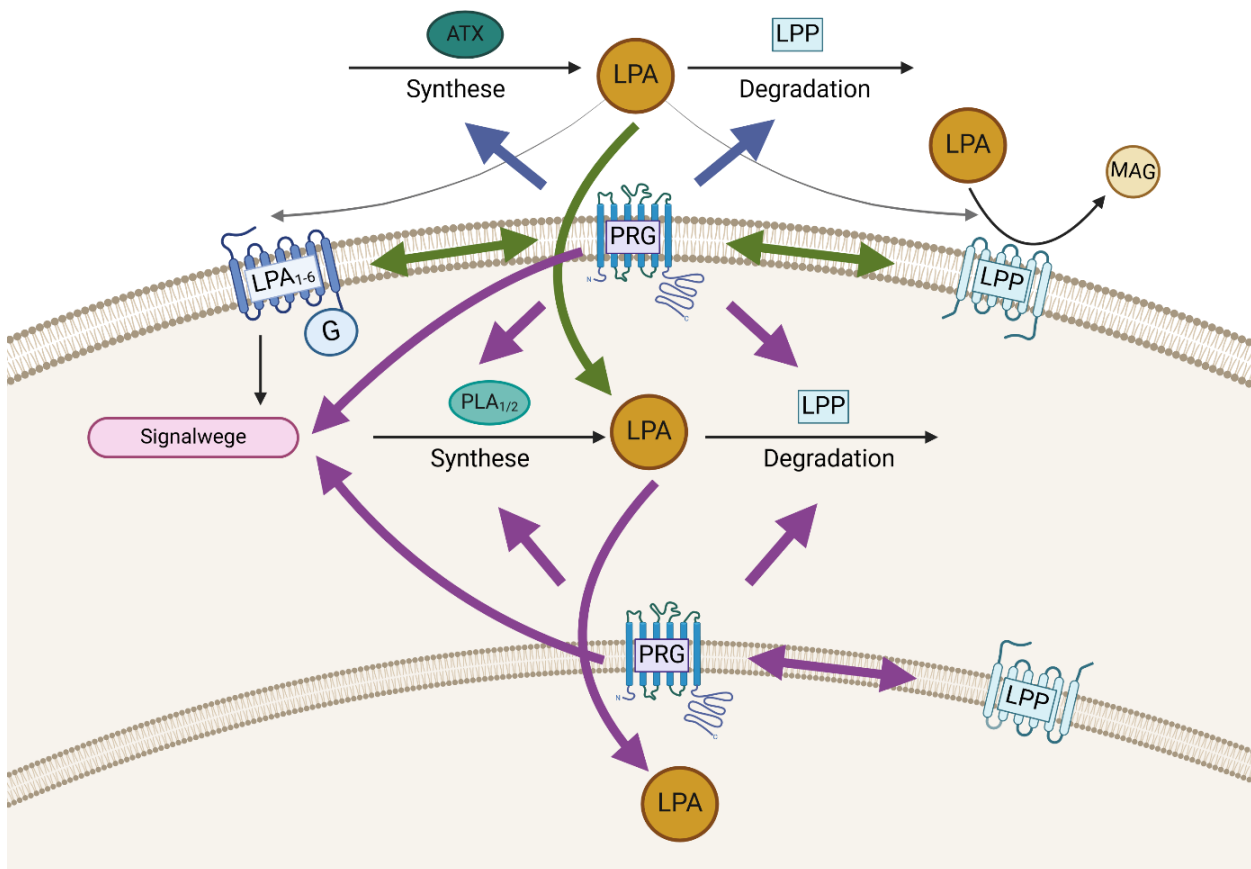
### 1.3 Mögliche Interaktionen von PRGs mit LPA

Im folgenden Abschnitt werde ich die bisherigen Erkenntnisse zu der Interaktion von PRGs mit den Lysophosphatidsäuren beleuchten. Wie dargestellt, ist davon auszugehen, dass PRGs ihre Wirkung zumindest teilweise über eine Interaktion mit bioaktiven Phospholipiden wie den LPA entfalten (s.o.).

#### 1.3.1 Ebenen möglicher Interaktion

Bis heute ist nur ansatzweise verstanden, wie die Interaktion von PRGs mit LPA im Detail funktioniert. Nachdem eine Ektophosphatase-Aktivität ähnlich den LPPs für unwahrscheinlich gehalten wurde, eröffneten sich zahlreiche Möglichkeiten der Interaktion. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass auch LPPs Wirkungen abseits der direkten katalytischen Aktivität zugeschrieben werden, wobei diese noch nicht im Detail verstanden sind (31,72).

Es sind verschiedene Ebenen der Interaktion zwischen PRGs und LPA denkbar. Diese lassen sich auf zwei Arten kategorisieren: Erstens lassen sich Interaktionen mit dem LPA-Metabolismus von der Interaktion mit LPA-induzierten Signalwegen unterscheiden. Zweitens lassen sich die möglichen Verbindungen örtlich klassifizieren: extrazelluläre Ebene versus Membranebene versus intrazelluläre Ebene (s. **Abbildung 5**).



**Abbildung 5: Ebenen möglicher Interaktion von PRGs mit LPA:** Pfeilfarben: **blau** (→): extrazelluläre Ebene, **grün** (→): Membranebene, **pink** (→): intrazelluläre Ebene (inklusive Transport zwischen verschiedenen Organellen (angedeutet mit zweiter Membran)). **ATX:** Autotaxin. **LPA:** Lysophosphatidsäuren. **LPP:** Lipidphosphat-Phosphatasen. **MAG:** Monoacylglycerol. **LPA<sub>1-6</sub>:** LPA-Rezeptoren. **PLA:** Phospholipasen A1/A2. Abbildung erstellt in Anlehnung an (25,27). Abbildung erstellt mit Biorender.com

### 1.3.2 Interaktion mit dem LPA-Metabolismus

Eine Interaktion mit dem LPA-Metabolismus ist sowohl für das extrazelluläre als auch das intrazelluläre Kompartiment vorstellbar.

#### Beeinflussung der LPA-Synthese

Eine Beeinflussung des LPA-Metabolismus schließt eine Beeinflussung der LPA-Synthese ein. Denkbar wäre eine Protein-Protein-Interaktion von PRGs mit LPA-synthetisierenden Enzymen wie ATX oder PLA1/2. Diese Möglichkeit wurde bisher nicht untersucht.

#### Beeinflussung der LPA-Degradation

Im Fokus der Untersuchungen stand stattdessen kurz nach der Entdeckung der PRGs die Möglichkeit, dass PRGs ebenso wie die verwandten LPPs in der Lage sein könnten, Phospholipide zu dephosphorylieren (10). Experimentell wurden hierzu widersprüchliche Resultate für PRG1 erhoben: Während in zwei Studien erhöhte Spiegel von Monoacylglycerol, einem Degradationsprodukt von LPA, in PRG1-überexprimierenden Zellen gefunden wurden (10,73), konnte dies in einem ähnlichen Versuchsaufbau durch eine andere Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (11). Auch die Aminosäuremutationen in den katalytischen Einheiten C1-3 (s.o.) sprechen gegen eine Ektophosphatase-Aktivität (11,25) (s. 1.1.1). Daraus resultiert die in der Literatur breit vertretene Einschätzung, dass PRGs nicht zur Dephosphorylierung in der Lage sind (25), wobei dies bisher einzig für PRG3 experimentell widerlegt wurde (73).

Neben einer direkten Ektophosphatase-Aktivität wäre denkbar, dass PRGs indirekt zur Degradation von LPA beitragen, z.B. im Sinne einer Interaktion mit LPPs.

### **Beeinflussung der LPA-Lokalisation (Transport)**

Ein weiterer Mechanismus einer möglichen Interaktion mit dem LPA-Stoffwechsel ist der Transport von LPA zwischen Kompartimenten.

Für PRG1 wurde gezeigt, dass die Aufnahme von extrazellulären, fluoreszierenden LPA nach intrazellulär in *Prg1*-KO Neuronen verringert ist (26). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte SNP-Variante (Single Nucleotide Polymorphism) von *Prg1*, welche auch beim Menschen vorkommt und mit einem Glykosylierungsdefekt einhergeht, ebenfalls mit einer verringerten Aufnahme von LPA (im Vergleich zum *Prg1* Wildtyp) in stabil die jeweiligen Proteine überexprimierenden (HEK293-) Zelllinien assoziiert ist (74). Für andere PRGs wurde dieser Mechanismus bisher nicht untersucht.

Wie genau der Transport über die Membran geschieht, ob z.B. PRG1 (evtl. in Komplexen mit weiteren Proteinen) selbst als Transporter fungiert oder indirekt andere Transporter aktiviert werden, ist unklar. Es ist vorstellbar, dass durch die Aufnahme von LPA in die Zelle die LPA-Spiegel im Extrazellularraum und damit die LPA, welche an LPA-Rezeptoren binden könnten, reduziert werden. Somit könnte eine Aufnahme von LPA nach intrazellulär den Effekt von LPA an LPA-Rezeptoren vermindern (25,26). Es ist aber auch möglich, dass LPA intrazellulär wirksam werden. Ob tatsächlich eine vermehrte Aufnahme bei Überexpression oder nur eine verringerte bei Knockout vorhanden ist, wurde bisher nicht untersucht. Auch ist bisher unbekannt, was mit intrazellulären LPA passiert, ob sie zum Beispiel zu MAG abgebaut werden oder möglicherweise (z.B. ebenfalls durch PRGs) in andere Zellkompartimente transportiert werden. Nicht nur die Aufnahme von LPA, sondern auch die ihrer Abbauprodukte (MAG) scheint durch PRG1 verändert zu werden, wie durchflusszytometrische Untersuchungen zeigen (74).

### **1.3.3 Interaktion mit LPA-induzierten Signalwegen**

#### **Interaktion mit LPA-Rezeptoren**

Die Interaktion mit LPA-induzierten Signalwegen könnte ebenfalls auf verschiedenen Ebenen geschehen. Zunächst ist eine direkte Interaktion von PRGs mit benachbarten LPA-Rezeptoren in der Plasmamembran denkbar. Betrifft diese Interaktion nur einzelne LPA-Rezeptoren, könnte somit die LPA-Antwort auch in sich moduliert werden und nicht nur insgesamt verstärkt oder gehemmt werden. Bisher wurde diese Fragestellung nicht untersucht.

#### **Interaktion mit Proteinen und Lipiden abwärts der LPA-Rezeptoren**

Hingegen sind einige Untersuchungen bezüglich einer intrazellulären Interaktion von PRGs mit LPA-induzierten Signalwegen abwärts der Rezeptoren durchgeführt worden. Da PRGs auch LPA-unabhängige Effekte zu haben scheinen (22,25), ist dies ein vielversprechender Ansatz.

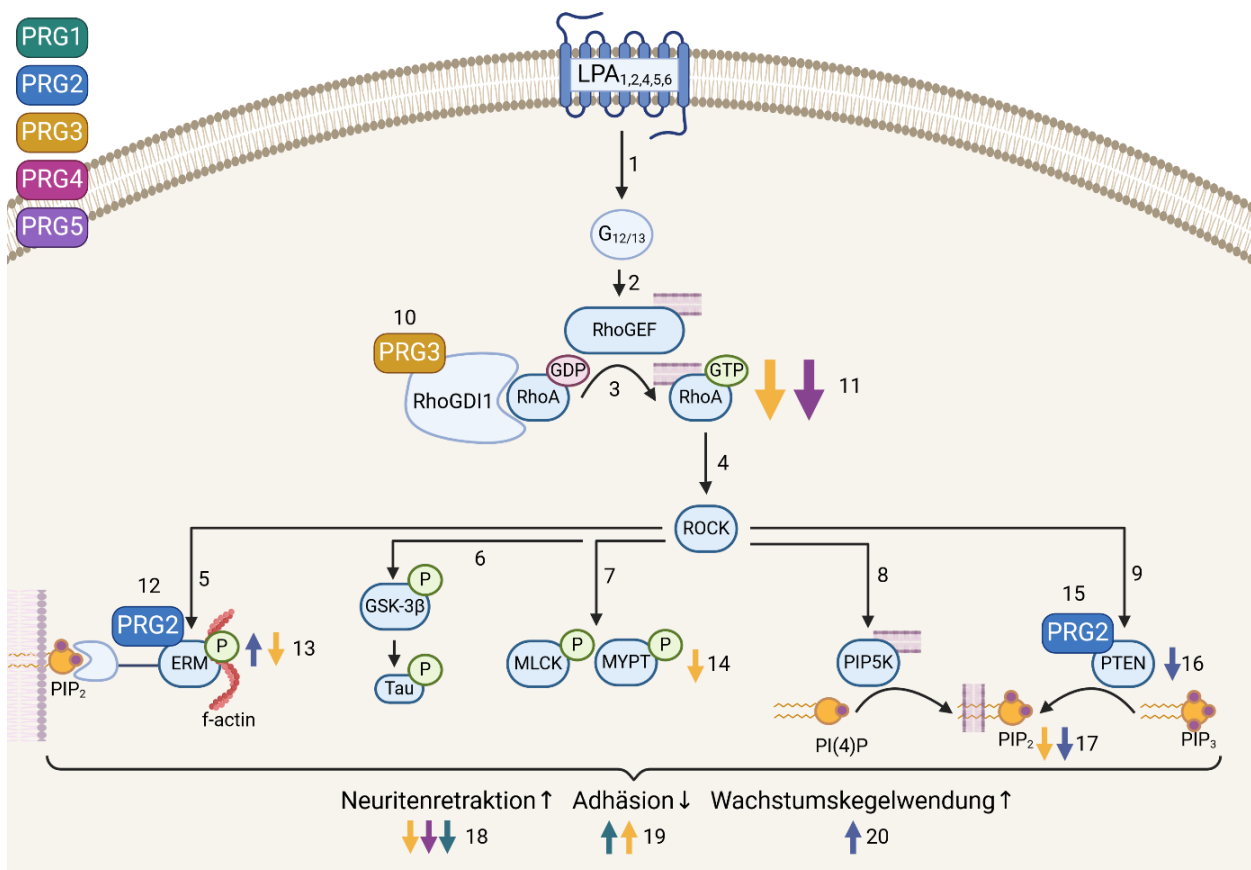
#### Interaktion mit dem RhoA-ROCK Signalweg ( $G_{12/13}$ )

Mehrfach beschrieben ist eine Interaktion von PRGs mit dem RhoA-ROCK-Signalweg (22–24). Infolge einer Bindung von LPA an die LPA-Rezeptoren  $LPA_{1,2,4,5,6}$  und der anschließenden Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine  $G_{12/13}$  kommt es zu einer Aktivierung der kleinen GTPase RhoA und in der Folge über eine Aktivierung von ROCK (Rho-associated protein kinase) zu Veränderungen des Zytoskelettes, insbesondere zum Wachstumskegelkollaps, gefolgt von Neuritenretraktion bis hin zur Zellrundung (64,75,76).

Die Aktivierung von RhoA unterliegt dabei einer Modulation durch GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) und GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) (77). Für PRG3 ist beschrieben, dass es mit RhoGDI1

interagiert und mittels Stabilisierung der RhoA-RhoGDI1-Bindung die Translokation von RhoA(-GDP) zur Plasmamembran und die Aktivierung zu RhoA-GTP verzögert (24,37). Die Interaktion besteht auch nach Deletion der 43 c-terminalen Aminosäuren (24). Auch für PRG5 wurde beschrieben, dass eine Überexpression die LPA-induzierte RhoA-Aktivierung reduziert (23). Ob auch PRG5 und andere PRGs mit RhoGDI interagieren, ist ungeklärt. Vermutlich in der Folge einer Hemmung des RhoA-Signalweges wurde eine reduzierte Phosphorylierung der Effektorproteine MLC (Myosin Light Chains) und MYPT1 (Myosin Phosphatase) in PRG3-überexprimierenden Zellen festgestellt (24).

Eine weitere Gruppe an Effektorproteinen des RhoA-ROCK-Signalweges sind bestimmte Moleküle, welche das Zytoskelett an der Plasmamembran verankern, die sog. ERM (Ezrin, Radixin, Myosin) (24,78). Diese spielen u.a. bei der Abwendung des axonalen Wachstumskegels weg von Wachstumsinhibitoren wie Sema3A und LPA eine Rolle (20,79). Es ist beschrieben, dass PRG3 die Phosphorylierung dieser Proteine reduziert (24). Auch für PRG2 wurde eine Interaktion mit ERM-Molekülen berichtet, hier im Sinne einer direkten Interaktion mit Radixin (20). Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von Radixin verstärkt hierbei die Bindung zu PRG2, welches wiederum die Phosphorylierung (im Gegensatz zu PRG3) zu unterstützen scheint (20). Infolge eines LPA-Stimulus kommt es somit zu einer verstärkten Bindung von PRG2 an Radixin und einer asymmetrischen Akkumulation von aktiviertem, phosphoryliertem Radixin im Wachstumskegel thalamokortikaler Neurone und damit zur Abwendung des Wachstumskegels weg von LPA-reichen Regionen (20). ERM-Moleküle sind nicht nur abwärts des RhoA-ROCK Signalweges zu finden, sondern auch an anderen Signalwegen beteiligt (s.u.). Während die ERM-Moleküle für eher leichtgradige Veränderungen des Zytoskelettes etwa im Rahmen der (LPA-induzierten) Wendung eines Wachstumskegels Bedeutung haben (20,79), sind sie nur eines von vielen Effektorproteinen des RhoA-ROCK-Signalweges, welcher bei Aktivierung morphologische Veränderungen im Sinne einer Neuritenretraktion bis hin zum Zellkollaps induziert (s.o.). Deshalb sollten Phänomene einer Interaktion mit ERM auch separat vom RhoA-ROCK-Signalweg betrachtet werden.



**Abbildung 6: Interaktion der PRGs mit dem RhoA-ROCK-Signalweg.** Angelehnt an (64). Die **PRG-Boxen** markieren eine direkte Interaktion mittels Bindung (z.B. PRG3 - RhoGDI1), die **Pfeile** Auswirkungen der PRGs auf Aktivierungen/zelluläre Reaktionen bei Überexpression. **PRG**: Plasticity Related Gene. **LPA<sub>1,2,4,5,6</sub>**: LPA-Rezeptoren. **G<sub>12/13</sub>**: G Proteine. **RhoGEF**: Rho Guanine nucleotide Exchange Factors. **RhoGDI1**: Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor 1. **RhoA**: RhoA Protein. **GDP/GTP**: Guanosindi-/triphosphat. **ROCK**: Rho Kinase. **ERM**: Ezrin, Radixin, Moesin Proteinfamilie. **GSK-3β**: Glykogensynthase-Kinase 3β. **Tau**: Tau Protein. **P**: Phosphorylierung. **MLCK**: Myosin-leichte-Ketten-Kinase. **MYPT**: Myosin Phosphatase. **PIP5K**: Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-Kinase. **PI(4)P**: Phosphatidylinositol 4-phosphat. **PIP<sub>2</sub>**: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. **PIP<sub>3</sub>**: Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat. **PTEN**: Phosphatase and Tensin homolog. **GC**: Growth Cone (Wachstumskegel). Membran-gebundene Proteine (z.B. RhoA-GTP) sind mit einem **Membranausschnitt** (in violett) dargestellt. Referenzen 1(64), 2(64), 3(77), 4(64,75,80), 5(78,81), 6(69), 7(24,64), 8(22,82), 9(83), 10(24), 11(22-24), 12(20), 13(20,24), 14(24), 15(28), 16(28), 17(22,28), 18(10,22-24), 19(30,84), 20(20). Abbildung erstellt mit BioRender.com

### Interaktion mit dem Ras- und dem PI3K- Signalweg (G<sub>i</sub>)

Durch die Bindung von LPA an die LPA-Rezeptoren LPA<sub>1-4,6</sub> werden via G<sub>i</sub>-Aktivierung zum einen der Ras- und zum anderen der PI3K-Signalweg induziert (64).

Es ist beschrieben, dass PRG3 den Ras-Signalweg mittels der Bindung an und der Aktivierung von RasGRF1 (Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 1) beeinflusst (22,40). Durch den Austausch von GDP mit GTP durch RasGRF1 wird Ras aktiviert und es kommt zu Signalkaskaden insbesondere durch die Aktivierung von MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) (64). Durch die Aktivierung von Ras durch PRG3 wird zum einen die Proliferation (in Gliom-Zelllinien) (40) und zum anderen das Auswachsen von Filopodien unterstützt (22). Durch die Reduzierung der Expression von RasGRF1 (mittels siRNA) konnte der Zuwachs an Neuritenlänge induziert durch PRG3-Überexpression von DIV2(Day *in vitro* 2)-kortikalen Neuronen auf das basale Niveau reduziert werden (ebd.).

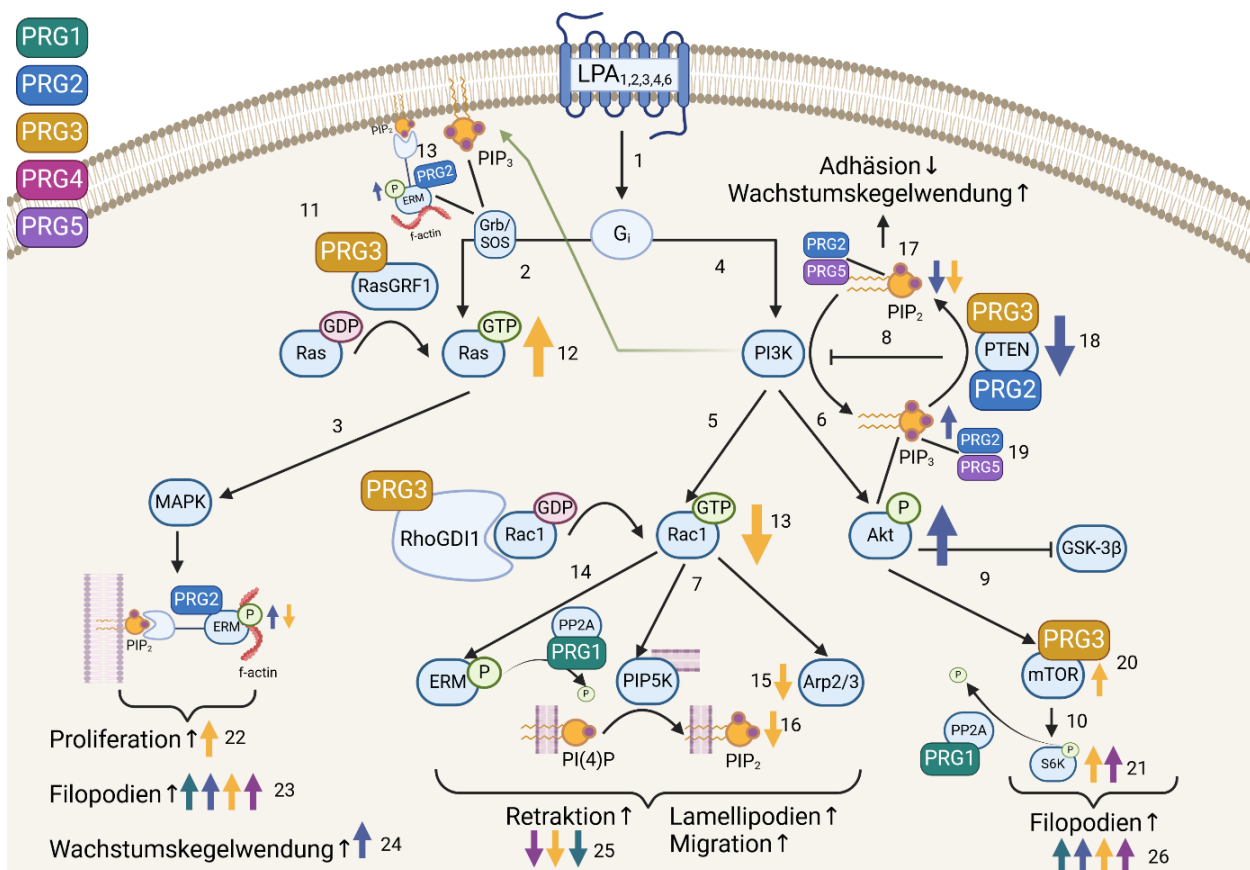
Die abwärts des Ras-Signalweges aktivierten MAPK spielen eine Rolle bei der Führung axonaler Wachstumskegel durch extrazelluläre Stimuli wie z.B. LPA (85). Die Aktivierung von Ras kommt durch ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Proteinen (u.a. Grb/SOS), Tyrosinkinasen und evtl. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (wie den

LPA-Rezeptoren) zustande (86). Essentiell für die Aktivierung von Ras ist dabei die enge Kooperation der verschiedenen Akteure an der Plasmamembran, wobei zum einen PIP<sub>3</sub> als Ankermolekül (86,87) und zum anderen PIP<sub>2</sub> gebundene, aktivierte ERM-Moleküle wichtige Rollen zukommen (88). Wie unten dargestellt, ist eine Interaktion von PRGs mit dem PIP-Stoffwechsel wahrscheinlich, sodass eine sekundäre Modulation der Ras-Aktivierung denkbar ist. Eine direkte Interaktion eines der ERM-Moleküle (nämlich Radixin) mit PRG2 ist bereits bekannt (s.o.), durch welche die Ras-vermittelte Wendung axonaler Wachstumskegel moduliert wird (20).

Ebenfalls durch G<sub>i</sub> aktiviert wird die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (64). PI3K synthetisiert PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat) aus PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und aktiviert in der Folge den Rac1- und den Akt-Signalweg (64). Der PI3K-Akt-Signalweg dient u.a. der Ausbildung von axonalen Filopodien, den Vorläufern axonaler Verzweigungen (20,89).

Eng mit dem RhoA-Signalweg verbunden ist der Rac1-Signalweg. Teilweise wird diesem Signalweg eine synergistische Wirkung (82) und teilweise eine antagonistische Wirkung (76) zugeschrieben. PRG3 scheint die Aktivierung von Rac1 zu reduzieren (24,84) – ebenfalls durch die Interaktion mit RhoGDI1, da dieses neben RhoA auch Rac1 bindet (24). Die lokalisierte Produktion von PIP<sub>2</sub> durch die membrangebundene PIP5K (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-1) sowie die Aktivierung und Lokalisation des Arp2/3-Komplexes (Actin-related Protein 2 und 3) sind in der Folge der gestörten Rac1-Aktivierung in PRG3-überexprimierenden Zellen gestört (24,84). Dazu passt das Ergebnis, dass die durch PRG3 induzierte Bildung von Filopodien unabhängig vom Arp2/3-Komplex (, welcher auch im Rahmen des Cdc42 (Cell division control 42) Signalweges aktiviert wird,) zu sein scheint (90).

In der Folge einer Aktivierung von Akt (Proteinkinase B) kommt es u.a. zu der Aktivierung des mTOR-Signalweges (mechanistic Target Of Rapamycin) mit u.a. Phosphorylierung der S6-Kinase (64). Es ist beschrieben, dass PRG3 an mTOR bindet und die Phosphorylierung der S6-Kinase in PRG3-überexprimierenden Zellen (sowie bei der Koexpression von PRG3 mit PRG2,-1 und -5) erhöht ist (37). Dennoch scheint der Effekt von mTOR auf den durch PRG3 und -5 induzierten Phänotyp von untergeordneter Bedeutung zu sein (ebd.). Zudem ist bekannt, dass PRGs mit (negativen) Modulatoren des mTOR-Signalweges interagieren: Für PRG1 ist eine Interaktion mit PP2A (Protein Phosphatase 2A) (s.u.) (30,91), für PRG2 eine Interaktion mit PTEN beschrieben (28,92). Neben einer Induktion des mTOR-Signalweges führt die Aktivierung von Akt u.a. auch zu einer Inhibierung von dem Enzym GSK-3 $\beta$  (6,93), welches abwärts von RhoA an der Neuritenretraktion beteiligt ist (69).



**Abbildung 7: Interaktion der PRGs mit dem Ras- und dem PI3K-Signalweg.** Angelehnt an (64). Die **PRG-Boxen** markieren direkte Interaktion mittels Bindung (z.B. PRG3 – RasGRF1), die **Pfeile** Auswirkungen der PRGs auf Aktivierungen/zelluläre Reaktionen bei Überexpression. **PRG:** Plasticity Related Gene. **LPA<sub>1,2,3,4,6</sub>:** LPA-Rezeptoren. **G<sub>i</sub>:** G<sub>i</sub> Proteine. **PIP<sub>3</sub>:** Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat. **PIP<sub>2</sub>:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. **Grb/SOS:** Grb2/SOS Komplex. **GDP/GTP:** Guanosindi/triphosphat. **MAPK:** Mitogen-aktivierte Proteinkinasen. **PI3K:** Phosphoinosid-3 Kinase. **PTEN:** Phosphatase and Tensin homolog. **Akt:** Proteinkinase B. **mTOR:** mechanistic Target Of Rapamycin. **PP2A:** Protein-Phosphatase 2. **S6K:** S6-Kinase. **ERM:** Ezrin, Radixin, Moesin Proteinklasse. **PIP5K:** Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase. **Arp2/3:** Aktin Related Protein 2/3 Komplex. Referenzen 1(64), 2(64,86–88), 3(87), 4(64), 5(64), 6(64), 7(80,82,94), 8(95), 9 (6,96), 10(91,96,97), 11(22,40), 12(22,40), 13(24,84), 14(30), 15(84), 16(22), 17(22,25,28,36), 18(28,37), 19(25,36), 20(37), 21(37), 22(40), 23(22,23,25,28,30,36,73), 24(20), 25(10,22–24), 26(22,23,25,28,30,36,73). Abbildung erstellt mit BioRender.com

### Interaktion mit dem PIP-Metabolismus

Phosphatidylinositol (PIPs) sind als polare Lipide Bestandteil zellulärer Membranen, interagieren mit Membranproteinen und Bestandteilen des Zytoskeletts und dienen als intrazelluläre Botenstoffe in zahlreichen Signalwegen (98). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) ist dabei ein zentraler Regulator des Zytoskeletts (ebd.). Durch LPA wird sowohl die Synthese von PIP<sub>2</sub> mittels PIP5K (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase) infolge RhoA/Rac-Aktivierung (G<sub>12/13</sub>/G<sub>i</sub>) als auch der Abbau zu den Botenstoffen Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) mittels Phospholipase C (PLC) (G<sub>q</sub>) oder zu dem höher phosphorylierten PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) mittels PI3K (G<sub>i</sub>) induziert (s. **Abbildung 6-8**, s. (64)). Die lokalisierte Produktion von PIP<sub>2</sub> durch PIP5K in der Plasmamembran spielt eine wichtige Rolle bei der LPA-induzierten Neuritenretraktion (40,82,99,99).

Mehrfach konnte gezeigt werden, dass PRGs in der Lage sind mit PIPs zu interagieren (22,25,28,36,100). Dabei spielt vermutlich neben einer Interaktion mit dem PIP-Metabolismus eine gezielte Lokalisierung von PIPs in bestimmten Membranabschnitten durch PRGs eine Rolle (25). Zudem könnten PIPs der Stabilisierung, Membranverankerung und Lokalisation von PRGs dienen (ebd.). In der Tat wurden PRG2 (25) und PRG5 (36) als PIP-bindende Proteine (sowohl

für PIP<sub>2</sub> als auch für PIP<sub>3</sub>) identifiziert. Über eine Inhibition von Rho und Rac wird vermutlich sekundär die lokalisierte Produktion von PIP<sub>2</sub> aus PI(4)P (Phosphatidylinositol-4-phosphate) durch PRG3 (und -5) gehemmt (22–24,84). Möglicherweise steht in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass eine Überexpression von PRG3 membrangebundenes PIP<sub>2</sub> reduziert (22). Die Tatsache, dass eine Überexpression von PRG3 die durch PIP5K induzierte Neuritenretraktion aufhebt (22), spricht dafür, dass die Auswirkungen von PRG3 auf den PIP-Metabolismus nicht allein sekundär durch RhoA/Rac1-Inhibition zu erklären sind, sondern eine direkte Interaktion mit dem PIP-Metabolismus (abwärts von PIP5K) vorliegt. PRG2 scheint zudem über eine direkte Interaktion mit der Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) den Abbau von PIP<sub>3</sub> zu PIP<sub>2</sub> zu inhibieren (28,100). Auch für PRG3 wird eine Bindung zu PTEN mit unklarer Funktionalität beschrieben (37). Über eine Erhöhung von membrangebundenem PIP<sub>3</sub> wird u.a. der Ras-Signalweg sekundär gefördert (s.o.).

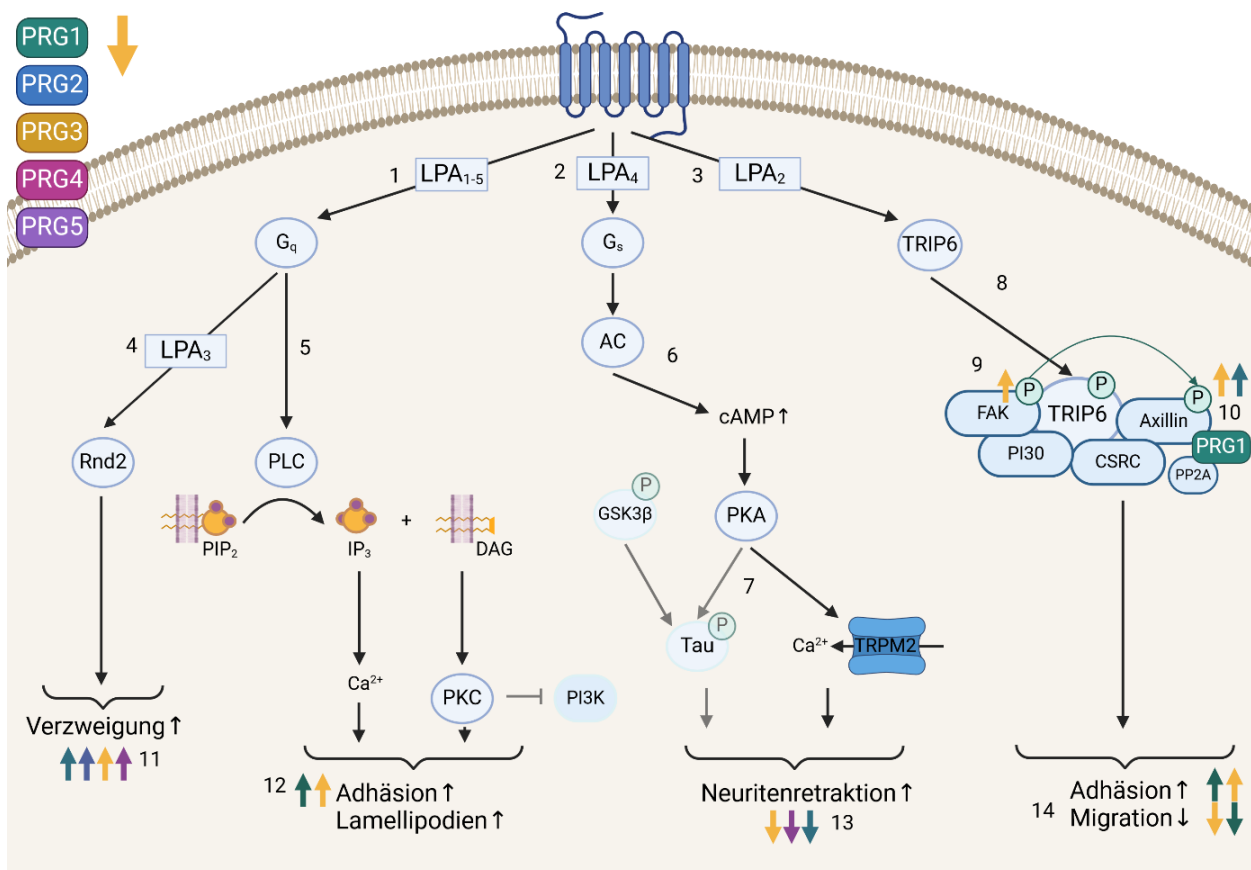
PIP<sub>2</sub> dient auch als Membrananker für die ERM-Familie und ist für deren Phosphorylierung und damit die Aktivierung entscheidend (78,101,102). Phosphorylierte ERM tragen abwärts des Ras- und Rho-Signalweges zu einer Abwendung des Wachstumskegels von LPA-reichen Arealen bis hin zum Wachstumskegelskollaps bei (20). Eine Phosphorylierung von Radixin verstärkt dabei die Bindung zu PRG2, welches anschließend im Sinne einer positiven Verstärkung die Radixin-vermittelten Veränderungen des Zytoskelettes verstärkt (20) (s.o.). PIP<sub>2</sub> fördert außerdem die Dissoziation von Adhäsionsmolekülen wie Vinculin von Adhäsionskomplexen (99,103).

### Interaktion mit anderen Signalwegen

Neben den vorgestellten Signalwegen werden weitere Signalwege via G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub> sowie TRIP6 (Thyroid Receptor Interacting Protein 6) durch LPA beeinflusst (64). Direkte Interaktionen zwischen PRGs und diesen Signalwegen sind bisher nicht bekannt. Allerdings ist beschrieben, dass die beiden Proteine FAK (Focal Adhesion Kinase) und Paxillin, welche in ihrer aktiven, phosphorylierten Form an das durch LPA<sub>2</sub> phosphorylierte und aktivierte TRIP6 binden, in PRG3- und PRG1-überexprimierenden Zellen vermehrt phosphoryliert vorliegen (30,84).

Zudem ist bekannt, dass mehrere PRGs mit Integrinen interagieren und somit auf Adhäsionsprozesse einwirken. Für PRG1 ist beschrieben, dass es über eine Interaktion des C-Terminus mit PP2A (Protein-Phosphatase 2) dessen Phosphatase-Aktivität beeinflusst und dadurch zu einer Aktivierung von  $\beta$ 1-Integrin (ITGB1) beiträgt (30). Die Bindestelle zwischen PRG1 und PP2A (Calmodulin-bindende Region des C-Terminus) ähnelt dabei stark einer mutmaßlich ebenfalls Calmodulin-bindenden Region im C-Terminus von PRG2 (25), sodass für PRG2 möglicherweise eine ähnliche Interaktion besteht. Eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration (wie sie auch infolge der Aktivierung von LPA-Signalwegen vorkommt,) kann die Bindung von PRG1 an PP2A stören (104). PP2A ist eine Phosphatase, für welche neben der Interaktion mit Adhäsionskomplexen eine Interaktion mit den mTOR-Signalwegen, der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) sowie mit dem Ras-MAPK-Signalweg (91,97,105,106) bekannt ist, welche auch durch LPA-Signalwege moduliert werden (s.o. und (69)). Neben der Interaktion mit PP2A scheint PRG1 auch mittels des Transkriptionsfaktors Sp1 (Specificity protein 1) die Expression von Integrinen positiv zu beeinflussen (107).





**Abbildung 8: Interaktion mit dem PLC-, dem AC- und dem TRIP6-Signalweg.** Angelehnt an (64). **PRG:** Plasticity Related Gene. **LPA<sub>1-5</sub>:** LPA-Rezeptoren. **G<sub>q/s</sub>:** G-Proteine. **Rnd2:** Rnd2 G-Protein. **PLC:** Phospholipase C. **PIP<sub>2</sub>:** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat. **IP<sub>3</sub>:** Inositoltrisphosphat. **DAG:** Diacylglycerol. **PKC:** Proteinkinase C. **PI3K:** Phosphoinosid-3 Kinase. **AC:** Adenylatcyclase. **cAMP:** cyclisches Adenosinmonophosphat. **PKA:** Proteinkinase A. **Tau:** Tau-Protein. **P:** phosphoryliert. **GSK-3β:** Glykogensynthase-Kinase 3β. **TRPM2:** Transient receptor potential cation channel 2. **TRIP6:** Thyroid receptor-interacting Protein 6. **FAK:** focal adhesion kinase. **P130:** Protein P130. **CSRC:** Tyrosinkinase Src. **PP2A:** Protein-Phosphatase 2. Referenzen: 1(64), 2(64), 3(64), 4(63), 5(64), 6(64), 7(65,69), 8(64), 9(84), 10(30,84), 11(22,23,25,28,30,36,73), 12(30,84), 13(10,22-24), 14(30,84). Abbildung erstellt mit BioRender.com

## 1.4 Funktionelle Implikationen der Interaktion von PRGs mit LPA während der Entwicklung neuronaler Netzwerke

Zu den basalen Mechanismen der Entwicklung neuronaler Netzwerke gehören die Neurogenese einschließlich der Teilung von Stammzellen und der Differenzierung zu Neuronen und anderen Zelltypen (108), die Neuritogenese (15,109) im Sinne der Ausbildung und des Wachstums neuronaler Fortsätze sowie die Synaptogenese (110). Weitere Prozesse der Entwicklung neuronaler Netzwerke sind die neuronale Migration (111,112), die Myelinisierung (113,114) und die Steuerung von Proliferation und Apoptose (115,116).

### 1.4.1 Die Funktion von LPA während der Entwicklung neuronaler Netzwerke

Während der Entwicklung neuronaler Netzwerke erfüllen Lysophosphatidsäuren multiple Funktionen (18,19). Sie haben Einfluss auf alle Zelltypen des zentralen Nervensystems (19). Der Knockout des Gens des LPA synthetisierenden Enzyms ATX (117,118) führt bei Mäusen zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen auf neuronaler und vaskulärer Ebene mit der Folge eines embryonalen Versterbens.

LPA haben Einfluss auf das Überleben, die Differenzierung, die Migration (vor allem über LPA<sub>4</sub>) von Neuroprogenitorzellen sowie auf die Führung von Axonen an ihren Zielort (18,20,119–122). Außerdem scheinen sie an der Induktion von interkinetischer nuklearer Migration von Neuroblasten der ventrikulären Zone, einem Prozess,

welcher gravierende Veränderungen der Zellmorphologie mit Veränderungen innerhalb des Zellzyklus verbindet (123,124), beteiligt zu sein (125). Als Chemorepellent im physiologischen System haben LPA Einfluss auf die korrekte Führung von (insbesondere thalamokortikalen) Axonen an ihren Zielort (18,20). Außerdem erhöhen LPA, welche vermutlich durch von Astrozyten sezerniertes ATX gebildet werden, die Exzitabilität an glutamatergen Synapsen (vor allem über LPA<sub>2</sub>) (26,126). Eine Dysregulation an dieser Stelle kann zu Verhaltensstörungen möglicherweise im Rahmen psychiatrischer Störungen wie Schizophrenie und affektiven Störungen (18,26,126–128) als auch zu (juveniler) Epilepsie (26,129,129) führen.

### **1.4.2 Die Funktion von PRGs während der Entwicklung neuronaler Netzwerke**

PRGs erfüllen ihre Funktionen während der Entwicklung neuronaler Netzwerke vermutlich zumindest zum Teil im Rahmen einer Interaktion mit LPA (s. Kapitel 1.3). Insbesondere drei Funktionen sind bisher Schwerpunkt der Forschung gewesen: die Beteiligung an der Ausbildung und Differenzierung neuronaler Fortsätze, die Führung axonaler Wachstumskegel sowie die Modulation der Erregungsübertragung an exzitatorischen Synapsen.

#### **Die Ausbildung und Differenzierung neuronaler Fortsätze**

Während der Entwicklung des zentralen Nervensystems scheinen alle PRGs bis auf PRG4 (dessen Funktion unklar ist,) an der Ausbildung, Differenzierung, Verzweigung und dem Wachstum von neuronalen Zellausläufern beteiligt zu sein (25). Die Begriffe für die verschiedenen Zellausläufer sind im Allgemeinen nicht genau definiert. In dieser Arbeit werden als Filopodien zelluläre Ausstülpungen nichtneuronaler bzw. undifferenzierter Zellen bezeichnet, als Neuriten die längeren zellulären Fortsätze von neuronalen Zellen (sowohl Neuroblastomzellen als auch Neurone, welche noch keine Differenzierung der neuronalen Fortsätze in Axone oder Dendriten aufweisen) und als Protrusionen die kurzen (wenige µm langen) zellulären Fortsätze, welche von diesen Neuriten ausgehen. PRGs haben sowohl Auswirkungen auf die Ausbildung von Filopodien in nichtneuronalen Zellen (22,23,30,34,73,90) als auch auf das Auswachsen von Neuriten in neuronalen Zellen (22,23,34,35,73,130,131) sowie die Differenzierung von Neuriten zu Dendriten und Axonen, auf deren Auswachsen und die Bildung von Verzweigungen (10,28,34,100,131) und auf die Entwicklung von dendritischen Spines (30,33,36,104). Möglicherweise sind PRGs auch an der Ausbildung, Differenzierung und dem Wachstum der zellulären Fortsätze nichtneuronaler Zellen des zentralen Nervensystems beteiligt. Dies ist bisher jedoch nicht Gegenstand der Forschung gewesen.

Es ist darauf hinzuweisen, dass die Untersuchung der durch PRG-Überexpression induzierten zellulären Fortsätze insbesondere zwei methodische Probleme aufwies. Zum einen wurden als Vergleichsobjekte i.d.R. entweder die nicht in der Membran lokalisierten Kontrollplasmide GFP/Flag oder (C-terminal-trunkierte Versionen der oder andere) PRGs selbst verwendet. Zum anderen wurde i.d.R. keine Färbung der Plasmamembran genutzt, sondern eine Färbung des Aktinzytoskelettes. Es ist somit nicht bewiesen, dass eine erhöhte PRG-Expression in nichtneuronalen Zellen tatsächlich im Vergleich zu einem membranständigen Kontrollplasmid die Filopodien-/Neuritenanzahl erhöht. Nicht auszuschließen ist, dass stattdessen die erhöhte Expression von trunkierten Versionen / PRG4 diese erniedrigt. Die Summe der Ergebnisse sowie der Nachweis von Auswirkungen auf die Morphologie von primären Neuronen lassen die Annahme von Filopodien/Neuriteninduktion durch PRG-Überexpression weiterhin als wahrscheinlich gelten, jedoch steht eine Bestätigung bis heute aus.

Die PRGs können anhand der subzellulären Lokalisation und dem embryonalen Expressionsmuster grob in zwei Gruppen eingeteilt werden, wobei PRG4 sich nicht zuordnen lässt (25,33): PRG2 und -3 scheinen als früh embryonal exprimierte Proteine Einfluss insbesondere auf die Differenzierung, das Wachstum und die Verzweigung axonaler Fortsätze zu haben (22,25,28,33,34,73,100). Dahingegen sind PRG1 und -5 insbesondere postsynaptisch in

dendritischen Spines lokalisierte Proteine mit einem später beginnenden und länger andauerndem Expressionsmuster (25,28,33). Diese beiden Proteine sind somit vermutlich insbesondere an der Ausreifung der dendritischen Ausläufer sowie der synaptischen Übertragung in differenzierten Neuronen in späteren embryonalen Stadien und postpartal von Bedeutung (23,25,26,33,36,132).

### **Die Führung axonaler Wachstumskegel**

Bisher ausschließlich für PRG2 wurde eine Beteiligung an der Führung axonaler Wachstumskegel thalamokortikaler Neurone während der embryonalen Entwicklung beschrieben (20). Während sich normalerweise am Embryonaltag 16 die thalamokortikalen Fasern in der sogenannten intermediaten Zone unterhalb der kortikalen Platte sammeln (133), dringen Fasern ohne PRG2 verfrüht in das Areal der kortikalen Platte ein (20). Dieses verfrühte Einwachsen der axonalen Fortsätze in die kortikale Rinde scheint in Zusammenhang mit einer weniger feinen Trennung der innervierten Zonen und funktionell mit einer reduzierten Fähigkeit zur Unterscheidung von sensiblen Tastwahrnehmungen zu stehen (20). Diese Beobachtung wurde auf Interaktionen mit dem LPA-Stoffwechsel zurückgeführt: LPA, welches durch Autotaxin – sezerniert durch eine vorübergehende Neuronenpopulation der Subplatte (Region direkt unterhalb der kortikalen Platte) – gebildet wird, scheint eine wichtige Rolle dabei zu spielen, die thalamokortikalen Axone in dieser Phase der Embryonalentwicklung an der Einwanderung in die kortikale Platte zu hindern (20). Es konnte gezeigt werden, dass LPA in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  (und niedriger) zu einer axonalen Richtungsänderung führt, wobei sich der Wachstumskegel von der LPA-reichen Region abwendet (20). In Neuronen ohne PRG2-Expression ist dieser Effekt von LPA signifikant reduziert (20). Im Gegenteil scheint es (bisher unerklärlicherweise) sogar zu einem Anziehen der Wachstumskegel in Richtung LPA zu kommen (20). PRG2 scheint somit als eine Art LPA-Sensor zu fungieren und den retrahierenden Effekt von LPA zu vermitteln (20,25). Dieser Phänotyp wurde in Zusammenhang mit einer direkten Interaktion von PRG2 mit dem ERM Protein Radixin gebracht (20) (s. 1.3.3).

### **Die Modulation synaptischer Aktivität**

Insbesondere für PRG1 konnte eine Funktion im Sinne der Modulation synaptischer Aktivität an exzitatorischen Synapsen insbesondere während der frühen postnatalen Entwicklung nachgewiesen werden (26,74,129). Für *Prg1*-KO Mäuse konnte gezeigt werden, dass diese ein signifikant erhöhtes Risiko für juvenile epileptische Anfälle bei zugrundeliegender erhöhter Exzitabilität besitzen (26). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass aufgrund einer nach *Prg1*-KO verringerten Aufnahme von LPA nach intrazellulär LPA vermehrt im synaptischen Spalt vorliegen und dort an exzitatorisch wirksame LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren binden können (26). Es handelt sich somit um eine indirekte Interaktion von postsynaptisch lokalisiertem PRG1 mit präsynaptisch lokalisierten LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren (26). Interessanterweise konnten bei Mäusen mit einem heterozygoten Defekt des *Prg1*-Gens Verhaltensauffälligkeiten auf der Basis einer erhöhten Exzitabilität festgestellt werden, welche nach der Verwendung eines Autotaxin-Inhibitors (intraperitoneale Injektion) *in vivo* regredient waren (74). PRG1 scheint im Rahmen der Modulation LPA-induzierter Exzitabilität auch Einfluss auf das Hungergefühl und die Prävalenz von Adipositas und Diabetes zu haben (134).

### **1.5 Funktionelle Implikationen der Interaktion von PRGs mit LPA während der Regeneration neuronaler Netzwerke**

Neurone des zentralen Nervensystems sind nur in geringem Umfang in der Lage, Prozesse der Entwicklung gleichsam für die Regeneration nach Verletzungen zu nutzen (5,9,135,136). Weil die Neurogenese im adulten System nur sehr begrenzt möglich ist (137), wird die Regeneration insbesondere durch das Ausbilden neuer Verknüpfungen erzielt. Für die Synaptogenese müssen zuvor teilweise weite Distanzen mittels Genese und Elongation neuronaler Fortsätze überbrückt werden. Allerdings ist das axonale Auswachsen im adulten System i.d.R. nur in geringem Ausmaß zu

beobachten, wohingegen während der embryonalen Entwicklung und auch im adulten peripheren Nervensystem gerichtete und weitreichende axonale Elongation möglich ist (5,9,135,136).

Ursächlich für diese unzureichende Regenerationsfähigkeit adulter Neurone des zentralen Nervensystems sind zum einen intrinsische Faktoren der differenzierten Neurone („eingefrorener“ Zustand, keine Teilung, kein Auswachsen) und zum anderen extrinsischen Faktoren (extrazelluläres Milieu) (6). Das extrazelluläre Milieu innerhalb des adulten Systems (bereits basal und weiter aggraviert infolge von Läsionen) unterscheidet sich dahingehend deutlich vom embryonalen Milieu, dass das Auswachsen von Neuriten nun gebremst wird und eine (gerichtete) Lenkung der auswachsenden Strukturen zu ihren Zielorten hin nicht mehr gegeben ist (138). U.a. durch aktivierte Astrozyten werden in der Folge von Neurotraumata vermehrt repulsive Mediatoren gebildet und in den Extrazellularraum sezerniert, sodass eine gliale Narbe entsteht, welche für neuronale Fortsätze beinahe unüberwindbar ist (136,138,139). Regeneratives Aussprossen ist außerdem nicht per se günstig, denn ohne feinjustierte Lenkung können ungeordnete und ungünstige Verbindungen geknüpft werden, welche z.B. epileptische Anfälle begünstigen können (140). Außerdem ist ein Aussprossen ohne intakte Synaptogenese wirkungslos. Im Nachgang der primären Läsion führen zudem immunologische Prozesse sowie Exzitotoxizität zu sekundären Schäden mit u.a. der Einleitung von Apoptose und Nekrose sowie Demyelinisierung, welche den primären Schaden weit übertreffen können (141,142).

Aufgrund dieser Problematik ist es von hohem Interesse zu verstehen, welche Mechanismen die neuronale Regeneration unterstützen können. Vorbildhaften Charakter besitzen dabei Prozesse der embryonalen Entwicklung.

### 1.5.1 Die Funktion von LPA während der Regeneration neuronaler Netzwerke

Im Erwachsenenalter haben LPA Funktionen u.a. in der synaptischen Übertragung (18), sind jedoch nicht mehr von derart großer Bedeutung wie während der embryonalen Entwicklung, sodass ein ATX-Mangel im adulten System nicht zu offensichtlichen Pathologien führt (18,143).

Infolge traumatischer Verletzungen von neuronalem Gewebe wurden deutlich erhöhte LPA-Konzentrationen im Gewebe sowie im Liquor gemessen (58,144,145). Diese LPA entstammen zum einen der Neusynthese durch (von aktivierten Astrozyten sezerniertes) ATX (21), zum anderen dem Serum bei hämorrhagischen Ereignissen (56,144,146) sowie der Akkumulation bei eingeschränkter Funktion der Blut-Hirn-Schranke (18,58,141). Andererseits wurde ein erniedrigtes mRNA-Expressionslevel von ATX bei der Untersuchung von Gehirngewebe von Menschen festgestellt, welche infolge eines Schädel-Hirn-Traumas starben (147). Da bekannt ist, dass LPA die ATX-Aktivität direkt modulieren können, (148) ist denkbar, dass dies ebenfalls Ausdruck einer negativen Rückkopplung (auf Ebene der Expression) ist. In diesem Fall ist die ATX-Expression nur kurzzeitig erhöht und nimmt anschließend wieder ab. In der Folge von Neurotraumata kommt es zudem zu Expressionsveränderungen von LPA-Rezeptoren (insbesondere Erhöhung der Expression von *Lpar2*) (147).

LPA gehören zu den wachstumsinhibierenden Botenstoffen, welche während der Entwicklung wichtige Funktionen bei der axonalen Führung spielen (niedrige Konzentrationen in bestimmten Bereichen → Wachstumskegelwendung), jedoch nach einem Neurotrauma das regenerative Aussprossen von Axonen behindern können (stark erhöhte Konzentration in lädierten Arealen → Wachstumskegelkollaps, Verhinderung von erneutem Aussprossen und Elongation) (4,5,135,136,149,150). Darüber hinaus sind LPA an sekundären Schädigungsprozessen im Rahmen immunologischer Reaktionen, Mikrogliaaktivierung und sekundärer Demyelinisierung (151,152) sowie Exzitotoxizität (153) beteiligt. Aufgrund dessen sind Autotaxin-Inhibitoren und damit der Eingriff in LPA-Metabolismus und Signalwege eine therapeutische Option für die zukünftige Behandlung verschiedenster neuronaler Läsionen (153–155).

### 1.5.2 Die Funktion von PRGs während der Regeneration neuronaler Netzwerke

PRG1 wurde auf der Suche nach Proteinen entdeckt, welche in der Phase der Neuroregeneration nach einer hippocampal-entorrhinalen Läsion in der lädierten Region überexprimiert werden (10). Eine Hochregulierung der *Prg1*-Expression konnte später auch in lädiertem N. facialis nachgewiesen werden (39). Auch andere PRGs zeigen eine veränderte Expression infolge einer Schädigung neuronaler Netzwerke: Eine Injektion der stark exzitatorisch wirksamen Kainsäure in den Hippocampus oder künstlich postnatal medikamentös ausgelöste, wiederholte epileptische Anfälle scheinen eine Abnahme der *Prg3*- (73,156) und eine Zunahme der *Prg1*-Expression (157) zu bewirken. *Prg3* scheint insbesondere in intakt aussprossenden Neuronen vermehrt exprimiert zu werden (131).

Es ist denkbar, dass die PRGs unterschiedliche, evtl. auch gegensätzliche Funktionen erfüllen. Möglicherweise wirken die verschiedenen PRGs im Rahmen der Neuroregeneration als Komplexe (Homo- oder Heteromultimere) und ihre Wirkung ergänzt und verstärkt sich gegenseitig (25,37).

### Die Stabilisierung von neuronalen Fortsätzen gegenüber Wachstumsinhibitoren

Möglicherweise haben PRGs sowohl Einfluss auf intrinsische als auch auf extrinsische Faktoren, welche die Neuroregeneration im adulten zentralen Nervensystem erschweren (3). Ein Schwerpunkt der bisherigen Forschung lag bisher auf der Stabilisierung von neuronalen Fortsätzen gegenüber extrinsischen Faktoren, nämlich insbesondere gegenüber Wachstumsinhibitoren wie LPA.

Für PRG1, -3 und -5 wurde gezeigt, dass eine Überexpression in Neuroblastomzelllinien die LPA-induzierte Neuritenretraktion verringert (10,22–24). Am stärksten scheint der Effekt von PRG1 zu sein (komplette Aufhebung der LPA-induzierten Retraktion auch bei hohen LPA-Konzentrationen bis 50  $\mu$ M), während PRG3- und PRG5-überexprimierende Zellen bei LPA-Konzentrationen von 500 nM (PRG3/5) bis 16  $\mu$ M (nur PRG3) eine signifikante Reduktion (jedoch nicht eine Aufhebung) der Neuritenretraktion zeigten, wobei die verschiedenen Messvariablen (Neuritenlänge in  $\mu$ m vs. Prozent der retrahierenden Neuriten) eine Vergleichbarkeit erschweren (22,24). Für PRG3 konnte gezeigt werden, dass es nicht nur der LPA-, sondern auch der Myelin-, Thrombin- und Proteoglycan-induzierten Neuritenretraktion entgegenwirkt (22,24). Dies spricht dafür, dass intrazellulär Interaktionen mit (den durch mehrere Faktoren induzierten) Signalwegen vorliegen. Die wachstumsinhibierenden Botenstoffe wirken größtenteils über den RhoA-ROCK-Signalweg (5), dessen Aktivierung durch die PRGs reduziert wird (s. oben 1.3.3). Eine Kombination aus Veränderung intrinsischer Faktoren (Verstärkung der Adhäsion etc.) sowie eine Verringerung der Wirkung hemmender extrinsischer Faktoren könnten somit die Regenerationsfähigkeit verbessern.

Auch die von PRG2 bekanntermaßen inhibierte Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) hat einen direkten Einfluss auf die durch negative Signale (z.B. durch das Myelin-assoziierte Glykoprotein) induzierte Wachstumshemmung von axonalen Wachstumskegeln (28,158). Bisher wurde nicht explizit untersucht, ob PRG2 ebenfalls in der Lage ist, die LPA-induzierte Neuritenretraktion zu hemmen. Im Gegenteil wurde aufgrund der beschriebenen Wirkung von PRG2 an axonalen Wachstumskegeln während der embryonalen Entwicklung die Hypothese aufgestellt, dass PRG2 eine den anderen PRGs entgegengesetzte Funktion erfülle und somit vermutlich die LPA-induzierte Neuritenretraktion verstärke (25,159).

Die Hemmung des RhoA-Rock-Signalweges (160), der KO des NogoA-Rezeptor-1 (anderer wachstumshemmender Faktor) (161), der KO des LPA<sub>1</sub> Rezeptors (131) sowie eine medikamentöse Inhibition von PTEN (92) wurden unabhängig von den PRGs in Verbindung mit einer verbesserten Neuroregeneration gebracht. Im Mausmodell konnte die funktionelle Relevanz von einer Überexpression von PRG3 für eine verbesserte Neuroregeneration gezeigt werden (22,131). *Prg5*-KO-Mäuse zeigen eine verschlechterte Regenerationsfähigkeit in einem Mausmodell für hypoxisch-

ischämische Enzephalopathie (162,163) sowie ein verringertes axonales Aussprossen (Mossy fiber outgrowth (MOS)) in der Folge von epileptischen Anfällen (164).

### **Andere Effekte von PRGs während der Regeneration neuronaler Netzwerke**

Elementar für eine gelingende Neuroregeneration sind auch intrinsische Faktoren wie das Zellüberleben der Neurone (und anderer Zelltypen). Auch hierauf scheinen PRGs Einfluss zu nehmen. *Prg1*-KO-Neurone zeigen eine verringerte Viabilität (165). PRG5 scheint zudem mit dem mitochondrialen Energiestoffwechsel zu interferieren (164) und hat somit möglicherweise ebenfalls Einfluss auf die Viabilität von Neuronen.

Zudem ist anzunehmen, dass PRGs auch auf (u.a. durch LPA induzierte) sekundäre Schädigungen (s.o. (1.5.1)) Einfluss nehmen. Zum Beispiel ist bekannt, dass PRG1 die durch LPA induzierte Hyperexzitabilität von exzitatorischen Neuronen reduziert (26) und somit möglicherweise dazu beiträgt, sekundäre Schäden durch Exzitotoxizität zu verringern, eventuell verbunden mit einer höheren Viabilität der Neurone. Ob PRGs auch LPA-induzierte immunologische Prozesse in der Folge von Läsionen modulieren, ist bisher nicht Gegenstand der Forschung gewesen.

### 1.6 Forschungsfrage und Hypothesen

In dem hier vorgestellten Forschungsprojekt wird die Interaktion von PRG2 mit Lysophosphatidsäuren beleuchtet. Im Zentrum steht die Frage, ob PRG2 die LPA-induzierte Neuritenretraktion in neuronalen Zellen (ebenso wie andere PRGs (10,22–24)) hemmt oder im Gegenteil aggraviert (entsprechend seiner Wirkung an axonalen Wachstumskegeln während der embryonalen Entwicklung (20,100,159)). Als Positivkontrolle wurden PRG3-überexprimierende Zellen verwendet, da hierfür Daten existieren.

- **Hauptfragestellung:** Wird die LPA-induzierte Neuritenretraktion durch PRG2-Überexpression in neuronalen Zellen (Modellorganismus: Neuro2a) reduziert oder aggraviert?
- **Hypothese:** Aufgrund der Interaktion mit PTEN wird die Neuritenretraktion durch PRG2-Überexpression trotz einer möglicher Interaktion mit ERM reduziert.

Als Vorarbeit zu dieser Hauptfragestellung wurde die Morphologie von PRG2-überexprimierenden Neuro2a mit der Frage untersucht, ob PRG2 in der Plasmamembran lokalisiert ist und ob PRG2 in der Lage ist, die Anzahl oder die Länge der zellulären Ausläufer zu verändern. Als Vergleichsobjekt zu Neuro2a-Zellen wurden HEK293T-Zellen verwendet, weil in diesen mehrfach die Morphologie und die Lokalisation bei PRG-Überexpression beschrieben wurde. Vergleichend zu PRG2 wurden ebenfalls die induzierte Morphologie und Lokalisation der anderen PRGs im Rahmen der Überexpression untersucht. Als Voraussetzung für Überexpressionsstudien in Neuro2a wurde die basale PRG-Expression in Neuro2a quantifiziert.

- Nebenfragestellung 1: Sind PRGs in Neuro2a basal exprimiert?
- Hypothese 1: PRGs sind in Neuro2a zu einem geringen Level exprimiert, welches demjenigen während früher embryonaler Stadien ähnelt.
- Nebenfragestellung 2: Wo ist PRG2 (im Vergleich zu anderen PRGs) in Neuro2a exprimiert?
- Hypothese 2: PRG2 ist in der Plasmamembran und in intrazellulären Membranen lokalisiert sowie in den Neuriten undifferenzierter und differenzierter Neuro2a.

Eine Quantifizierung der Zellausläufer PRG-überexprimierender Neuro2a-Zellen erfolgte für PRG2 und -3, um herauszufinden, ob nicht nur die Stabilität der Neuriten, sondern auch deren Anzahl und Länge beeinflusst wird und ob sich dies auch in den von den Neuriten ausgehenden Protrusionen widerspiegelt.

- Nebenfragestellung 3: Ist PRG2 in der Lage, die Anzahl oder Länge von Neuriten/Protrusionen in Neuro2a zu verändern?
- Hypothese 3: PRG2 ist in der Lage, die Anzahl oder Länge von Neuriten/Protrusionen in Neuro2a zu erhöhen.

Für die Untersuchung des LPA-induzierten Neuritenkollapses wurde zunächst die basale Expression von LPA<sub>1-6</sub> mittels qRT-PCR untersucht.

- Nebenfragestellung 4: Welche LPA-Rezeptoren sind in Neuro2a exprimiert?
- Hypothese 4: Mehrere LPA-Rezeptoren sind in Neuro2a exprimiert, insbesondere die an der Neuritenretraktion beteiligten LPA-Rezeptoren 1,2 und 4.

Es wurde anschließend ein Versuchsaufbau erarbeitet, bei welchem es verlässlich zu einer Neuritenretraktion als Antwort auf LPA kommt. Mit diesem Versuchsaufbau wurde die Neuritenretraktion in PRG2 und -3 überexprimierenden Neuro2a im Vergleich zum Kontrollplasmid CFPMem bei zwei LPA-Konzentrationen untersucht, um die Hauptfragestellung zu beantworten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

| Reagenz                                                                                           | Hersteller                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Agar-Agar (bakteriologisch)                                                                       | Carl Roth                            |
| Agarose-LE                                                                                        | Biozym                               |
| Akasolv Aqua Care                                                                                 | Carl Roth                            |
| Albumin Fraktion V, fettsäurefrei                                                                 | Carl Roth                            |
| Bacillol                                                                                          | Hartmann/Bode                        |
| Butane CV360 (für Bunsenbrenner)                                                                  | Campingaz® APPRAGAZ                  |
| Calciumchlorid-Dihydrat                                                                           | VWR                                  |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                                                           | Carl Roth                            |
| 0,5M EDTA pH 8,0                                                                                  | Invitrogen (ThermoFisher Scientific) |
| Ethanol absolut                                                                                   | ThermoFisher Scientific              |
| Ethanol vergällt 96 % (intern 70 % verdünnt)                                                      | Carl Roth                            |
| Glucose (D - (+) Glucose)                                                                         | Sigma-Aldrich-Aldrich                |
| Glycerin 99,5 % (Glycerol bidestilliert)                                                          | VWR                                  |
| Hefeextrakt                                                                                       | Carl Roth                            |
| Hepes                                                                                             | Carl Roth                            |
| Isopropanol (2-Propanol)                                                                          | Carl Roth                            |
| Kaliumchlorid                                                                                     | VWR                                  |
| Kanamycin                                                                                         | Carl Roth                            |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat $\geq 99\%$                                                           | Carl Roth                            |
| Mowiol                                                                                            | Carl Roth                            |
| Natriumchlorid $\geq 99,5\%$                                                                      | Sigma-Aldrich-Aldrich                |
| Natriumdihydrogenphosphat                                                                         | Carl Roth                            |
| Natriumhydroxid                                                                                   | Carl Roth                            |
| Nuklease-free PCR Wasser (Art Nr T143-20 ml, steril, Nuklease frei, autoklaviert, DEPC-behandelt) | Carl Roth                            |
| Ortho-Borsäure                                                                                    | VWR                                  |
| Paraformaldehyd (PFA)                                                                             | Merck                                |
| RNase Away                                                                                        | Carl Roth                            |
| Saccharose (D (+) – Saccharose $\geq 99,7\%$ ) = Sucrose                                          | Carl Roth                            |
| Salzsäure 37 % (2M/12N für pH-Adjustierung)                                                       | Carl Roth                            |
| TRIS hydrochloride                                                                                | Carl Roth                            |
| Triton X 100                                                                                      | Carl Roth/Sigma-Aldrich-Aldrich      |
| TRIzol™ Reagenz                                                                                   | Ambion                               |
| Trypton/Pepton aus Casein                                                                         | Carl Roth                            |

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

| Material                                                                             | Hersteller                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Deckplättchen CS-22S No.1 Glass Deckgläschen 22mm Square (100) (für LPA Experimente) | Warner Instruments            |
| Deckplättchen/-gläschen 12 mm #1 0,13-0,16 mm (für ICC)                              | epredia (Gerhard Menzel GmBH) |
| Deckplättchen/-gläschen 18 mm #1 0,13-0,16 mm (für ICC)                              | epredia (Gerhard Menzel GmBH) |
| Einmal-Injektionskanüle 0,9x70 mm                                                    | B Braun Sterican®             |



|                                                                               |                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Einmal-Injektionskanüle 0,6x60 mm                                             | B Braun Sterican®                |
| Falcon® 50 ml (Polypropylen) Zentrifugenröhrchen                              | Corning Science Mexico; Sarstedt |
| Falcon® 15 ml (Polypropylen) Zentrifugenröhrchen                              | Corning Science Mexico; Sarstedt |
| Rotilabo® Faltenfilter Typ 600P                                               | Carl Roth                        |
| Braune Glasfläschchen 12x32 mm Screw Thread<br>Amber Vials (für LPA Aliquots) | Thermo Scientific                |
| Glaspasteurpipetten                                                           | Carl Roth                        |
| Handschuhe                                                                    | Starguard                        |
| CryoPure Gefäß 18 ml weiß                                                     | Sarstedt                         |
| Linsenpapier No 41019010                                                      | Assistent®                       |
| Objekträger/Microscope Slides Clear Ground 0,8-1 mm                           | Fisher                           |
| Parafilm                                                                      | Witeg                            |
| PCR-Tubes 0,2 ml 8er-Streifen (gewölbter Deckel)                              | Carl Roth                        |
| 3,5 cm Petrischalen (für Zellkultur)                                          | greiner bio-one                  |
| Unbeschichtete 10 cm-Petrischalen für <i>E. coli</i> Anzucht                  | Greiner Bio-one                  |
| 10 cm-Petrischalen (für Zellkultur)                                           | Thermo Scientific                |
| Pasteurpipetten ohne Wattestopfen                                             | Carl Roth®                       |
| Pipettenspitzen                                                               | Eppendorf/Sarstedt/Biozym        |
| Polyethylenschläuche für Lebendzellmikroskopie                                | Warner Instruments               |
| Serologische Pipetten 2 ml/5 ml/10 ml/25 ml                                   | Sarstedt/Corning/Greiner-Bio-One |
| 1 ml Spritze Omnifix® FluorSolo B                                             | Braun Sterican                   |
| T25/T75 Zellkulturflaschen                                                    | Sarstedt                         |
| Reaktionsgefäße SafeSeal (Tubes) 1,5 ml, 2 ml, 5 ml                           | Fisher Scientific                |
| Safe lock PCR clean tubes 1,5 ml                                              | Eppendorf, Sarstedt              |
| Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film                                          | Bio-Rad                          |
| 6-/12-/24-Well Platte                                                         | Sarstedt                         |
| Zellschaber 245 mm, 20 mm Klinge                                              | Carl Roth/Fisherbrand            |

### 2.1.3 Geräte/Software

Tabelle 3: Geräte

| Gerät                                                                                                                      | Hersteller                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Analysenwaage                                                                                                              | Satorius                   |
| Biospektrometer                                                                                                            | Eppendorf                  |
| Bunsenbrenner gasprofi 1 (scs) (micro)                                                                                     | WLD-TEC                    |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator (3x)                                                                                            | Panasonic 1x, Eppendorf 2x |
| Chemidoc™ MP Imaging System (734BR2036)                                                                                    | Bio-Rad                    |
| CKX53 Zellkulturmikroskop                                                                                                  | Olympus                    |
| Elektrophoresekammer                                                                                                       | Bio-Rad                    |
| Eismaschine AF 103                                                                                                         | Scotsman                   |
| Feinwaage Quintix 102-1S                                                                                                   | Satorius                   |
| Flüssig-Stickstoff-Tank LS3000                                                                                             | LabSystems Taylor Wharton  |
| Gelelektrophoresekammern Sub-Cell® GT, mini Sub™ DNA Cell, Wide mini Sub™ Cell                                             | Bio-Rad                    |
| IX83 Inversmikroskop                                                                                                       | Olympus                    |
| Incucyte                                                                                                                   | Sartorius                  |
| Inkubator (mit integriertem Incucyte-System)                                                                               | Panasonic                  |
| Inkubationsschüttler Innova 40                                                                                             | Eppendorf/New Brunswick    |
| Inverses Mikroskop Leica DMI8 (für Lebendzellmikroskopie)<br>- Objektiv: HC PL Fluotar 40x, numerische Apertur: 0.60, Luft | Leica                      |
| Konfokales Mikroskop Fluoview FV3000                                                                                       | Olympus                    |

|                                                                                 |                       |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| - Objektiv: 40x, numerische Apertur: 1.40, Mineralöl                            |                       |
| Kühlsystem für Zellen (für -80°C) Corning™ CoolCell™                            | Fisher Scientific     |
| MiniSpin Zentrifuge                                                             | Eppendorf/VWR         |
| Mikrowelle                                                                      | Bosch                 |
| Mikroliterspritzen (gläsern) Serie 1700/1000, einzementierte Kanülen            | Hamilton              |
| Neubauer Zählkammer Ref 718605                                                  | Brand GmbH + Co       |
| PCR-Cycler Mastercycler nexus gradient                                          | Eppendorf             |
| Pipettenspitzen mit Filter 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl                       | Star-Lab, BioZym      |
| Pipettenspitzen ohne Filter, teilweise PCR-Clean 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl | Eppendorf, Sarstedt   |
| PH-Meter                                                                        | InoLab                |
| Pumpe inklusive Schlauchsystem (PPS2)                                           | Multichannel systems  |
| Pumpe Integra Vacusip (für ICC)                                                 | Integra               |
| qRT-PCR Maschine CFX Connect™ Real Time System                                  | Bio-Rad               |
| Reinstwasser Anlage Elga Pure/Flex 3                                            | Violia                |
| Reference 2 Pipetten                                                            | Eppendorf             |
| Rührgerät (beheizbar) RH basic 2 Model RHB2                                     | IKA®                  |
| Schüttelinkubator 37 °C innova® 40 Incubator Shaker Series                      | New Brunswick         |
| Semisterile Bank HERAGUARD ECO                                                  | ThermoScientific      |
| serologische Pipetten accu-jet® pro                                             | Brand                 |
| Sterile Bank SAFE 2020                                                          | ThermoScientific      |
| Stromquelle Power Pac™ HC                                                       | Bio-Rad               |
| Sure Cyclyer 8800 für RNA-Qualitätskontrolle (Serial No. MY17190046)            | Agilent Technologies  |
| Tape Station 4150 Serial No. DEDAB00219 (für RNA Qualitätskontrolle)            | Agilent               |
| Thermomixer C (5382GJ019070) (für 1,5 ml Gefäße)                                | Eppendorf             |
| Thermo Scientific Refrigerated Incubator (Inkubatorschrank 4 °C)                | Heratherm             |
| Thermoschüttler Rotamax 120                                                     | Heidolph              |
| Trockenschrank +60 °C HERATHERM                                                 | Thermoscientific      |
| Vortex Genie 2                                                                  | Scientific Industries |
| Ultraschallbad Elmasonic S15                                                    | Elma                  |
| Varioclav Dampfsterilisator                                                     | hp-med.com            |
| Vortexer Fisherbrand                                                            | Fisher Scientific     |
| Vortexgenie 2                                                                   | Scientific Industries |
| Vortex Advanced Mixer ZX3                                                       | VELP® Scientifica     |
| Wasserbad (bei Lebendzellmikroskopie) GFL 1092                                  | Labexchange           |
| Wasserbad Zellkultur                                                            | memmert               |
| Zentrifuge miniSpin                                                             | Eppendorf             |
| Zentrifuge 5810R (in Zellkultur)                                                | Eppendorf             |
| Zentrifuge 5424R (mit Kühlung) (kleine Zentrifuge)                              | Eppendorf             |
| Zentrifuge 5804 R (Rotor FA 45-6-30) (große Zentrifuge, Maxiprep/RNA Isolation) | Eppendorf             |
| Zentrifuge klein PCR Platz: ministar                                            | VWR                   |

Tabelle 4: verwendete Software

| Software                                                                            | Hersteller                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Bio-Rad CFX Manager/Maestro (qRT-PCR Software)                                      | Bio-Rad                            |
| BioRender 2023/24 <a href="https://www.biorender.com">https://www.biorender.com</a> | BioRender                          |
| Cellsens Dimension Desktop 3.2                                                      | Olympus Lifescience                |
| CCP4 Molecular Graphics                                                             | McNicholas <i>et al.</i> (166)     |
| Excel                                                                               | Microsoft                          |
| ExPasy DNA in protein sequence tool <a href="#">ExPASy - Translate tool</a>         | Swiss Institute for Bioinformatics |

|                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TubeSeq Service Eurofins Genomics ( <a href="https://eurofinsgenomics.eu/de/">https://eurofinsgenomics.eu/de/</a> ) | Eurofins Genomics                                                                                                                                                                                   |
| FV31S-SW software                                                                                                   | Olympus/Evident                                                                                                                                                                                     |
| GraphPad Prism 7                                                                                                    | GraphPad                                                                                                                                                                                            |
| Image Lab Software                                                                                                  | BioRad                                                                                                                                                                                              |
| Inucyte 2019B Rev 2                                                                                                 | Sartorius                                                                                                                                                                                           |
| LAS Application Suite X 3.3.2.18368                                                                                 | Leica Microsystems                                                                                                                                                                                  |
| <a href="#">Molarity Calculator   Molarity Triangle   Tocris Bioscience</a>                                         | Tocris (Pan Biotechne)                                                                                                                                                                              |
| NCBI Blast ( <a href="#">BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (nih.gov)</a> )                                   | NCBI                                                                                                                                                                                                |
| <a href="#">Online Calculator of Stock Solution (wpcalc.com)</a>                                                    | © 2023 WpCalc                                                                                                                                                                                       |
| Serial Cloner 2.6.1                                                                                                 | Softonic                                                                                                                                                                                            |
| SnapGeneViewer 6.1                                                                                                  | SnapGene by Dotmatics                                                                                                                                                                               |
| SPSS Statistics 29                                                                                                  | IBM                                                                                                                                                                                                 |
| UniProt Alignment Tool: <a href="https://www.uniprot.org/align">https://www.uniprot.org/align</a>                   | UniProt Consortium<br>( <a href="#">European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)</a> , <a href="#">SIB Swiss Institute of Bioinformatics</a> , <a href="#">Protein Information Resource (PIR)</a> ) |
| Word Office 2019                                                                                                    | Microsoft                                                                                                                                                                                           |
| Powerpoint (insbesondere für die Erstellung von Abbildungen) Office 2019                                            | Microsoft                                                                                                                                                                                           |
| Zotero Literaturverwaltungsprogramm                                                                                 | Zotero opensource                                                                                                                                                                                   |

### 2.1.4 Medien/Medienzusätze/Lipide/Puffer und Lösungen

**Tabelle 5: verwendete Medien, Medienzusätze, Lipide, Puffer und Lösungen in der Zellkultur.** \* Retinsäure ist sehr lichtempfindlich, wird in DMSO gelöst und muss aufgrund Instabilität bei Auftau-/Einfrierprozessen in kleinen Aliquots (Stammlösung 10 mM) bei -20 °C gelagert werden.

| Reagenz                                            | Hersteller                                     | Artikelnummer (Hersteller) |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|
| All-trans Retinsäure*                              | Sigma-Aldrich-Aldrich                          | R2625-50MG                 |
| DMEM                                               | Pan Biotech                                    | P04-03550                  |
| DMEM 1x                                            | gibco                                          | 11995-065                  |
| DPBS                                               | Pan Biotech                                    | P04-36500                  |
| FAFBSA (fatty acid free bovine serum albumine)     | Roth                                           | 0052.2 10mg                |
| Foetal bovine serum (FBS), South American origin   | Pan Biotech                                    | P30-3306                   |
| F12 Ham's Nutrient mixture medium                  | Gibco                                          | 1176-054                   |
| L-γ-Oleoyl-α-lysophosphatidsäure Natriumsalz (LPA) | Sigma-Aldrich (Lieferant: Merck/Sigma-Aldrich) | L7260                      |
| TF-LPA (TopFluor® Lyso PA)                         | Avanti Polar Lipids                            | 810280P-1MG                |
| L-Glutamin                                         | Sigma Aldrich                                  | 59 202C                    |
| Penicillin /Streptomycin                           | Pan Biotech                                    | P06-07100                  |
| Poly-L-Lysine                                      | Sigma-Aldrich                                  | R2625-50MG                 |
| PBS 1x                                             | Gibco™                                         | 10010056                   |
| Trypanoblau                                        | Gibco™                                         | 15250061                   |
| Trypsin-EDTA (0.05%)                               | Gibco™                                         | 25300054                   |
| Trypsin-EDTA (0,25%)                               | Gibco™                                         | 25200056                   |

**Tabelle 6: Puffer/Lösungen**

| Puffer/Lösung                    | Bestandteile                                                                                            |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10x TBE (TRIS-Borat-EDTA-Puffer) | 108 g Tris, 55 g ortho-Borsäure, auffüllen auf 800 ml, + 40 ml EDTA<br>0,5 M pH 8 --> auffüllen auf 1 L |

|                                                |                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10x PBS (Phosphate-Buffered Saline)            | 80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ → auffüllen auf 1 L → pH Adjustierung auf 7,4 |
| EDTA 0,5 M 100 ml (Ethyldiamintetraessigsäure) | 14,61 g EDTA → auffüllen auf 70 ml, pH Adjustierung auf 8,0 mit 10 M NaOH → auffüllen auf 100 ml                                              |

**Krebs-Ringer's Lösung :** Für 1000 ml 10x Krebs-Ringer's Lösung (167) werden 69,54g NaCl, 1,86g KCl, 1,38g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (monobasisch) und 47,66g Hepes in eine Flasche gegeben. Es wird auf fast 1000 ml mit destilliertem Wasser ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) aufgefüllt. Anschließend wird der pH-Wert bei 25°C mit NaOH (und HCl) auf 7,4 adjustiert und in der Folge wird die Lösung mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf genau 1000 ml aufgefüllt. Die Lagerung (der Aliquots a'50 ml) erfolgt bei 4°C.

Für die Herstellung von 500 ml 1x Krebs-Ringer's Lösung (Ringer +/+) wird (direkt vor dem Experiment, max. einen Tag vorher) in einer Flasche 50 ml 10x Krebs-Ringer's Lösung mit 1,25 ml  $\text{Ca}^{2+}$  Stammlösungslösung und 0,65 ml  $\text{Mg}^{2+}$  Stammlösung sowie mit 0,99 g D-Glucose versetzt. Nun wird auf fast 500 ml mit  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt, mit NaOH und HCl ein pH von 7,4 eingestellt (bei 25°C) und anschließend auf genau 500 ml mit  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Stammlösung werden 14,7g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (finale Konzentration: 1M) und für die  $\text{Mg}^{2+}$ -Stammlösung 20,33g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (finale Konzentration: 1M) bis auf ein Gesamtvolumen von 100 ml mit  $\text{dH}_2\text{O}$  versetzt und in 5-15 ml Aliquots bei 4 °C gelagert.

**FAFBSA-Puffer für LPA-Lösungen** (laborinternes Protokoll, zur Verfügung gestellt durch Frau Dr. Nicola Brandt): Für 10 ml FAFBSA-Puffer werden 1 ml 0,5 M Hepes (-> 50 mM), 1,38 ml 1 M NaCl (-> 138 mM), 27  $\mu\text{l}$  1 M KCl (2,7 mM), 10  $\mu\text{l}$  1 M  $\text{CaCl}_2$  (1 mM), 20  $\mu\text{l}$  0,5 M  $\text{MgCl}_2$  (1 mM) und 0,1 mg FAFBSA (1%) verwendet und auf 10 ml mit  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt. Es wird mittels Magnetstäbchen bis zur vollständigen Lösung aller Bestandteile gerührt. Die Lagerung erfolgt in kleinen Aliquots bei -20°C.

**FAFBSA 1% in Wasser:** Für 10 ml FAFBSA 1% in Wasser werden 0,1 mg FAFBSA verwendet und auf 10 ml mit  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt. Anschließend wird mittels Magnetstäbchen gerührt, bis FAFBSA komplett gelöst ist. Die Lagerung erfolgt in kleinen Aliquots bei -20°C.

**Ansetzen/Lösen und Auftauen von LPA:** LPA wurden in FAFBSA 1% in Wasser (und zuvor in anderen Lösungsmitteln (FAFBSA Puffer/Krebs-Ringer's Lösung ohne Salze (s. Kapitel 3.3.2)) in einer Stammkonzentration von 2,6 mM gelöst: Um eine Lösung der LPA zu ermöglichen, muss zunächst für 1 min gevortext werden, dann die Glasflasche für 30 min ins Ultraschall-Wasserbad gestellt werden und erneut für 1 Minute gevortext werden. Anschließend wird das Gefäß für 10 min ins 37 °C Wasserbad gestellt und erneut für 1 Minute gevortext. Anschließend erfolgt die Lagerung in kleinen Aliquots (ca. 100-300  $\mu\text{l}$ , um Auftau-Einfrier-Zyklen zu vermeiden) in braunen Glasfläschchen bei -20°C. Beim Umgang mit LPA wurden ausschließlich Glaspipetten und -gefäße verwendet. Vor der Verwendung der Glaspipetten werden diese zunächst mit Ethanol, anschließend mit Wasser und zuletzt mit dem verwendeten Lösungsmittel (z.B. FAFBSA 1% in Wasser) gespült.

Für das Auftauen von LPA zur direkten Verwendung an demselben Tag werden LPA 2,6 mM Aliquots bei 37 °C im Wasserbad 5 min lang aufgetaut, dann für ca. 1 min gevortext und das Aliquot anschließend für mindestens 10 min ins Ultraschallbad gestellt. Dann wird erneut für 1 Minute gevortext. Anschließend wird die benötigte Menge in Glasflaschen mit dem verwendeten Puffer (z.B. Krebs-Ringer's Lösung mit Salzen) mittels Glaspipetten gegeben und für eine ausreichende Durchmischung erneut gevortext.

## 2.1.5 Zelllinien/Transfektion

Tabelle 7: Informationen zu den verwendeten Zelllinien

| Zelllinien | Organismus | Morphologie             | Ursprungsgewebe             | Hersteller/Bezug                                                                                                                          | Nummer                                                 |
|------------|------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| N1E-115    | Maus       | neuronal                | Neuroblastom                | ATCC                                                                                                                                      | CRL-2263<br>(ATCC),<br>CVCL_0451                       |
| Neuro2a_1  | Maus       | neuronal und<br>amöboid | Neuroblastom                | ATCC (Labor der<br>AG für Biochemie,<br>Gruppenleiter: Prof.<br>Dr. Karl-Wilhelm<br>Koch, Universität<br>Oldenburg)                       | CCL-131<br>(ATCC),<br>CVCL_0470<br>(Cellosaurus<br>ID) |
| Neuro2a_2  | Maus       | neuronal und<br>amöboid | Neuroblastom                | Labor der AG für<br>Neurosensorik,<br>Gruppenleiter: Prof.<br>Dr. Mouritsen,<br>Universität<br>Oldenburg                                  | CCL-131<br>(ATCC)                                      |
| HEK293T    | Mensch     | epithelial              | embryonales<br>Nierengewebe | Universität<br>Groningen, AG<br>Sciences of Cells<br>and Systems,<br>Gruppenleiter:<br>PhD Mark S. Hipp,<br>Biomedical,<br>UMCG Groningen | CVCL_0063<br>(Cellosaurus<br>ID)                       |

**Tabelle 8: verwendete Medien zur Kultivierung der o.g. Zelllinien:** P/S: Penicillin/Streptomycin. Der Zusatz von Ham's F12 erhöht die Proliferation und wurde insbesondere zur Anzucht von Neuro2a\_1 nach dem Auftauen verwendet. Es wurde kein morphologischer Unterschied hinsichtlich der Kultivierung mit oder ohne Ham's F12 beobachtet.

| Zelllinie | Medium                                                                           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|
| N1E-115   | DMEM 1x Gibco™, 10% FCS, 1% P/S                                                  |
| Neuro2a_1 | DMEM 1x Gibco /Ham's F12 1:1, 10% FCS, 1% P/S<br>DMEM 1x Gibco™, 10% FCS, 1% P/S |
| Neuro2a_2 | DMEM 1x Gibco™, 10% FCS, 1% P/S                                                  |
| HEK293T   | DMEM PanPan Biotech, 10% FCS, 1% P/S, 1% L-Glutamin                              |

Tabelle 9: verwendete Transfektionsreagenzien

| Reagenz                                                           | Hersteller   | Artikelnummer |
|-------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| Effectene Transfektionsreagenz                                    | Qiagen       | 301425        |
| METAFACTENE® PRO®                                                 | Biontex      | T040-1.0      |
| Polyethylenimine, Linear, MW 25000, Transfection Grade (PEI 25K™) | Polysciences | 23966-100     |

Tabelle 10: verwendetes Material für Mykoplasmen-PCR

| Reagenz                             | Hersteller                                            | Sequenz/Anmerkungen                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| PCR Mycoplasma Test Kit             | PanreacAppllichem, ITW Reagents,<br>Product-No. A3744 |                                         |
| GoTaq Green MasterMix 2x, Ref M712B | Promega                                               |                                         |
| 5'Primer (GPO, 10mM)                | Eurofins Genomics                                     | 5'-GGG-AGC-AAA-CAG-GAT-TAG-ATA-CCC-T-3' |

|                                                  |                   |                                                                      |
|--------------------------------------------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 3'Primer (MGSO, 10mM)                            | Eurofins Genomics | 5'-TGC-ACC-ATC-TGT-CAC-TCT-GTT-AAC-CTC-3'                            |
| Positive Template Control<br>Mycoplasma Test Kit | Panreac AppliChem | Auch nach Umstellung des PCR-Verfahrens als Positivkontrolle genutzt |

### 2.1.6 Plasmide/Plasmidherstellung

Für die Plasmid-Vervielfältigung wurden *E. coli* verwendet.

**Tabelle 11: verwendete Mikroorganismen**

| Organismus                    | Bezugsquelle                                    |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>E. coli</i> K12 XL-10 Gold | Arbeitsgruppe molekulare Neurobiologie, Rostock |

**Dyt Agar:** Es werden 2,5 g Natriumchlorid, 2,5 g Trypton/Pepton aus Casein, 1,75 g Hefe-Extrakt, 5 g Agar-Agar (bakteriologisch) in eine 500 ml Flasche eingewogen, ein Magnetstab hinzugefügt und bis ca. 200 ml mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Anschließend wird mittels eines Magnetstabs gerührt, bis die Flüssigkeit recht klar ist (100 rpm, 50 °C, ca. 15 min). Anschließend wird die Flüssigkeit auf etwas mehr als 250 ml aufgefüllt und autoklaviert. Für das Gießen der Agarplatten s. 2.2.2.

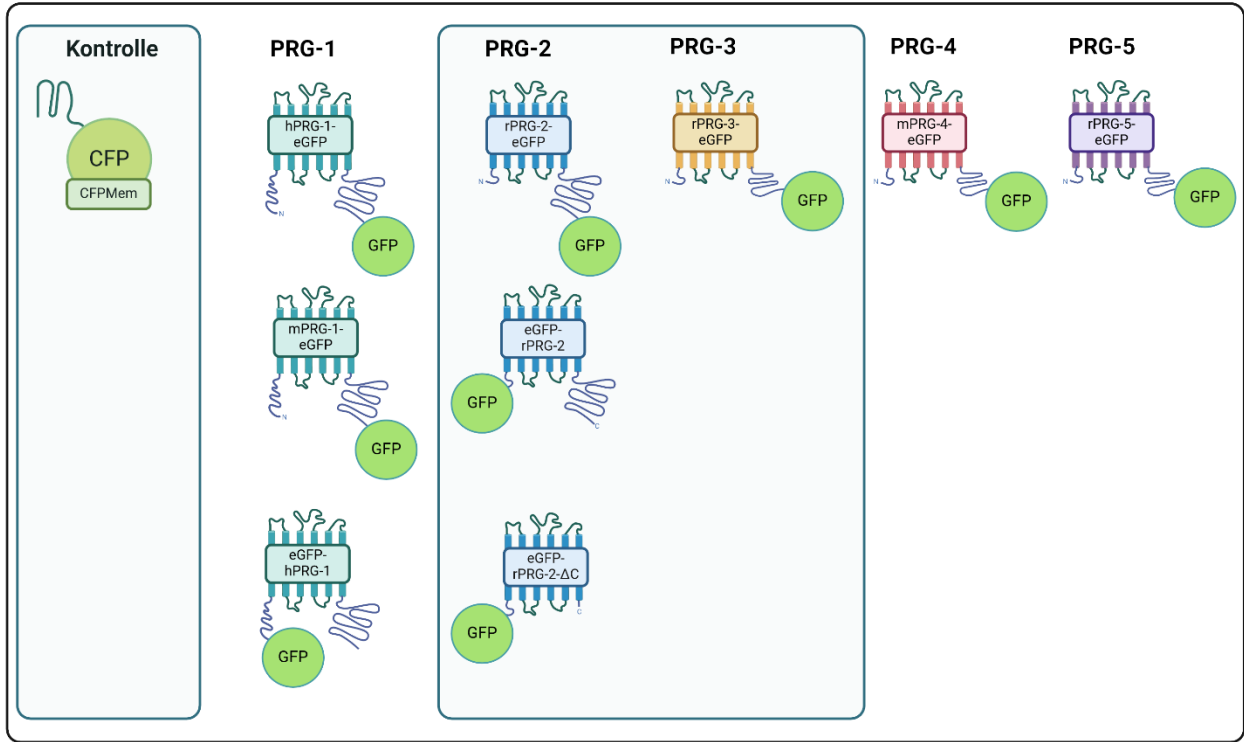
**Dyt Flüssigmedium:** Für 1000 ml Flüssigmedium werden 5 g Natriumchlorid, 16 g Trypton/Pepton aus Casein und 10 g Hefe in eine Glasflasche (autoklaviert) eingewogen und auf 1000 ml mit Reinstwasser aufgefüllt. Die Flüssigkeit wird mittels Magnetstäbchen homogenisiert und anschließend direkt autoklaviert. Danach erfolgt die Lagerung bei 4 °C.

In **Tabelle 12** sind die verwendeten Überexpressions-Plasmide aufgeführt und in **Abbildung 9** die entstehenden Proteine schematisch dargestellt.

**Tabelle 12: verwendete Überexpressions-Plasmide:** \*<sup>1</sup> GFP an den C-Terminus von dem PRG-Protein gebunden (N-Terminus von GFP am C-Terminus von PRG) \*<sup>2</sup> GFP an den N-Terminus von dem PRG-Protein gebunden (C-Terminus von GFP am N-Terminus von PRG), \*<sup>3</sup> trunkierte Version von PRG2 (C-Terminus abgeschnitten, vgl. Sequenz in 3.2.5). GFP: Grün-fluoreszierendes Protein. CFP: Cyan-fluoreszierendes Protein. r: Ratte. m: Maus. h: human. Flag: Flag-Tag.

| Plasmid        | Codiertes Protein       | Lfd. Nr. | Interne Labor-Nr. | Resistenzgen | Ursprung                                          |
|----------------|-------------------------|----------|-------------------|--------------|---------------------------------------------------|
| peCFPMem       | CFPMem                  | 74       | 220               | Kanamycin    | Laborintern, Clontech Laboratories (Cat. #6918-1) |
| pTurboRFP-N    | RFP                     | 61       | 406               | Kanamycin    | AG Koch, evrogen (Cat.# FP232)                    |
| peGFP-N1-hPrg1 | hPRG1-GFP* <sup>1</sup> | 13       | 79                | Kanamycin    | Laborintern                                       |
| peGFP-N1-rPrg2 | rPRG2-GFP* <sup>1</sup> | 39       | 69                | Kanamycin    | Laborintern                                       |
| peGFP-N1-rPrg3 | rPRG3-GFP* <sup>1</sup> | 35       | 65                | Kanamycin    | Laborintern                                       |
| peGFP-N1-mPrg4 | mPRG4-GFP* <sup>1</sup> | 5        | 143               | Kanamycin    | Laborintern                                       |
| peGFP-N1-rPrg5 | rPRG5-GFP* <sup>1</sup> | 37       | 146               | Kanamycin    | Laborintern                                       |
| peGFP-C1-hPrg1 | GFP-hPRG1* <sup>2</sup> | 92       | 82                | Kanamycin    | Laborintern                                       |

|                    |                                    |    |     |            |             |
|--------------------|------------------------------------|----|-----|------------|-------------|
| peGFP-N1-mPrg1     | <b>mPRG1-GFP*<sup>1</sup></b>      | 93 | 199 | Kanamycin  | Laborintern |
| peGFP-C1-rPrg2     | <b>GFP-rPRG2*<sup>2</sup></b>      | 94 | 182 | Kanamycin  | Laborintern |
| peGFP-C1-rPrg2-ΔC  | <b>GFP-rPRG2-ΔC*<sup>2,3</sup></b> | 95 | 140 | Kanamycin  | Laborintern |
| pCMV2-Flag-rPrg2   | <b>rPRG2-Flag*<sup>4</sup></b>     | 96 | 70  | Ampicillin | Laborintern |
| pCMV2-3xFlag-mPrg1 | <b>PRG1-3xFlag*<sup>4</sup></b>    | 99 | 266 | Ampicillin | Laborintern |



**Abbildung 9: Hauptsächlich verwendete Konstrukte (s.o.). Grün umrandet:** Konstrukte für Lebendzellmikroskopie (s. 3.3.3). **GFP:** Grün fluoreszierendes Protein. **CFP:** Cyan fluoreszierendes Protein. **PRG:** Plasticity Related Gene. Abbildung erstellt mit BioRender.com

Im Rahmen der Arbeit wurde die PRG-Sequenz der bisher nur in Papierform dokumentierten Plasmide mithilfe einer Sequenzierung durch Eurofins überprüft und digitale Plasmid-Karten erstellt (s. Anhang und Ergebnisteil für Annealing-Ergebnisse).

**Tabelle 13: Informationen zu dem verwendeten Kit für die Präparation von Plasmid-DNA (Maxiprep)**

| Kit                                                  | Hersteller       | Referenznummern                   |
|------------------------------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| DNA, RNA and protein purification Nucleobond® PC 500 | Machernery-Nagel | 740574,<br>740531 (AX 100 Filter) |

Für die probeweise Restriktion hergestellter Plasmide wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet.

**Tabelle 14: verwendete Restriktionsenzyme und Puffer**

| Name             | Hersteller   | Referenznummer |
|------------------|--------------|----------------|
| BamHI FastDigest | ThermoFisher | FD0054         |

|                                                      |                          |        |
|------------------------------------------------------|--------------------------|--------|
| BglII FastDigest                                     | ThermoFisher             | FD0084 |
| EcoRI FastDigest                                     | ThermoFisher             | FD0274 |
| HindIII FastDigest                                   | ThermoFisher             | FD0504 |
| XhoI FastDigest                                      | ThermoFisher             | FD0694 |
| FastDigest Green Buffer (10X) für Restriktionsverdau | Thermo Fisher Scientific | B72    |

**Tabelle 15: Primer für die Sequenzierung der verwendeten Plasmide:** CFPMem wurde mit denselben Primern wie die (gleichzeitig vervielfältigten) PRG Plasmide sequenziert, um eine Verwechslung/Verunreinigung etc auszuschließen. Die Primer entsprechen den Standardprimern von Eurofins, welche anhand von digitalen Plasmidkarten vor der Verwendung auf Anwendbarkeit geprüft wurden. Bei bGH polyA rev1 handelt es sich um einen Primer, welche für die Sequenzierung eigens bestellt wurde, leider funktionierte der Primer jedoch nicht. Die ermittelten Sequenzen wurden mit den für das entsprechende Gen bekannten cDNA Sequenzen verglichen (NCBI Blast/UniProt Alignment, s. 3.2.4.1 und Anhang), **for:** forward, **rev:** reverse; **x\*<sup>1</sup>** Abweichungen von der Referenz-DNA mit Auswirkungen auf Aminosäuresequenz (s. 3.2.4), **-\*<sup>2</sup>** Sequenzierung hat nicht funktioniert, **-\*<sup>3</sup>** keine Sequenzierung durchgeführt (mit diesem Plasmid wurde nur ein Probeexperiment durchgeführt (s. 2.2.2.3))

| Plasmid            | Codiertes Protein        | Forward Primer  | Geprüft         | Reverse Primer | Geprüft         |
|--------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| peCFPMem           | CFPMem                   | pEGFP_for       | x               | pEGFP_rev      | x               |
| pTurboRFP-N        | RFP                      | CMVfor          | x               | pEGFP_rev      | x               |
| peGFP-N1-hPrg1     | hPRG1-GFP* <sup>1</sup>  | pEGFP-for       | x* <sup>1</sup> | EGFP-Nrev      | x               |
| peGFP-N1-rPrg2     | hPRG2-GFP                | pEGFP_for       | x               | EGFP-Nrev      | x               |
| peGFP-N1-rPrg3     | rPRG3-GFP                | pEGFP_for       | x               | EGFP-Nrev      | x               |
| peGFP-N1 mPrg4     | mPRG4-GFP                | pEGFP_for       | x               | EGFP-Nrev      | x               |
| peGFP-N1-rPrg5     | rPRG5-GFP                | pEGFP_for       | x               | EGFP-Nrev      | x               |
| peGFP-C1-hPrg1     | GFP-hPRG1* <sup>2</sup>  | EGFP-Cfor       | x* <sup>1</sup> | pEGFP-rev      | x               |
| peGFP-N1-mPrg1     | mPRG1-GFP                | pEGFP_for       | x               | EGFP-Nrev      | x               |
| peGFP-C1-rPrg2     | GFP-rPRG2                | EGFP-Cfor       | x               | pEGFP_rev      | x               |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC  | GFP-rPRG2-ΔC             | EGFP-Cfor       | x               | pEGFP_rev      | x               |
| pCMV2-Flag-rPrg2   | rPRG2-Flag* <sup>3</sup> | CMVfor          | x               | bGH polyA rev1 | -* <sup>2</sup> |
| pCMV2-3xFlag-mPrg1 | PRG1-3xFlag              | -* <sup>3</sup> |                 | -              |                 |

**Tabelle 16: Primer zum Sequenzieren:** \*<sup>1</sup> Standard Primer von Eurofins, \*<sup>2</sup> selbst entworfen (hat allerdings nicht funktioniert)

| Forward primer |                                           | Reverse Primer |                                          |
|----------------|-------------------------------------------|----------------|------------------------------------------|
| Name           | Sequenz                                   | Name           | Sequenz                                  |
| pEGFP_for      | TTT AGT GAA CCG TCA GAT C* <sup>1</sup>   | pEGFP_rev      | TTT AAA GCA AGT AAA ACC TC* <sup>1</sup> |
| CMVfor         | CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG* <sup>1</sup> | EGFP-Nrev      | CCG TCC AGC TCG ACC AG* <sup>1</sup>     |
| EGFP-Cfor      | GAT CAC ATG GTC CTG CTG* <sup>1</sup>     | bGH polyA rev1 | CAC CCC ACC CCC CAG* <sup>2</sup>        |

### 2.1.7 Material Immunzytochemie/Antikörper

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der verwendeten Färbereagenzien und der primären/sekundären Antikörper, welche in den immunzytochemischen Färbungen Verwendung fanden.

**Tabelle 17: Färbereagenzien für ICC**

| Färbereagenz                  | Hersteller            | Artikelnummer | Verdünnung |
|-------------------------------|-----------------------|---------------|------------|
| DAPI                          | Sigma-Aldrich-Aldrich | D9542-5MG     | 1:2000     |
| Phalloidin-iFluor 555 Reagent | abcam                 | ab176756      | 1:1000     |



Tabelle 18: verwendete primäre und sekundäre Antikörper für ICC

|                                                                         | Spezies   | Klonalität | Hersteller                          | Art No    | Verdünnung |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|-------------------------------------|-----------|------------|
| <b>GFP primärer Antikörper</b>                                          | Kaninchen | polyklonal | abcam                               | 11039     | 1:1000     |
| <b>PIP<sub>2</sub> primärer Antikörper</b>                              | Maus      | monoklonal | abcam                               | 11039     | 1:500      |
| <b>Flag primärer Antikörper</b>                                         | Kaninchen | polyklonal | Sigma-Aldrich                       | F7426-2MG | 1:1500     |
| <b>Alexa goat- <math>\alpha</math>-rabbit 488 sekundärer Antikörper</b> | Ziege     | polyklonal | Life Technologies                   | A11008    | 1:1500     |
| <b>Alexa goat- <math>\alpha</math>-mouse 647 sekundärer Antikörper</b>  | Ziege     | polyklonal | Invitrogen/Thermo Fisher Scientific | A21235    | 1:1500     |

Tabelle 19: weiteres Material für ICC

| Reagenz                 | Hersteller |
|-------------------------|------------|
| Normal Goat Serum (NGS) | Histoprime |
| Mowiol                  | Carl Roth  |

Für die Mikroskopie mittels 40x Objektiv am konfokalen FV3000 Mikroskop wurde folgendes Öl verwendet.

Tabelle 20: verwendetes Öl für Mikroskopie am konfokalen Mikroskop

| Reagenz   | Hersteller | Artikelnummer |
|-----------|------------|---------------|
| Mineralöl | Merck      | M8410-500 ml  |

Folgende Vaseline wurde für die Fixierung der Deckgläschen während der Lebenszellmikroskopie genutzt.

Tabelle 21: verwendete Vaseline bei Lebendzellmikroskopie

| Reagenz                                | Hersteller/Marke | Artikelnummer  |
|----------------------------------------|------------------|----------------|
| Vaseline Pure Petroleum Jelly Original | Vaseline         | 124674 – 100ml |

### 2.1.8 Material für RNA Isolation/cDNA Synthese/PCR/qRT-PCR

Tabelle 22: Material für cDNA-Synthese, PCR sowie RNA-Qualitätskontrolle mittels Tape-Station

| Reagenz                                                       | Hersteller                                     |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| DNase-1                                                       | New England Biolabs Inc                        |
| DNase-1-Reaktion Puffer                                       | New England Biolabs Inc                        |
| dNTP Mix 100mM                                                | Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)  |
| GoTaq® Green Master Mix                                       | Promega                                        |
| GoTaq Hot Start Polymerase Art. Nr. M5005                     | Promega                                        |
| HD-Green Plus DNA Stain                                       | Intas Science imaging                          |
| High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit Art. Nr. 4368814 | Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific) |
| Hyperladder 1 kB 100 Lanes                                    | meridian Bioscience®                           |
| Multiscribe Reverse Transkriptase                             | Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)  |

|                                                                                      |                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Primer $\beta$ -Aktin und Mykoplasmen-PCR                                            | eurofins             |
| RNA Screen Tape                                                                      | Agilent Technologies |
| RNA Screen Tape Puffer                                                               | Agilent Technologies |
| RNA Qualitätskontrolle: Tubestreifen und Deckel (Optical Tube and Cap, 8er Streifen) | Agilent Technologies |
| 10X RT-Buffer                                                                        | Applied Biosciences  |

Für die qRT-PCR wurden Primer und Sonden als TaqMan Gene Expression Assays von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen (s. **Tabelle 23**).

**Tabelle 23: Primer/Sonden, welche für die qRT-PCR genutzt wurden.** Sequenz zu PRG2 mouse: Forward: CCTCCGGCGCACAGT, Reverse: AGAGCCGTGGCACACA, Probe: ACACGTGTACACCCACAAAG; \*<sup>1</sup> ebenfalls genutzt in (168); \*<sup>2</sup> ebenfalls genutzt in (169); \*<sup>3</sup> ebenfalls genutzt in (33)

| Bezeichnung Primer/Probe                                          | Hersteller                             | Artikel No/Assay ID                                                    |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Lpar1 mouse                                                       | Thermo Fisher Scientific               | Mm00439145_m1 * <sup>1</sup>                                           |
| Lpar2 mouse                                                       | Thermo Fisher Scientific               | Mm00469562_m1 * <sup>1</sup>                                           |
| Lpar3 mouse                                                       | Thermo Fisher Scientific               | Mm01312593_m1 * <sup>1</sup>                                           |
| Lpar4 mouse                                                       | Thermo Fisher Scientific               | Mm01228533_m1 * <sup>1</sup>                                           |
| Lpar5 mouse                                                       | Thermo Fisher Scientific               | Mm01190818_m1 * <sup>1</sup>                                           |
| Lpar6 mouse                                                       | Thermo Fisher Scientific               | Mm00613058_s1 * <sup>2</sup>                                           |
| PRG1 mouse                                                        | Thermo Fisher Scientific               | Mm00724102_m1 * <sup>3</sup>                                           |
| PRG2 mouse                                                        | laborintern entwickelt                 | MPRG2 EX34-EX34 * <sup>3</sup><br>Gen Bank Accession-Nr.:<br>NM_144935 |
| PRG3 mouse                                                        | Thermo Fisher Scientific               | Mm00626670_m1 * <sup>3</sup>                                           |
| PRG4 mouse                                                        | Thermo Fisher Scientific               | Mm00460726_m1 * <sup>3</sup>                                           |
| PRG5 mouse                                                        | Thermo Fisher Scientific               | Mm01310525_m1 * <sup>3</sup>                                           |
| Mouse GAPD (DQ) Mix 20x (Glyceraldehyde-3phosphate dehydrogenase) | Applied Biosystems (Life Technologies) | 4352661                                                                |
| Mouse ACTB (DQ) Mix (20x) (Aktin $\beta$ )                        | Applied Biosystems (Life Technologies) | 4352663                                                                |

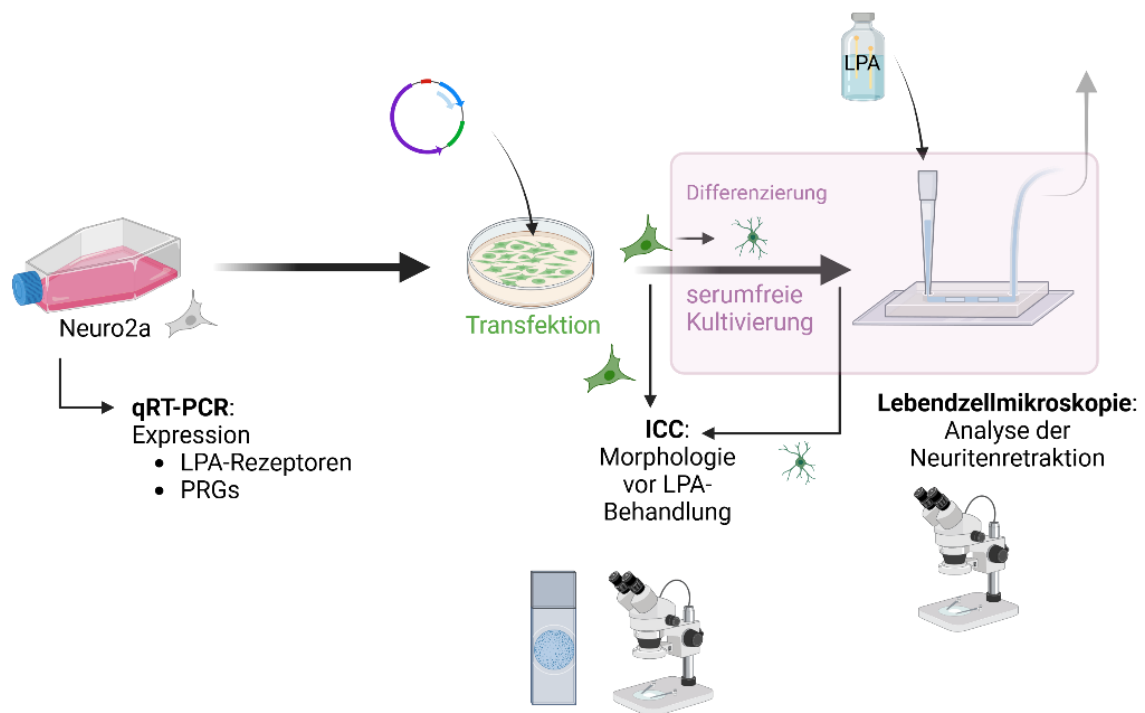
Als Referenz-cDNA-Proben (Neokortex Maus P5, Hoden Maus P20/P30/12 Monate) wurden cDNA-Proben aus einer cDNA-Datenbank genutzt, welche in der Arbeitsgruppe Anatomie an der Charité Berlin unter Leitung von Frau Prof. Dr. Anja Bräuer generiert wurde und nun laborintern genutzt wird (behördliche Anzeige s. Anhang).

**Tabelle 24: Weiteres Material für qRT-PCR**

| Reagenz                                                     | Hersteller         |
|-------------------------------------------------------------|--------------------|
| Taq Man Fast Universal Mastermix Art. Nr. 4352046           | Applied Biosystems |
| 96-Well Platte für qRT-PCR (Hard-Shell® 96-Well PCR Plates) | Bio-Rad            |
| Folie zum Bedecken der Well-Plates                          | Bio-Rad            |

## 2.2. Methoden

Die **Abbildung 10** gibt einen Überblick über die verwendeten Methoden. Für die Experimente wurden Neuro2a-Zellen als Modellzellen für neuronale Zellen genutzt (sowie HEK293T-Zellen als Vergleichsobjekte). Mittels qRT-PCR wurde das Expressionsprofil der PRGs und LPA-Rezeptoren in undifferenzierten Neuro2a untersucht. Mittels Transfektion verschiedener PRG-Plasmide (sowie CFPMem als Kontrollplasmid) wurde eine Überexpression der jeweiligen Proteine induziert. Die Zellen wurden dabei durch GFP (grün fluoreszierendes Protein) fluoreszierend markiert. Mittels immunzytochemischer Färbungen wurde die Lokalisation der Proteine sowie die durch Überexpression induzierte Morphologie untersucht. In differenzierten Neuro2a wurde zudem die Anzahl an Neuriten und Protrusionen induziert durch PRG2/3-Überexpression untersucht. Zur Untersuchung der LPA-induzierten Neuritenretraktion wurden die Zellen zunächst für ca. 16-20h in serumfreiem Medium kultiviert („wodurch eine Differenzierung der Neuro2a-Zellen induziert wurde,“) und anschließend mit LPA behandelt. Die Neuritenretraktion wurde mittels der Lebendzellmikroskopie und Videoaufnahmen verfolgt und anschließend quantifiziert.



**Abbildung 10: Überblick über die verwendeten Methoden.** qRT-PCR: quantitative Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion. ICC: Immunzytochemie.

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultur, Passage und Kryokonservierung von Zelllinien

Ursprünglich sollten in Analogie zu vorhergehenden Arbeiten zu dem Einfluss der PRG-Überexpression auf die LPA-induzierte Neuritenretraktion N1E-115-Zellen verwendet werden (10,22,23). Die von ATCC bezogenen N1E-115-Zellen zeigten jedoch eine eingeschränkte Proliferation und eine abgerundete Zellmorphologie ohne Erholung auch nach mehreren Passagen. Es wurde Kontakt zu der liefernden Firma (ATCC) aufgenommen. Diese empfahl ein spezielles Medium zur Aufzucht von N1E-115-Zellen, welches jedoch nicht käuflich zu erwerben sei und dessen Zusammensetzung unklar blieb. Da auch Neuro2a-Zellen, ebenfalls eine Neuroblastom-Zelllinie, in vorherigen Arbeiten zu der Untersuchung LPA-induzierter Neuritenretraktion verwendet wurden (24) und wir diese im Kontakt

mit einer anderen Arbeitsgruppe an der Universität Oldenburg (AG für Biochemie, Gruppenleiter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch) erhalten konnten, wurde die Verwendung dieser Zelllinie beschlossen.

Um neuronale Zellen zu untersuchen, existieren mittlerweile verschiedene zellbiologische Methoden. In dieser Arbeit werden Neuroblastomzellen der Linie Neuro2a als Modellorganismen für neuronale Zellen verwendet. Deutlich näher an der Realität sind Zellkulturen mit primären Neuronen (170). Eine Verwendung dieser Zellen bedeutet jedoch tierschutzrechtliche Konsequenzen, eine limitierte Zellzahl, eine anspruchsvolle Kultivierung sowie hohe Anforderungen an die Transfektion und ist deshalb speziellen Fragestellungen vorbehalten (170). Als Zellen, welche murinen Neuroblastomen – embryonalen Tumoren mit einem mutmaßlichen Ursprung in Zellen der Neuralleiste (171) – entstammen, zeigen Neuro2a-Zellen eine Morphologie mit Ausläufern, welche im Kontakt zu LPA eine Retraktion zeigen (24,69). Dennoch ist an diesem Punkt explizit darauf hingewiesen, dass Neuroblastomzellen von Neuronen in Morphologie, Genexpression und Verhalten verschieden sind.

Als Vergleichsorganismen wurden HEK293T-Zellen verwendet. Für HEK293-Zellen, eine menschliche Zelllinie aus embryonalem Nierengewebe, wurden mehrfach morphologische Veränderungen bedingt durch PRG-Überexpression beschrieben (s. 3.2.2). Sie zeigen jedoch als nichtneuronale Zellen ausschließlich kurze Filopodien und eignen sich somit nicht für morphologische Analysen von Neuritenretraktion.

Neuro2a und HEK293T-Zellen wurden in T25/T75 Flaschen (25/75 cm<sup>2</sup>) in den entsprechenden Medien (s. 2.1.5, **Tabelle 8**) in 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Mikroskopisch erfolgte die Bestimmung der sichtbaren Konfluenz. Bei 80-100 % Konfluenz wurden die Neuro2a-Zellen auf 1:25 bis 1:10 passagiert. Hierzu wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit 2,5/5 ml (T25/T75) DPBS (auf 37 °C vorgewärmt) gewaschen. Anschließend werden 1,5/3 ml 0,05%/0,25% (für HEK/Neuro2a) Trypsin EDTA (auf 37 °C vorgewärmt) hinzugegeben und die Flaschen werden erneut im Inkubator platziert, bis sich die Zellen von ihrem Untergrund lösen (ca. 3 min für HEK293T und 5 min für Neuro2a). Die reduzierte Adhärenz wird mikroskopisch überprüft. Anschließend werden die Zellen mit weiteren 3,5/7 ml Medium (auf 37 °C vorgewärmt) versetzt und mit sanften, meanderförmigen Spülbewegungen endgültig vom Untergrund gelöst, mit dem Medium vermischt und in ein steriles Gefäß (50 ml Falcon) gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (1500 rcf, 5 min, 22 °C). Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet vorsichtig mit 5 ml Medium resuspendiert und in der gewünschten Menge in neue, mit 5/15 ml Medium gefüllte T25/T75 Flaschen gegeben. Diese Flaschen werden zuvor mind. 15 min im Inkubator gelagert, sodass sich pH und Temperatur des Mediums anpassen können.

Zur Kryokonservierung entsprechen die ersten Schritte denen der Passage/Zellzählung (s.u.). Nach der Zellzählung wird die Zellsuspension erneut zentrifugiert und anschließend mit dem Kühlmedium versetzt (5 % DMSO, 95 % DMEM). Anschließend wird die Zellsuspension in Kryoröhrchen (1,7 ml bzw. 2 Mio. Zellen/Vial) gegeben, diese über Nacht bei -80 °C gekühlt und am folgenden Tag in Flüssigstickstoff für die längerfristige Lagerung überführt. Die Kryokonservierung wurde freundlicherweise durch die technische Assistentin Frau Jennifer Sevecke-Rave übernommen.

Das Auftauen von in Flüssigstickstoff gefrorenen Zellen erfolgte nach folgendem Prozedere: Zum Auftauen von Zellen werden zunächst zwei T25-Flaschen mit Medium befüllt und mind. 30 min in den Inkubator gestellt. Zudem wird ein Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Medium befüllt und für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen werden dem Stickstofftank entnommen und innerhalb von ein bis zu maximal zwei Minuten im Wasserbad bei 37°C geschwenkt, bis das Vial größtenteils getaut, jedoch weiterhin kalt ist. Anschließend werden die Zellen zu den

15 ml Medium (Raumtemperatur) gegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit serologischer Pipette gemischt sowie anschließend bei 300 rcf für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet mit den 10 ml aus den beiden T25-Flaschen resuspendiert und auf beide Flaschen verteilt. Einen Tag nach dem Auftauen wird ein Mediumwechsel durchgeführt und es erfolgt eine Passage bei 80-100 % Konfluenz innerhalb der nächsten Tage. Die Zellen wurden frühestens eine Woche nach dem Auftauen für Experimente verwendet.

Die Aussaat von Zellen erfolgte je nach Zweck in 12-/24-Well-Platten (für Immunzytochemie) oder in Petrischalen (für RNA-Isolation und Lebendzellmikroskopie), evtl. auf Deckplättchen (für Immunzytochemie und Lebendzellmikroskopie). Bei Verwendung von gläsernen Deckplättchen für Lebendzellmikroskopie oder Immunzytochemie wurden diese zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Dazu werden die gelieferten Deckplättchen zunächst gewaschen (erst 30 min auf Schüttler bei 100 rpm mit ultrareinem, destilliertem Wasser, dann 30 min mit 70 % Ethanol (100 rpm), anschließend mind. 10 min mit 99 % Ethanol) und anschließend in 99 % Ethanol gelagert. Einen Tag (oder mind. 4h) vor der Aussaat werden die Deckplättchen aus ihrem Behälter entnommen, in der Flamme eines Bunsenbrenners abgeflammt und in der Luft geschwenkt, bis jegliches Ethanol verdunstet ist. Anschließend werden die Deckplättchen in den Petrischalen/Vertiefungen der Platten platziert und PLL 0,1% in Wasser wird auf die Deckplättchen gegeben. Nach Inkubation für mind. 4 h wird das PLL abgenommen und erneut in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt (Wiederverwendung max. fünfmal). Die Deckplättchen werden dreimal mit DPBS gewaschen, bevor die Schalen zur Aussaat von Zellen genutzt werden. Das Prozedere zur Aussaat von Zellen entspricht im Beginn jenem, welches für die Passage von Zelllinien beschrieben wurde. Nach Resuspendieren in 5 ml Medium wird eine Zellzählung mithilfe der Neubauer Zählkammer durchgeführt und Trypanoblau zum Ausschluss von avitalen Zellen verwendet ( $20\ \mu\text{l Zellsuspension} + 80\ \mu\text{l Trypanoblau} \rightarrow \text{Zählen der Zellen in vier Quadranten} \rightarrow \text{Durchschnitt der Quadranten} * 5 * 10 = \text{Zellzahl}/\mu\text{l}$ ). Anschließend wird die gewünschte Anzahl an Zellen ausgesät. I.d.R. wurden bei Aussaat 24 h vor Transfektion 40.000 Zellen/Well in einer 24-Well Platte, 80.000 Zellen/Well in einer 12-Well-Platte (beide für Immunzytochemie) und 160.000 Zellen/Well in 3,5 cm Petrischalen (für Lebendzellmikroskopie) ausgesät.

Es erfolgten in regelmäßigen Abständen Testungen der verwendeten Zellen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen mittels PCR. Bei Kontamination müssen alle Zellen im verwendeten Inkubator verworfen werden, eine gründliche Reinigung und Desinfektion des Inkubators und der sterilen Arbeitsbank erfolgen und kryokonservierte Zellen aufgetaut werden. Für die Testung wird jeweils 1 ml des Mediums aus den für die Kultur genutzten T25/75-Flaschen (zuvor mehrtägige Kultivierung) entnommen und bei 250 rcf für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wird nun in ein neues, steriles Gefäß überführt und bei 20.000 rcf für 10 min zentrifugiert. Nun wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 50  $\mu\text{l}$  ultrareinem Wasser resuspendiert. Es erfolgt eine Erhitzung bei 95 °C für 3 min. Die Proben können anschließend bei -20 °C gefroren werden.

Anschließend wurde die PCR entsprechend dem Protokoll mithilfe des PCR Mycoplasma Test Kits (PanReacAppliChem, ITW Reagents, Product-No. A3744, s. **Tabelle 25**) durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.2). Da dieses Testkit jedoch nach Verbrauch nicht mehr erhältlich war, wurde schließlich ein anderes PCR-Verfahren verwendet. Die hierfür verwendeten Primer und ihre Sequenzen werden in **Tabelle 10** angegeben. Für die PCR wird ein Mastermix mithilfe des Promega Mastermix Green angefertigt (s. **Tabelle 26**). Anschließend werden für einen PCR-Mix 23  $\mu\text{l}$  MasterMix mit 2  $\mu\text{l}$  der zu testenden Probe versetzt und die PCR nach dem unten stehenden Protokoll (s. **Tabelle 27**) durchgeführt. Zuletzt erfolgt eine Gelelektrophorese (s. Beispielbild in **Abbildung 41**, Anhang).

**Tabelle 25: PCR-Bedingungen für Mykoplasmen-PCR** (Quelle: Protokoll des PCR-Mykoplasmen-Test-Kit, zuerst (bis 08.2022) verwendetes Kit)

| Schritte               | Temperatur | Zeit  | Zyklus |
|------------------------|------------|-------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94°C       | 30 s  | 1      |
| Denaturierung          | 94°C       | 30 s  | 36     |
| Annealing              | 60°C       | 120 s | 36     |
| Elongation             | 72°C       | 630 s | 36     |
| Finale Elongation      | 72°C       | 5 min | 1      |
|                        | 4-8°C      |       | Ende   |

**Tabelle 26: Mastermix Komposition für die Mykoplasmen-PCR** (ab 09.2022 verwendet)

| MASTERMIX               | Volumen (µl)/Probe |
|-------------------------|--------------------|
| Promega Mastermix Green | 10                 |
| 5'Primer (GPO, 10 mM)   | 1,25               |
| 3'Primer (MGSO, 10 mM)  | 1,25               |
| PCR Wasser              | 10,5               |
| MasterMix total         | 23                 |

**Tabelle 27: PCR Bedingungen für die Mykoplasmen-PCR** (genutzt ab 09.2022)

| Schritte               | Temperatur | Zeit  | Zyklus |
|------------------------|------------|-------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94°C       | 5 min | 1      |
| Denaturierung          | 94°C       | 30 s  | 35     |
| Annealing              | 60°C       | 30 s  | 35     |
| Elongation             | 72°C       | 30 s  | 35     |
| Finale Elongation      | 72°C       | 7 min | 1      |
|                        | 4°C        |       | Ende   |

Neuro2a-Zellen weisen (wie beschrieben) nur im weiteren Sinne Ähnlichkeit mit neuronalen Zellen auf. Um eine Zelllinie mit mehr neuronalen Merkmalen zu erhalten, ist es möglich, Neuro2a-Zellen mittels Zugabe spezieller Reagenzien zu differenzieren. Hierzu habe ich Retinsäure als Differenzierungsreagenz in Neuro2a\_1 getestet. In der Literatur werden verschiedene Protokolle für die Differenzierung mit Retinsäure angegeben (69,172,173), wobei 24-48 h Behandlung mit 10-20 µM Retinsäure unter Kultivierung in vollständig (0 % FBS) bis partiell (2 % FBS) serumfreien Medium genannt werden. Probeweise behandelte ich Neuro2a\_1-Zellen 24 h mit 10 µM Retinsäure in Medium ohne FBS, wobei auch andere Konditionen getestet wurden. Bereits durch die Kultivierung in serumfreiem Medium ohne Hinzugabe von Retinsäure zeigte ein Teil der Neuro2a\_1 und ein Großteil der Neuro2a\_2-Zellen eine differenzierte Morphologie. Infolge der Behandlung mit Retinsäure zeigte sich keine deutliche Differenzierung der Neuro2a\_1, jedoch eine Toxizität mit Verringerung der Proliferation (s. **Abbildung 42**: deutlich geringere Zellzahl infolge der Behandlung mit Retinsäure), sodass ich diesen Ansatz nicht weiterverfolgte.

### 2.2.1.2 Transfektion

Es wurden verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet. Für HEK293T-Zellen wurde Polyethylenimin (PEI) als Transfektionsreagenz genutzt. Dabei handelt es sich um ein kationisches Polymer mit einer hohen Dichte positiver Ladungen, welches Komplexe mit negativ geladenen Nukleinsäuren bildet (sog. Polyplexe) (174–176). Die PEI-DNA Komplexe werden von der Zelle mittels Endozytose aufgenommen, es kommt zur Freisetzung der DNA innerhalb der Zelle (174,177). Freies PEI bindet dabei an negativ geladene Glykosaminoglykane auf der Zelloberfläche und verhindert, dass diese sich hemmend auf die Transfektion auswirken (174). Es handelt sich um ein relativ preiswertes, effektives und gering toxisches Verfahren (174,176).

Für HEK293T wurde die Transfektion laborintern optimiert und schließlich nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die Transfektion erfolgt ca. 24 h nach Aussaat der Zellen. DNA (z.B. 0,5 µl/Well in 12-Well-Platte) und serumfreies Medium (z.B. 50 µl/Well in 12-Well-Platte) sowie PEI (z.B. 2 µl/Well in 12-Well-Platte, DNA:PEI Verhältnis 1:4) und serumfreies Medium (z.B. 50 µl in 12-Well-Platte) werden zunächst separat in zwei Reaktionsgefäßen gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wird die PEI-Medium-Mischung zu der DNA-Medium-Mischung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wird nun die Lösung Tropfen für Tropfen zu den Zellen hinzugegeben, wobei die Menge der Transfektionslösung 10 % des gesamten Mediumvolumens des jeweiligen Zellkulturgefäßes nicht übersteigen darf (z.B. maximal 100 µl in 1 ml/Well in 12-Well-Platte). 15 bis maximal 18 h (am besten 16 h) nach Transfektion erfolgte die Verwendung der Zellen für die jeweiligen Experimente (i.d.R. Fixierung für immunzytochemische Färbungen).

Für Neuro2a wurde zunächst ebenfalls PEI getestet, hiermit zeigte jedoch sich eine sehr niedrige Transfektionseffizienz (s. **Abbildung 43**, Anhang). Deshalb wurde zunächst übergangsweise Effectene genutzt, welches laborintern für primäre Neurone genutzt wird, und anschließend mit Metafectene® Pro (für alle im Ergebnisteil beschriebenen Experimente mit Neuro2a verwendet) weitergearbeitet. Für die Transfektion mit Effectene wird DNA zum EC-Puffer hinzugefügt und für eine Sekunde durch Vortexen gemischt (s. **Tabelle 28**). Anschließend wird der Verstärker (Enhancer) zu der Mischung hinzugefügt, erneut für eine Sekunde durch Vortexen gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wird frisches Medium zur Mischung hinzugegeben. Anschließend kann die Transfektionslösung zu den Zellen gegeben werden.

**Tabelle 28: Beispielmengen für Effectene Transfektion in 12-Well Platte** (die verwendete DANN-Menge wurde für jedes Plasmid einzeln optimiert)

|                                | Volumen (µl) (für 1 Well in 12-Well Platte) |
|--------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>DNA</b>                     | 0,5                                         |
| <b>EC-Puffer</b>               | 119,6                                       |
| <b>Enhancer (Verstärker)</b>   | 6,4                                         |
| <b>Effectene</b>               | 6,4                                         |
| <b>frisches Neuro2a-Medium</b> | 700                                         |

Bei Metafectene® Pro handelt es sich um ein liposomales Transfektionsreagenz, welches ein Gemisch aus polykationischen (positiv geladen) und neutralen Lipiden beinhaltet (178). Die positiv geladenen Lipide bilden Komplexe mit der negativ geladenen DNA, welche anschließend von der Zelle vermutlich mittels Verschmelzen mit der Membran oder Endozytose aufgenommen werden (179–181). In den folgenden Schritten wird die DNA (nach Zerstörung der Membran des Endosoms durch Interaktion der extern zugeführten kationischen Lipide mit internen anionischen Lipiden (182)) entweder in das Zytoplasma freigesetzt oder im Lysosom abgebaut (179). Metafectene® Pro eignet sich sowohl zur transienten als auch zur stabilen Transfektion, zeigt eine niedrige Zytotoxizität und fehlende Serum-inhibition laut Herstellerinformationen (183). Die genaue Lipidzusammensetzung ist nicht veröffentlicht.

Ebenfalls ca. 24 h nach Aussaat der Zellen wird für die Transfektion mit Metafectene® Pro die DNA (bei -20 °C gelagert) sowie die Metafectene® Pro-Lösung (bei 4 °C gelagert) bei Raumtemperatur aufgetaut. Nachdem die Lösungen vollständig aufgetaut sind, werden beide Lösungen kurz gevortext. Als Reaktionsbasis wurde DPBS oder serum- und antibiotikafreies DMEM verwendet. Die Transfektionseffizienz schien unter Verwendung von DMEM etwas höher zu sein. Nach Vorlegen von DPBS/DMEM wird zu einem Pipettiergefäß die DNA und zum anderen Metafectene® hinzugefügt. Es wird hierbei mittels einmaligem Hoch- und Herunterpipettieren gemischt. Anschließend wird das DNA-DPBS/DMEM-Gemisch dem Metafectene-DPBS/DMEM-Gemisch hinzugegeben. Es

folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15-20 min. Zuletzt wird die Transfektionslösung Tropfen für Tropfen vorsichtig zu den Zellen hinzugegeben. Die optimalen Volumina/Verhältnisse wurden experimentell ermittelt. Die Ergebnisse für Neuro2a\_1 sind für einige Plasmide in **Tabelle 29** für 12-Well-Platten abgegeben. Für Neuro2a\_2 mussten dagegen die wesentlich höheren Standardvolumina genutzt werden, da bei niedrigeren Volumina die Transfektionseffizienz litt.

**Tabelle 29: Optimierungsergebnisse der Transfektion von Neuro2a\_1 mit Metafectene® Pro unter Kultivierung der Zellen in Medium ohne FBS** (Mediumwechsel vor Hinzupipettieren der Transfektionslösung oder 3h nach Transfektion). Für Neuro2a\_2 wurden hingegen die (höheren) Standardvolumina (**Standard**, s. **Manual (183)**) verwendet, da diese die optimalen Transfektionsergebnisse erbrachten. Es werden beispielhaft die Mengenangaben bei Verwendung einer 12-Well-Platte angegeben.

| Plasmid         | DPBS/DMEM<br>(µl/Well) | DNA<br>(µg/Well) | Metafectene®<br>Pro (µl/Well) | Gesamtmenge<br>(µl/Well) |
|-----------------|------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------|
| hPRG1-eGFP      | 50                     | 1                | 2                             | 103                      |
| rPRG2-eGFP      | 50                     | 0,4              | 1,6                           | 102                      |
| rPRG3-eGFP      | 50                     | 0,4              | 0,8                           | 101,2                    |
| mPRG4-eGFP      | 50                     | 1                | 3                             | 104                      |
| rPRG5-eGFP      | 50                     | 1                | 2                             | 103                      |
| CFPMem          | 50                     | 0,4              | 0,8                           | 101,2                    |
| <b>Standard</b> | 50                     | 1                | 3                             | 104                      |

Bei Incucyte-Analysen zeigte sich, dass hauptsächlich Zellen transfiziert wurden, welche sich kurz nach dem Zeitpunkt der Hinzugabe des Transfektionsreagenzes teilten (s. **Abbildung 44**, Anhang). Dies passt dazu, dass bekannt ist, dass die nukleäre Hülle in sich nicht teilenden Zellen als natürliche Grenze dient, sodass bei Verwendung nichtviraler Transfektionsmethoden die Plasmid-DNA nicht in den Zellkern gelangen kann (179). Es wurde beobachtet, dass die (auch mit dem Kontrollplasmid (CFPMem)) transfizierten Neuro2a\_1-Zellen eine im Vergleich zu den untransfizierten Zellen veränderte Morphologie aufwiesen. Die meisten transfizierten Zellen zeigten sich mit eher rundlichem Zellkörper und dünnen, teilweise verzweigten Neuriten und zeigten somit eine tendenziell differenzierte Morphologie. Es blieb unklar, woran dies liegt. Möglicherweise hängt dies zusammen mit einer veränderten Komposition der Plasmamembran durch das liposomale Transfektionsreagenz, an der serumfreien Kultivierung oder daran, dass die Zellen nach Zellteilung und Transfektion „gestresst“ sind. Für Neuro2a\_2-Zellen wurde kein wesentlicher Unterschied der Morphologie untransfizierter Zellen im Vergleich zu CFPMem-transfizierten Zellen beobachtet.

### 2.2.1.2 Lebendzellmikroskopie

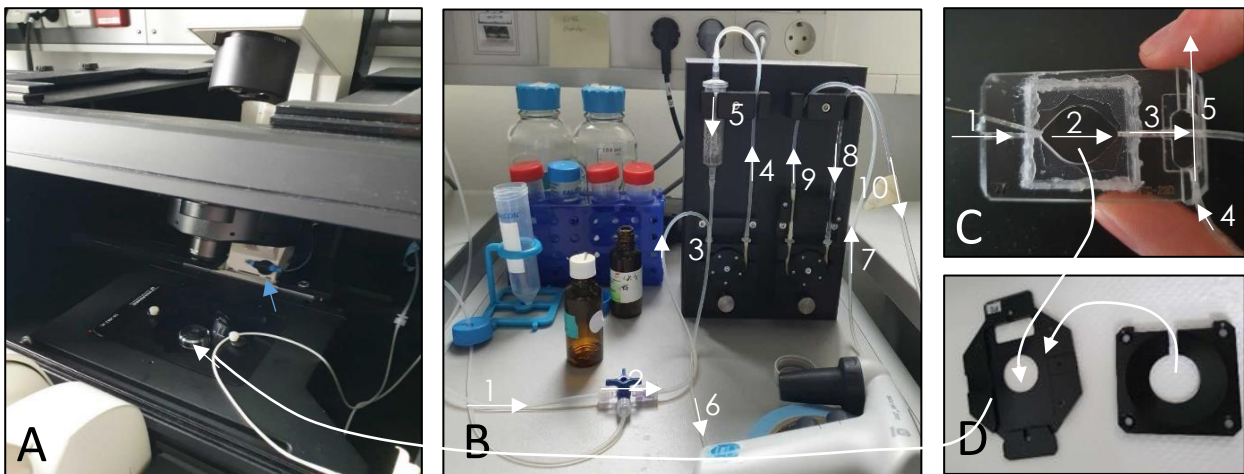
Für die Lebendzellmikroskopie wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wurde das Incucyte-System genutzt. Hierbei werden 24- oder 12-Well-Platten ohne Deckplättchen genutzt. Anschließend können mikroskopische Fotos über einen definierten Zeitraum zu festgelegten Zeitpunkten erstellt werden. Es stehen ein 4x-, 10x- und 20x-Objektiv zur Verfügung, wobei in den durchgeführten Experimenten ausschließlich das 20x Objektiv genutzt wurde. Es können je Zeitpunkt mehrere Bilder in allen Wells erstellt werden (verwendet wurden 4-9 Bilder/Well). Es wurden Analysen der Neuritenlänge im Kanal für Phase-Aufnahmen und grüne Fluoreszenz entsprechend des Manuals (184) durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass die Analyse der Neuriten mittels der automatisierten (adjustierten) Analyse des Incucyte-Programmes bei Neuro2a-Zellen über die Zeit keine validen Ergebnisse ermöglichte, da je nach Auflösung der einzelnen Aufnahmen mehrfach Teile des Hintergrundes oder der Zellmembran der Somata fälschlich als Neuriten erkannt und Neuriten



nicht sicher als Neuriten identifiziert wurden (s. **Abbildung 45**, Anhang). Da die Lokalisation der Aufnahmen über die Zeit variierte, waren Veränderungen wie eine Retraktion der Neuriten nur schwer beurteilbar. Die Auflösung im 20x Objektiv erwies sich zudem als nicht ausreichend, um geringfügige Veränderungen der Neuritenlängen zu beurteilen. Eine manuelle Nachjustierung war nicht möglich.

Für detaillierte Analysen der Morphologie unter der Stimulation mit LPA wurde ein anderes System verwendet, welches sich hierfür besser eignet. Hierbei handelt es sich um ein inverses Mikroskop von der Firma Leica, welches mit einem Pump/Schlauch-System (s. **Abbildung 11**, A/B) verbunden ist, sodass die lebenden Zellen während der Mikroskopie kontinuierlich mit einem stimulierenden Agens in flüssiger Form behandelt werden können. Hierzu werden die verwendeten Spüllösungen in einem Wasserbad auf ca. 38°C (erwartete Abkühlung während des Transportes durch die Schläuche) erwärmt, von hier mittels Schläuchen über ein Pumpsystem in einer Geschwindigkeit von 1 ml/min bis in die Kammer gespült, welche die Zellen beinhaltet. Von hier wird die Flüssigkeit wieder hinausgesaugt (mit einer Geschwindigkeit von 1,2 ml/min, sodass ein Sog entsteht) und in einen S1-Abfallbehälter gespült. Die Kammer besteht aus einem Plastikstück (s. **Abbildung 11** und **Abbildung 12**, C), auf welches ein sauberes gläsernes Deckgläschen auf der oberen und ein mit Zellen beladenes Deckplättchen auf der unteren Seite mittels Vaseline als Haftungsgrundlage befestigt werden. Dadurch entsteht eine Kammer, durch welche die Flüssigkeit gespült werden kann. Die Kammer wird in einen Metalladapter (s. **Abbildung 11**, D) eingespannt, an welchen die Schläuche angeschlossen werden können. Anschließend wird dieser Adapter über dem Objektiv innerhalb der Inkubationskammer des Mikroskops eingespannt (s. **Abbildung 11**, A). Die Inkubationskammer wird auf eine Temperatur von 37 °C erhitzt und die Temperatur kontinuierlich überwacht.



**Abbildung 11: Aufbau Lebendzellmikroskopie:** **A:** Das Innere der Inkubationskammer (blauer Pfeil: Temperatursonde im Inneren, weißer Pfeil aus D: hier wird die Zellkammer eingesetzt), **B:** Pumpsystem und Spüllösungen (mit Pfeilen markiert: 1-6 Zufluss zur Kammer, 7-10 Abfluss von der Kammer weg in den S1-Abfallbehälter), **C:** Plastikstück mit Vaseline, auf welches die Deckplättchen (oben: sauberes Deckplättchen, unten: Deckplättchen mit Zellen) aufgebracht werden (Pfeile 1-5 markieren die Flussrichtung), **D:** Metalladapter für Plastikstück, in welches die Zellkammer aus C eingesetzt wird und anschließend aufgeschraubt wird

Vor Benutzung des Systems wurde dieses zunächst mit Ethanol absolut, anschließend mit Wasser und zuletzt mit der Pufferlösung (Krebs-Ringer's Lösung mit Salzen) gespült, um sicherzugehen, dass jegliche lipophilen und hydrophilen kontaminierenden Stoffe aus dem System entfernt wurden. Nach Einsatz von LPA (zwischen den Messungen) wurde diese Spülung wiederholt. Während der Handhabung von LPA-Lösungen wurden wie beschrieben ausschließlich Glaspipetten und -gefäße verwendet. Während der letztendlichen Behandlung wurde nun jedoch die Flüssigkeit unvermeidbarer Weise durch Plastikschräuche (Polyethylen) geleitet.

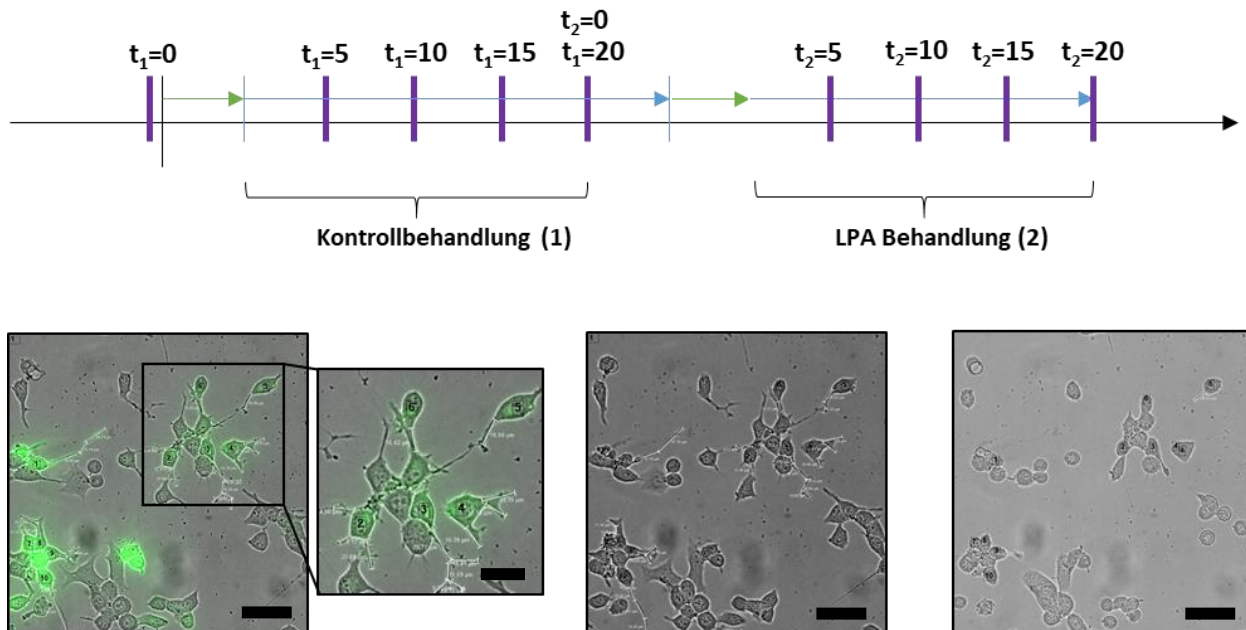
Für die Lebendzellmikroskopie mit dem Leica-Mikroskop wurden die Zellen in kleinen Petrischalen (3,5 cm) auf mit PLL 0,1 % beschichteten, eckigen Deckplättchen ausgesät. Es wurden für eine Messung von untransfizierten Zellen 300.000 Neuro2a-Zellen/Petrischale (1 Tag bis zur Messung) und für die Messung von transfizierten Zellen (2 Tage bis zur Messung) 160.000 Neuro2a-Zellen/Petrischale ausgesät. Diese wurden ca. 24 h nach Aussaat transfiziert. 3-5 h nach Transfektion erfolgte der Mediumwechsel auf reines DMEM ohne FBS mit Antibiotika (Penicillin/Streptomycin). Eine serumfreie Kultivierung wurde deshalb als notwendig erachtet, weil im normalerweise dem Medium hinzugesetzten fetalen Rinderserum (FBS) unbekannte und variable Mengen von LPA vorliegen (185,186) (18). Außerdem musste aufgrund der Anwendung eines liposomalen Transfektionsreagenzes auch dieses von den Zellen entfernt werden, um eine Interaktion der enthaltenen Lipide mit den Zellen/dem hinzugefügten LPA zu verhindern. Zudem stellte sich eine serumfreie Kultivierung als geeignet und hinreichend für eine neuronale Differenzierung von Neuro2a\_2-Zellen heraus (s. auch 3.1.1). Um sicher zu gehen, dass nur das hinzugefügte LPA Auswirkungen auf die Zellen hat, muss mind. 2 h (10,23,24) (für die u.g. Experimente 16-20 h) vor den Messungen eine Kultivierung in serumfreiem Medium erfolgen. Im Rahmen des Mediumwechsels wurden die Zellen zunächst mit DPBS gewaschen, bevor auf das neue Medium gewechselt wurde.

Das Experiment lief folgendermaßen ab: Direkt vor der Messung wird die jeweilige Petrischale aus dem 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>-Inkubator entnommen. Das Deckplättchen wird mit einer Pinzette und einer gebogenen Nadel aus der Schale gehoben, auf das mit Vaseline vorbereitete Plastikstück aufgebracht und vorsichtig angedrückt. Auf der anderen Seite sollte zuvor das saubere Deckplättchen mit Vaseline angebracht worden sein. Nun wird die Zellkammer vorsichtig in den Metalladapter eingebaut (verschraubt) und diese anschließend mit den Schläuchen verbunden. Es dauert ca. 2 bis 5 min von der Entnahme des Deckplättchens bis zum Anschließen der Schläuche an die Kammer. Diese wird nun auf Dichtigkeit geprüft. Zunächst werden alle Zellen mit Krebs-Ringer's Lösung umspült. Zeigt sich die Kammer dicht, wird sie in das Mikroskop eingebaut und anschließend ein geeigneter Ort für die Aufnahmen gesucht.

Gewählt wurde eine Region, in welcher mehrere grün fluoreszierende Zellen mit messbaren Neuriten zu finden waren. Ausgeschlossen wurden nur Zellen, welche zu Beginn bereits rund waren oder deren Neuriten aufgrund von Überlagerung mit anderen Zellen nicht messbar waren. Die zu messenden Zellen wurden in der verwendeten Mikroskopie-Software markiert und eine erste Ausgangsmessung der Neuritenlängen durchgeführt ( $t_1=0$  (s. **Abbildung 12**)). Gemessen wurden alle Neuriten, welche frei lagen und in ihrer gesamten Länge messbar waren, wobei der Neurit nicht durch andere Zellen und Neuriten überlagert sein durfte. Es wurden die Stammneuriten (erster Ordnung) sowie davon ausgehende Astneuriten (zweiter Ordnung) gemessen, jedoch keine Astneuriten dritter Ordnung. Es wurde die Gesamtneuritenlänge pro Zelle sowie die ursprüngliche Anzahl der (gemessenen) Neuriten/Zelle ( $t_1=0$  (s. **Abbildung 12**)) für mehrere Zeitpunkte gemessen und dokumentiert.

Zu Beginn der Messung erfolgte zunächst als Kontrollbehandlung die Spülung der Zellen mit dem Lösungsmittel, welches in der anschließenden Messung für LPA verwendet wurde (z.B. x µl FAFBSA 1% in Wasser in y ml Krebs-Ringer's Lösung mit Salzen, wenn anschließend eine LPA-Lösung mit x µl LPA-Stammlösung (z.B. FAFBSA 1% in Wasser) in y ml Krebs-Ringer's Lösung mit Salzen verwendet werden sollte). Mit einem gefärbtem (roten) Medium (DMEM) wurde getestet, wie lange es dauert, bis die Umstellung des Dreiwegehahns zu einer Verfärbung des Mediums in der Zellkammer führt. Es handelte sich um ca. 5 min. Die zweite Messung der Neuritenlängen erfolgte somit 10 Minuten nach Umstellung des Dreiwegehahns und damit 5 Minuten ( $t_{1/2}=5$  (s. **Abbildung 12**)) nach Beginn der jeweiligen Behandlung (s. **Abbildung 12**). Insgesamt 25 min nach Umstellen des Dreiwegehahns (nach entsprechend 20 min tatsächlicher Kontrollbehandlung ( $t_{1/2}=20$  (s. **Abbildung 12**)) wurde die Messung beendet, der Dreiwegehahn erneut umgestellt und die LPA-Behandlung direkt anschließend begonnen. Die letzte Messung

während der Kontrollbehandlung ( $t_1=20$  (s. **Abbildung 12**)) wurde als erste Messung der Neuritenlänge während der LPA-Behandlung gewertet ( $t_2=0$  (s. **Abbildung 12**)).



**Abbildung 12: Ablauf der Lebendzellmikroskopie für die LPA-Behandlung transfizierter Zellen (s. 3.3.3):** Zunächst wurde (unter Spülung der Zellen mit kompletter Krebs-Ringer's Lösung mit Salzen ohne Zusätze) ein Areal gesucht, in welchem mehrere (möglichst mindestens fünf) transfizierte Zellen mit messbaren Neuriten zu finden waren. Hier erfolgte eine Markierung der für die Messung verwendeten Zellen und der messbaren Neuriten sowie eine erste Ausgangsmessung der Neuriten ( $t_1=0$ ). Anschließend wurde die **Kontrollbehandlung (1)** mit Krebs-Ringer's Lösung (mit Salzen) mit FAFBSA 1% Vehikel begonnen, wobei nach spätestens 5 min (in grün) damit gerechnet werden konnte, dass diese Lösung die Zellen erreicht hat, sodass ab diesem Zeitpunkt die eigentliche Kontrollbehandlung begann. Anschließend wurde über 20 min (in blau) zu mehreren Messzeitpunkten (in violett) die Neuritenlänge gemessen. Die letzte Messung (nach 20 min Kontrollbehandlung) definiert zugleich den Ausgangswert für die **LPA-Behandlung (2)** (LPA (Stammlösung in FAFBSA 1% in Wasser) in Krebs-Ringer's Lösung (mit Salzen)), welche sich direkt anschloss.  $t_1=0-20$ : Messzeitpunkte während der Kontrollbehandlung, Einheit Minuten (1).  $t_2=0-20$ : Messzeitpunkte während der LPA-Behandlung (2). Beispielbilder einer Behandlung von CFPMem-transfizierten Zellen mit LPA 10  $\mu\text{M}$ . Abbildungen unbearbeitet, mit Markierungen und Messungen der Neuriten. Messbalken entsprechen 60/30  $\mu\text{m}$  (groß/Zoom)

### 2.2.1.3 Experimente mit fluoreszierendem LPA

Eine der berichteten Formen der Interaktion von LPA und PRGs ist der durch PRGs induzierte Transport von LPA nach intrazellulär (s. 1.3.3). Im Vergleich zu Kontrollzellen wurde in *Prg1*-KO Zellen eine verminderte Aufnahme von (fluoreszierendem) LPA beobachtet (26,74). PRG1 ist somit womöglich in der Lage, LPA nach intrazellulär zu transferieren (25,26,74). Dies könnte mit einer Verringerung der extrazellulären LPA-Konzentration zusammenhängen, sodass weniger LPA an LPA-Rezeptoren binden und intrazelluläre Signalwege anstoßen könnte (25,26,74). Damit könnte eine vermehrte Aufnahme von LPA den LPA-Effekt an LPA-Rezeptoren verringern (ebd.). Da dies bisher nur für PRG1 gezeigt werden konnte, ging ich während meines Forschungsprojektes der Frage nach, ob dies auch für PRG2 nachweisbar ist.

Hierfür verwendete ich PRG1-Flag- und PRG2-Flag-transfizierte HEK293T-Zellen sowie RFP transfizierte Zellen als Kontrolle. In Analogie zur Literatur (74) verwendete ich fluoreszierendes LPA (TF-LPA). 24 h nach Transfektion wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und mit TF-LPA (Stammlösung präpariert wie LPA s.o., in FAFBSA 1% in Wasser) versetzt, sodass bei erneutem Hinzupipettieren die Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$  betrug. Nach 5 min LPA-Behandlung wurde das nicht von den Zellen aufgenommene TF-LPA von den Zellen mittels einer Waschung mit 0,001 % SDS in DMEM entfernt und die Zellen mit 15 % Sucrose in 4 % PFA für 20 min fixiert.

Nach Färbung der PRGs (mit Flag-Antikörpern) wurde die Intensität der Fluoreszenz des TF-LPA zwischen den Zellen verglichen. Leider stellte mich das Experiment vor zwei Probleme. Erstens konnte nur eine sehr gering ausgeprägte Fluoreszenz des nur mit einem Flag-Molekül markierten PRG2-Flag-Konstruktes mit Flag-Antikörpern erzielt werden, sodass PRG2-transfizierte Zellen (im Gegensatz zu dem mit drei Flag-Molekülen markierten PRG1-3xFlag) nicht sicher identifiziert werden konnten. Außerdem zeigte sich kein deutlicher Unterschied der (LPA-) Fluoreszenzintensität zwischen den PRG1-überexprimierenden und den untransfizierten Zellen (s. **Abbildung 46**, Anhang). Dies könnte daran liegen, dass der Unterschied sehr dezent ist (nur durch Quantifizierung erkennbar), nur in (primären) Neuronen, nach kürzerer LPA-Behandlung, bei geringeren/anderen LPA-Konzentrationen oder nicht bei Überexpression, sondern nur bei fehlender Expression (KO) von PRG1 vorliegt. Deshalb müsste im Weiteren getestet werden, ob ein Unterschied unter veränderten Bedingungen repliziert werden kann. Zudem ist vorstellbar, dass die Manipulation nach Fixierung (einschließlich Permeabilisierung) zu einem erneuten Transfer des verwendeten LPAs führte und aufgrund dessen kein Unterschied nachweisbar war. Leider standen für weitere Experimente keine primären Zellkulturen von *Prgr1/2*-KO-Mäusen und keine stabil PRGs exprimierenden Zelllinien sowie kein 3x-Flag-PRG2-Plasmid zur Verfügung, sodass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Methoden zur Vervielfältigung von Plasmiden

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA zur Verwendung in der Zellkultur wurden zunächst Dyt-Agar-Platten hergestellt (Material s.o.). Nach Autoklavieren des Dyt-Agars wird in steriler Umgebung (unter einer sterilen Bank oder rund um einen Bunsenbrenner) dem heruntergekühlten Medium das für das entsprechende Plasmid benötigte Antibiotikum hinzugefügt (Endkonzentrationen Kanamycin 100 µg/ml, Ampicillin 50 µg/ml). Anschließend wird die Flüssigkeit in unbeschichtete Petrischalen gegossen und bei geöffnetem Deckel in steriler Umgebung getrocknet. Die Platten können verschlossen mit dem Agar-Boden nach oben bei 4 °C gelagert oder direkt verwendet werden.

Die Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte nach der Hitzeschock-Methode (187). Hierfür wird die Plasmid-DNA (gelagert bei -20 °C) auf Eis aufgetaut, ebenso das *E. coli* Aliquot (gelagert bei -80 °C) auf Eis mit Wasser (dies garantiert einen guten Temperaturübergang). Anschließend wird 1 µg Plasmid-DNA (1 µg/µl) zu den aufgetauten 500 µl kompetenten XL 10 Gold *E. coli* Bakterien gegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgt die Transformation via Hitzeschock (60 sec bei 42 °C auf Thermoschüttler, 0 rpm) und dann die erneute Inkubation auf Eis (2-3 min). In steriler Umgebung wird 400 µl Dyt-Medium hinzugegeben (ohne Antibiotika) und dieser Ansatz bei 37 °C auf dem Thermoschüttler bei 300 rpm für 60 min inkubiert. Ein Ausstrich der transformierten Bakterien auf den vorbereiteten Agarplatten wird mittels eines gebogenen Glasstabes und 10-300 µl (i.d.R. am besten: 50 µl) Bakteriensuspension pro Platte durchgeführt und die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wird die Dichte der Bakterienkolonien geprüft. Um das Wachstum zu stoppen, können die Platten für einige Stunden bei 4 °C zwischengelagert werden. In steriler Umgebung werden Erlenmeyerkolben mit je 250 ml Dyt-Medium und Antibiotikum (Endkonzentrationen s.o.) vorbereitet. Mittels einer sterilen Pipettenspitze wird eine einzelne Kolonie von der Agarplatte entnommen und in das Medium (mitsamt Pipettenspitze) abgeworfen. Anschließend erfolgt die Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator über Nacht (150 rpm).

An Tag 4 wird die Maxiprep mithilfe des Nucleobond DNA Purification - Kits (188) durchgeführt. Hierfür werden die 250 ml Bakteriensuspension aus dem Erlenmeyerkolben auf fünf 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und diese bei 6000 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt (und autoklaviert). Mit serologischer Pipette werden

12 ml Puffer S1+RNase auf das erste Pellet gegeben, das Pellet durch Vortexen gelöst, die Lösung in das nächste Röhrchen gegeben und der Vorgang wiederholt, bis ein Röhrchen übrig bleibt. Anschließend werden 12 ml Puffer S2 hinzugegeben, 6-8x geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzugabe von 12 ml gekühltem S3 Puffer wird erneut 6-8x geschwenkt, bis die Lösung weiß flockt und der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Die Filterung erfolgt erst durch Trichter und Filterpapier, daraufhin durch einen AX500 Filter, um die Plasmid-DNA zu extrahieren (mittels Puffer N2, N3, N5 (Elutionspuffer)). Es folgt die Präzipitation der Plasmid-DNA mit 11 ml Isopropanol und die Zentrifugation (4 °C, 15.000 rcf, 30 min). Nach Entfernung des Überstandes wird das Pellet mit Ethanol gewaschen und zentrifugiert (4 °C, 15.000 rcf, 10 min). Der Überstand wird entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wird das Pellet mittels RNase-freiem Wasser gelöst und auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl verdünnt. Dazu wird die Konzentration wiederholt mit Biospektrometer gemessen und hierbei die Reinheit der DNA mittels A260/280- und A260/230-Wert geprüft (Referenzwerte s.u.). Die Plasmid-DNA wird anschließend bei -20 °C gelagert.

Die extrahierten Plasmide wurden einem Restriktionsverdau (Komponenten s. **Tabelle 14**) unterzogen. Dabei werden die ursprünglich zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme genutzt, um die Plasmid-DNA zu schneiden. Die entstehenden Produkte werden auf ihre Größe hin überprüft, ob diese den zu erwartenden Werten entsprechen. Plasmid-DNA, FD-Green Puffer, die beiden Enzyme und Wasser (und No-Restriktionskontrollen ohne Enzyme) werden hierfür nach den unten stehenden Verhältnissen gemischt (s. **Tabelle 30**). Anschließend wird die Mischung 30 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert und auf einem Agarosegel aufgetrennt (s. **Abbildung 47**, Anhang).

**Tabelle 30: Komponenten für den Restriktionsverdau. pDNA: Plasmid-DNA**

| Komponenten     | Volumen (µl) Restriktion               | Volumen (µl) No-Restriktion |
|-----------------|----------------------------------------|-----------------------------|
| DNA             | 1 (bei pDNA Konzentration von 1 µg/µl) | 1                           |
| FD-Green Puffer | 2                                      | 2                           |
| Enzym 1         | 1                                      | 0                           |
| Enzym 2         | 1                                      | 0                           |
| Wasser          | 15                                     | 15                          |
| Gesamtmenge     | 20                                     | 20                          |

Zudem wurde die vervielfältigte Plasmid-DNA durch Eurofins (TubeSeq Service Eurofins Genomics) sequenziert (15 µl Proben mit Konzentration 50-100 ng/µl eingeschickt) und die Ergebnisse wurden mit den bekannten Sequenzen (UniProt Alignment/NCBI Blast) verglichen, um Mutationen auszuschließen. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer und Sequenzen werden in **Tabelle 15** und **Tabelle 16** angegeben.

#### 2.2.2.2 Methoden im Rahmen der Vorbereitung und Durchführung der qRT-PCR

Um RNA aus Neuro2a-Zellen zu isolieren, wurde die Trizol-Methode von Comoczynski und Sacchi (189) verwendet. Hierfür wurden jeweils zwei 10 cm Petrischalen (an drei verschiedenen Tagen) verwendet, in denen Neuro2a-Zellen für mehrere Tage (3-4) bis zur 90-100 %-igen Konfluenz gewachsen waren. Zu Beginn der RNA-Isolation wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit DPBS gewaschen. Das DPBS wird abgesaugt, erneut werden 4 ml DPBS pro Schale hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Das Zell-DPBS-Gemisch wird 5 min bei 1500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Gewicht des Pellets (als Differenz des Gewichtes des Reaktionsgefäßes vorher und nachher) mit einer Feinwaage erfasst.

Im Folgenden wird pro 50 mg Gewebe 1 ml Trizol hinzugegeben. Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat, dieses dient der Inaktivierung von Ribonucleasen (189). Mittels Kanülen (zuerst 0,9x70 mm, anschließend 0,6x60 mm) und dazu

gehörenden Spritzen (5 ml) wird das Gewebe durch wiederholtes Aufziehen und Wiederabgeben im Trizol homogenisiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation aller Proben auf dem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur für 5 min (20-50 rpm). Unter dem Abzug wird anschließend Chloroform hinzugegeben (200 µl/1 ml), das Gemisch geschwenkt und 2-3 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 12.000 rcf, 4 °C für 15 min. Dadurch wird eine Phasentrennung in RNA (oben, wässrig), DNA (Interphase) und unten Proteinen in Chloroform erreicht. Die RNA in der wässrigen Phase kann abgenommen und mit Isopropanol präzipitiert werden.

Vor der Präzipitation wird evtl. enthaltene DNA durch die Verwendung von DNase 1 aus dem Gemisch entfernt. Hierfür werden 89 µl Nuclease-freies H<sub>2</sub>O, 10 µl DNase-1 Reaktionspuffer (10x) sowie 1 µl DNase 1 hinzugegeben und es erfolgt eine Inkubation bei 37 °C für 10 min. Daraufhin wird 1 µl 0,5 M EDTA (RNase-frei) ergänzt und die DNase bei 75 °C für 10 min inaktiviert. Es folgt die Präzipitation mit 0,5 ml Isopropanol/1 ml eingesetztes Trizol und das Mischen durch kurzes Vortexen mit anschließender Inkubation für 8-10 min bei Raumtemperatur. Dann erfolgen mehrere Waschschrte mit Ethanol (Zentrifugation 10 min 12000 rcf, 4°C → Überstand entfernen, Hinzufügen von 1 ml 70 % Ethanol/1 ml eingesetztes Trizol → Mischen durch kurzes Vortexen → 6 min 800 rcf, 4 °C → erneut Überstand verwerfen und erneut Ethanol hinzugeben → erneute Zentrifugation → Überstand verwerfen und Pellet trocknen lassen auf Eis).

Anschließend muss das RNA-Pellet in 10 µl RNase/DNase-freiem Wasser resuspendiert werden. Die Konzentration kann im Biospektrometer gegen Leerwert gemessen und auf 1 µg/µl adjustiert werden (Programm RNA 1mm). Dabei geben der A260/A280- und A260/A230-Wert Aufschlüsse über die Reinheit der RNA (A260/A280 sollte bei ca. 2 für RNA (bei ca. 1,8 für DNA) und A260/A230 bei 2-2,2 (190) liegen). Qualitätsanalysen (s.u.) vor qRT-PCR wurden entsprechend den MIQE-Leitlinien durchgeführt (191). Die RNA-Präparation erfolgte an drei voneinander unabhängigen Tagen (biologische Replikate) aus jeweils zwei Petrischalen. Die entstehende cDNA von den jeweils zwei Petrischalen wurde nach den Qualitätskontrollen (s.u.) gepoolt.

Die Qualität der RNA wurde mittels einer TapeStation kontrolliert. 30 min vor Gebrauch wird der RNA Screen Tape Puffer auf Raumtemperatur gebracht und durch Vortexen homogenisiert. 1 µl RNA (gelagert bei -80 °C) wird mit 5 µl des Puffers vermischt (bei einer RNA-Konzentration von 25-500 ng/µl) und in dafür vorgesehene Röhrchen pipettiert. Die Proben werden nach einer Erwärmung im Sure Cyclor für 10 min in das Gerät (Tape Station) eingesetzt, wo eine automatisierte Analyse durchgeführt wird. Die RNA-Qualität wird als Wert zwischen 1 und 10 angegeben (RIN=RNA Integrity Number). Bei  $RIN \geq 7$  konnte die extrahierte RNA sämtlich für die qRT-PCR verwendet werden.

Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurde eine reverse Transkription an die RNA-Isolation angeschlossen. Hierzu wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. RT-Puffer, dNTP-Gemisch, Random Primer und zuletzt die MultiScribe-Reverse Transkriptase werden in den entsprechenden Verhältnissen zu einem Mastermix zusammengefügt. Anschließend werden 0,5 µl RNA (bei Konzentration 1µg/µl), 5,8 µl Mastermix und 13,7 µl reines Wasser für eine 20 µl Reaktion gemischt. Es wird eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Anschließend erfolgen Inkubationsschritte – zuerst bei 25 °C über 10 min, 300 rpm, dann bei 37 °C über 2 h und zuletzt 5 min bei 85 °C. Die synthetisierte cDNA wird bei -20 °C gelagert.

Tabelle 31: Material für Reverse Transkription, RT: Reverse Transkriptase

| MASTERMIX                                                            | 20 µl Reaktion, + RT | 20 µl Reaktion, - RT (Kontrolle) |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 10 x RT-Buffer                                                       | 2                    | 2                                |
| 25 x dNTP-Mix (100 mM)                                               | 0,8                  | 0,8                              |
| 10 x Random Primer ( µl)                                             | 2                    | 2                                |
| Multiscribe RT                                                       | 1                    | 0                                |
| Gesamt                                                               | 5,8                  | 4,8                              |
| ➔ 0,5 µg RNA (1 µg/µl) + 5,8 µl Mastermix + 13,7 µl H <sub>2</sub> O |                      |                                  |

Um die cDNA-Qualität zu überprüfen, wurde eine  $\beta$ -Aktin PCR durchgeführt. Hierzu wird ein Mastermix (s. **Tabelle 32**) pipettiert, dieser in die Reaktionsgefäße für die PCR verteilt und die cDNA hinzugefügt. Es werden verschiedene cDNA-Volumina (und die entsprechenden Non-RT-Kontrollen) eingesetzt (0,5/1/2 µg). Das Volumen, bei welchem eine klare Bande in der anschließenden Gelelektrophorese zu sehen ist, kann für die qRT-PCR verwendet werden (hier: 1 µl). Die PCR wird nach dem unten stehenden Protokoll (s. **Tabelle 33**) durchgeführt. Es wird eine Gelelektrophorese durchgeführt und das Gel mittels UV-Detektor auf Banden geprüft. Für die Gelelektrophorese wird ein 1 % Agarosegel (z.B. 0,5 g Agarose in 50 ml 1xTBE) verwendet. Dieses wird frisch vor der Elektrophorese durch Kochen der Lösung in der Mikrowelle hergestellt, bis sich die Agarose vollständig löst. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt ist, wird als DNA-Färbemittel HD Green Plus DNA Stain hinzugefügt. Das Gel wird in eine dafür vorgesehene Vorrichtung gegossen. Während des Abkühlungsprozesses verfestigt sich das Gel. Anschließend wird das Gel in die Gelelektrophorese-Kammer überführt, die cDNA-Proben in die Vertiefungen pipettiert und eine Spannung angelegt (80 V, 3 A, 300 W für 30-45 min). Die Banden werden im UV-Detektor detektiert (s. **Abbildung 49**, Anhang).

Tabelle 32: Mastermix für  $\beta$ -Aktin PCR

|                                | Volumen (µl)/Probe |
|--------------------------------|--------------------|
| 5x Green GoTaq Reaction Puffer | 5                  |
| dNTPs (10 mM)                  | 1                  |
| 5'Primer (Aktin, 10 mM)        | 1                  |
| 3'Primer (Aktin, 10 mM)        | 1                  |
| GoTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)  | 0,2                |
| Ultrareines Wasser             | 15,8               |
| MasterMix total                | 24                 |

Tabelle 33: Protokoll für  $\beta$ -Aktin-PCR

| Schritte                     | Temperatur | Zeit  | Zyklus |
|------------------------------|------------|-------|--------|
| Initiale Denaturierung       | 95°C       | 2 min | 1      |
| Denaturierung                | 95°C       | 30 s  | 30     |
| Annealing                    | 70°C       | 30 s  | 30     |
| Elongation                   | 72°C       | 1 min | 30     |
| Finale Elongation            | 72°C       | 5 min | 1      |
| Ende (Halten der Temperatur) | 8°C        |       |        |

Die qRT-PCR wurde als Taq-Man Assay durchgeführt. Dabei werden spezielle, streng sequenzspezifische Sonden verwendet, welche am 5' Ende mit einem fluoreszierenden sog. Reporter und am 3' Ende mit einem sog. Quencher markiert sind (192). Ist die Sonde (Probe) intakt, so wird die Fluoreszenz des Reporters durch die räumliche Nähe des Quenchers blockiert (192). Während der PCR wird die Sonde durch die Taq-Polymerase geschnitten und es kommt aufgrund der geschaffenen Distanz zwischen Reporter und Quencher zur Fluoreszenz, welche von Zyklus zu Zyklus und mit jedem amplifizierten Genabschnitt streng sequenzspezifisch zunimmt (192). Für die qRT-PCR wurden



Primer-Probes verwendet, welche im Vorhinein von der Arbeitsgruppe genutzt und mittels serieller cDNA-Verdünnungsreihen validiert worden waren (33,168) (für PRGs nicht explizit in der Publikation genannt, aber durch Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Bräuer zugesichert). Es konnte somit eine nahezu identische Effektivität der Primer-Sonden vorausgesetzt werden.

Die qRT-PCR erfolgte schließlich nach folgendem Ablauf: Die cDNA wird 1:4 verdünnt (1 µl cDNA + 3 µl H<sub>2</sub>O). Die Primer-Sonden (1 µl/Well) werden mit Mastermix (10 µl/Well) und Wasser (5 µl/Well) versetzt. Anschließend wird zuerst die verdünnte cDNA (4 µl pro Well) und daraufhin die Mischung aus Mastermix und Sonde (16 µl/Well) in die 96-Well-Platte entsprechend des zuvor erstellten Layouts pipettiert. Die Platte wird anschließend mit einer dafür vorgesehenen Folie abgedichtet und bei 1000 rcf für 1 min zentrifugiert. Anschließend erfolgt die qRT-PCR nach dem unten stehendem Protokoll (s. **Tabelle 34**) entsprechend den Vorgaben für den verwendeten Mastermix. Es wurden jeweils drei biologische Replikate (Aussaat und RNA-Isolation an verschiedenen Tagen) und zwei technische Replikate sowie jeweils eine Kontrolle ohne DNA (NTC: No Template Control) verwendet. Als Referenzgene wurden  $\beta$ -Aktin und GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) genutzt. Es wurden außerdem Wasserkontrollen (no-template-control (NTC)) mitgeführt. Die Auswertung wurde anschließend mit Excel und die Graphenerstellung mittels GraphPad PRISM durchgeführt. Die Expressionslevel wurden mittels  $\Delta$ CT-Methode mit Normalisierung für die beiden Referenzgene berechnet.

**Tabelle 34: qRT-PCR Protokoll**

|                               | Temperatur (°C) | Zeit (s) | Zyklen |
|-------------------------------|-----------------|----------|--------|
| <b>Initiale Denaturierung</b> | 95              | 00:20    | 1      |
| <b>Denaturierung</b>          | 95              | 00:01    | 41     |
| <b>Annealing/Extension</b>    | 60              | 00:20    | 41     |

### 2.2.3 Immunzytochemie und mikroskopische Auswertung

Um die morphologischen Veränderungen, welche durch die Überexpression bestimmter Proteine in HEK293/Neuro2a-Zellen auftreten, im Detail zu untersuchen, wurden immunzytochemische Verfahren durchgeführt. Hierzu werden die Zellen zunächst mit 1xPBS bei Raumtemperatur gewaschen und über 15-20 min bei Raumtemperatur mit 15 % Sucrose in 4 % PFA fixiert (1 ml Gesamtvolumen/Deckgläschen bei 12-Well-Platte). Anschließend erfolgt eine erneute Waschung mit 1xPBS (3 x 5 min). Es besteht die Möglichkeit der Zwischenlagerung bei 4 °C (bedeckt mit 1xPBS, um ein Austrocknen zu verhindern). I.d.R. wurde jedoch direkt mit der Färbung und Inkubation mit den primären Antikörpern begonnen. Hierzu werden die Zellen zunächst mit 0,1 % TritonX-100 und 0,1 % Sodiumcitrate in 1xPBS für 3 min permeabilisiert (auf Schüttler bei 30-50 rpm), gewaschen (3 x 5 min) und die Deckgläschen in eine Inkubationskammer (Petrishalen, eingepackt in Aluminiumfolie zur Abdunklung, Parafilm als Unterlage für die Deckgläschen und seitlich feuchte Papiertücher für die Luftfeuchtigkeit) überführt, in der Blocklösung inkubiert (1h) und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert (ab hier 200/100 µl Gesamtvolumen/Deckgläschen bei 12/24-Well-Platten). Am folgenden Tag erfolgt die erneute Waschung (3x5 min mit 1xPBS) und die Inkubation mit den sekundären Antikörpern. Nach einer letzten Waschung werden die Deckplättchen mit Mowiol auf Objektträgern fixiert und diese nach Trocknung bei Raumtemperatur über 24 h bei 4 °C gelagert. Für eine Färbung von GFP, PIP<sub>2</sub>, des Zytoskelettes und des Zellkerns (s.u.) wurde eine serielle Färbung durchgeführt (erst Inkubation mit primären GFP-Antikörpern über Nacht und anschließend Inkubation mit primären PIP<sub>2</sub>-Antikörpern über Nacht).



Für die mikroskopische Auswertung wurden zunächst die Negativkontrollen (ohne primäre Antikörper, nur sekundäre Antikörper) mit dem Olympus-IX83-Mikroskop überprüft. Für die übrigen Aufnahmen wurde das konfokale Mikroskop FV3000 genutzt. Hierzu wurden je nach Bedarf folgende (cw Diode) Laser genutzt (405 nm, 445 nm, 488 nm, 514 nm, 561 nm, 594 nm, 640 nm). Es wurde das 40x-NA-1.4-Objektiv mit Olympus Immersion Oil Type-F genutzt, da dieses Öl (mit ca. 1,5) einen sehr ähnlichen refraktiven Index wie Mowiol (1.41-1.49) besitzt und bei höchster numerischer Apertur der zur Verfügung stehenden Objektive die bestmögliche Auflösung ermöglicht. Es wurden sequentielle Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt, um zu vermeiden, dass die verschiedenen Floreszenzen überlappen. Es wurden Schichtaufnahmen über mehrere Ebenen (sog. Z-Stacks) über jeweils eine ganze Zelle aufgenommen und anschließend mit dem Programm Cellsens übereinander gelagert (Max Z-Funktion).

Für die immunzytochemischen Fluoreszenzaufnahmen (s.u.) wurden möglichst Zellen verwendet, welche am Rand von Zellansammlungen oder zwischen solchen lagen und nicht durch andere Zellausläufer überlagert waren, um diese und die Membran möglichst umfänglich beurteilen zu können (s.u.).

Aufgrund der beschriebenen Translokation von PIP<sub>2</sub> aus der Membran ins Zytosol induziert durch PRG3 war geplant (22), experimentell zu überprüfen, ob dies auch für andere PRGs nachweisbar ist. In Kooperation mit der PhD-Studentin Franziska Köper wurde hierfür ein PIP-Antikörper in Neuro2a getestet. Trotz der Optimierung der Block- und Antikörperlösungen (s. **Tabelle 35**) konnte hiermit in transfizierten Zellen jedoch keine spezifische Färbung erzielt werden.

**Tabelle 35: Block- und Antikörper-Lösungen für ICC (PIP-Färbungen in N2a wurden in Kooperation mit PhD Studentin Franziska Köper durchgeführt)**

| <b>Blocklösungen</b>       |                             |                                                                                  |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nr</b>                  | <b>Inhalt</b>               | <b>Wofür verwendet?</b>                                                          |
| 1                          | 10 % FCS, 1 % NGS in 1xPBS  | <b>PIP in Neuro2a, GFP and Flag in N2a und HEK</b>                               |
| 2                          | 1 % BSA, 10 % NGS in 1xPBS  | getestet für PIP in Neuro2a (nicht optimal)                                      |
| 3                          | 3 % BSA in 1xPBS            | weitere Option für PIP in Neuro2a                                                |
| <b>Antikörper Lösungen</b> |                             |                                                                                  |
| 1                          | 5 % FCS, 0,5 % NGS in 1xPBS | getestet für PIP in Neuro2a (nicht optimal), geeignet für PIP-Färbung in HEK293T |
| 2                          | 0,5 % BSA, 5 % NGS in 1xPBS | <b>geeignet für PIP in Neuro2a</b>                                               |
| 3                          | 1xPBS                       | getestet für PIP in Neuro2a (nicht optimal)                                      |
| 4                          | 5 % FCS, 1 % NGS in 1xPBS   | <b>geeignet für GFP and Flag in Neuro2a</b>                                      |

Für die Messung der Neuriten und Protrusionen transfizierter, differenzierter Neuro2a-Zellen verwendete ich die Bildbearbeitungs-Software CellSens. Leider war in unserem Labor kein membrangängiges Plasmid/Antikörper/Dye für Membranfärbung etabliert, sodass die Zellausläufer mithilfe einer Kombination von GFP- und Aktin-Färbung markiert und gemessen wurden. Dabei wurden hohe Laser-Intensitäten für beide Kanäle verwendet, um möglichst die gesamte Länge der Neuriten zu erfassen. Da nicht alle Zellen dieselbe Menge an Protein herstellen und es insbesondere bei der Aktinfärbung schnell zu einem Ausbleichen der Färbung kam, wurde die Laserintensität für jede Zelle einzeln so angepasst, dass die Protrusionen möglichst deutlich (bei weiterhin dunklem Hintergrund) dargestellt waren. Für die Darstellung der Protrusionen werden geschärfte Abbildungen gezeigt. Diese wurden mittels der Dekonvolutionsfunktion von Cellsens bearbeitet (Algorithmus: 2D CI-Deconvolution, Modalität Weitfeld-Fluoreszenz).

### 2.2.4 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurden die Programme Excel (insbesondere für die Rohdaten), SPSS (insbesondere Analysen Neuritenretraktion unter LPA, s. 3.3.3) und Prism (insbesondere zur Graphenerstellung und auch für statistische Analysen unter 3.2.6) genutzt. Für die Wahl der entsprechenden Tests orientierte ich mich an der Methodenberatung der Universität Zürich (193). Um zu testen, ob die Unterschiede der zentralen Tendenz der Gruppen von Neuro2a-Zellen, welche mit verschiedenen Plasmiden transfiziert wurden (unabhängige Stichproben, zwei Variablen, mehr als zwei Stufen), signifikant sind, kommen zwei Tests in Frage: die einfaktorielle Varianzanalyse und der Kruskal Wallis Test. Um zu entscheiden, welcher Test verwendet werden soll, müssen die Werte zunächst in Hinsicht darauf untersucht werden, ob eine Normalverteilung vorliegt. Hierfür wurden der Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Test (mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) verwendet, die zeigten, dass es sich (bei allen u.g. Daten) nicht um eine Normalverteilung handelt (s.u.). Aufgrund dessen wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt (s. 3.2.6 und 3.3.3). Für den Vergleich verbundener Stichproben (z.B. Neuritenlänge zu Beginn versus am Ende der Kontroll-/LPA Behandlung bei CFPMem-transfizierten Zellen) diente der Wilcoxon-Test (verbundene Stichproben, zwei Variablen, zwei Stufen). Als Post-Hoc-Tests wurden Dunn-Bonferroni-Tests mit einer Korrektur des P-Wertes für das multiple Testen verwendet. Die Effektstärke wurde mittels Korrelationskoeffizienten nach Pearson ( $r = \left| \frac{z}{\sqrt{n}} \right|$ ) geschätzt und die Effektstärke nach Cohen (1992) in schwach ( $r < 0,3$ ), mittel ( $0,3 < r < 0,5$ ) und stark ( $r > 0,5$ ) eingeteilt. Für die Analyse der LPA-induzierten Neuritenretraktion in transfizierten Zellen (s. 3.2.3.3 und 3.3.3.3) wurden Zellen von der Analyse ausgeschlossen, welche während der Kontrollbehandlung einen Kollaps (definiert als Neuritenretraktion auf  $>20\%$  der Ausgangslänge) zeigten (für 10  $\mu\text{M}$  Experimente  $n=2$ , für 5  $\mu\text{M}$  Experimente  $n=11$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Neuro2a- und HEK293T-Zellen unter Standardbedingungen

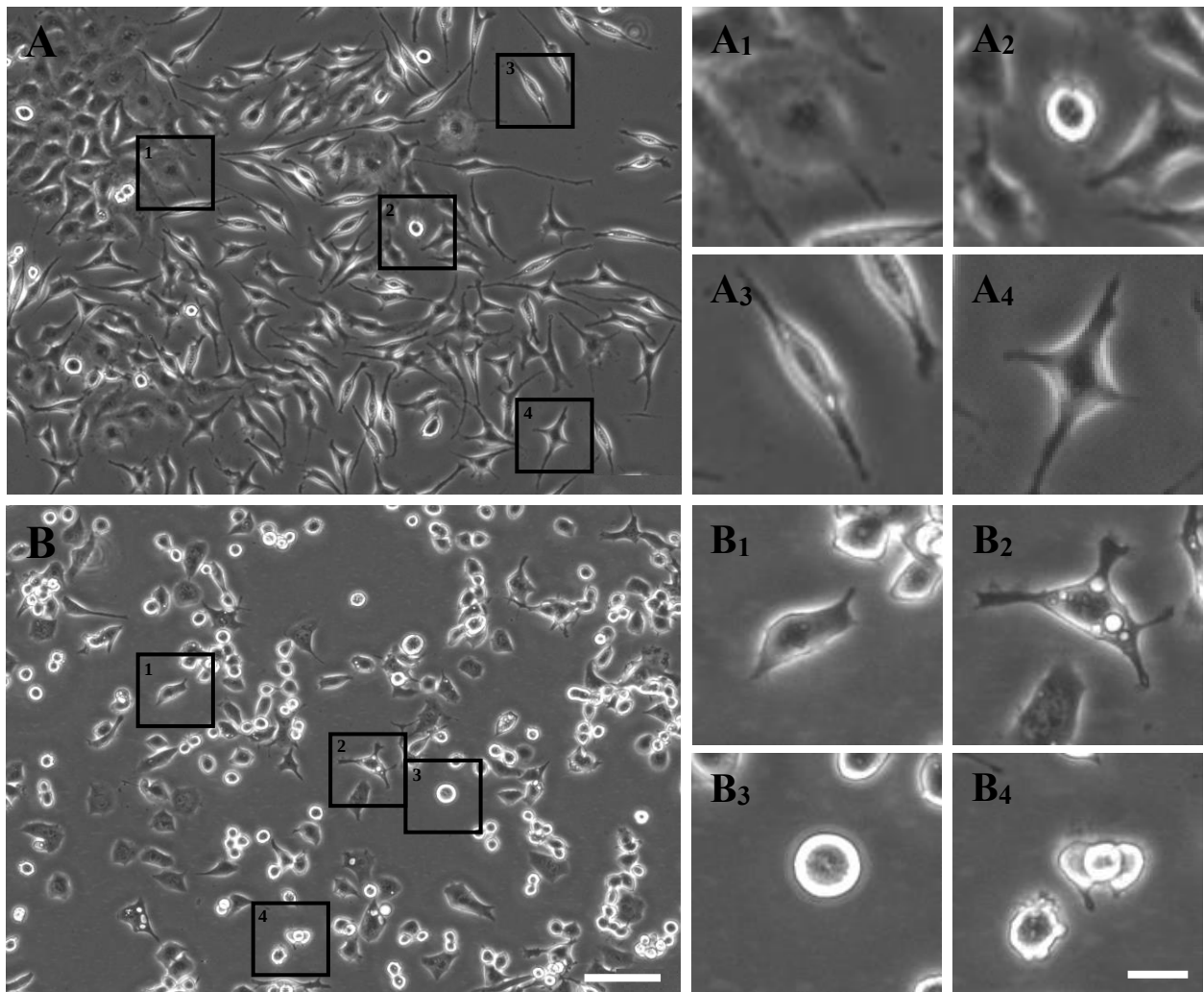
Für die hier beschriebenen Zellkulturexperimente wurden Neuro2a-Zellen als Modellorganismen für neuronale Zellen verwendet. Da mehrfach in Studien HEK293-Zellen für die Untersuchung der Lokalisation der PRGs und der Filopodienformation induziert durch PRG-Überexpression verwendet wurden, wurden diese Zellen als Vergleichsobjekte genutzt. Im ersten Abschnitt soll die allgemeine Morphologie der verwendeten Zellen sowie Herausforderungen in der experimentellen Verwendung dieser Zellen beschrieben werden.

#### 3.1.1 Neuro2a-Zellen

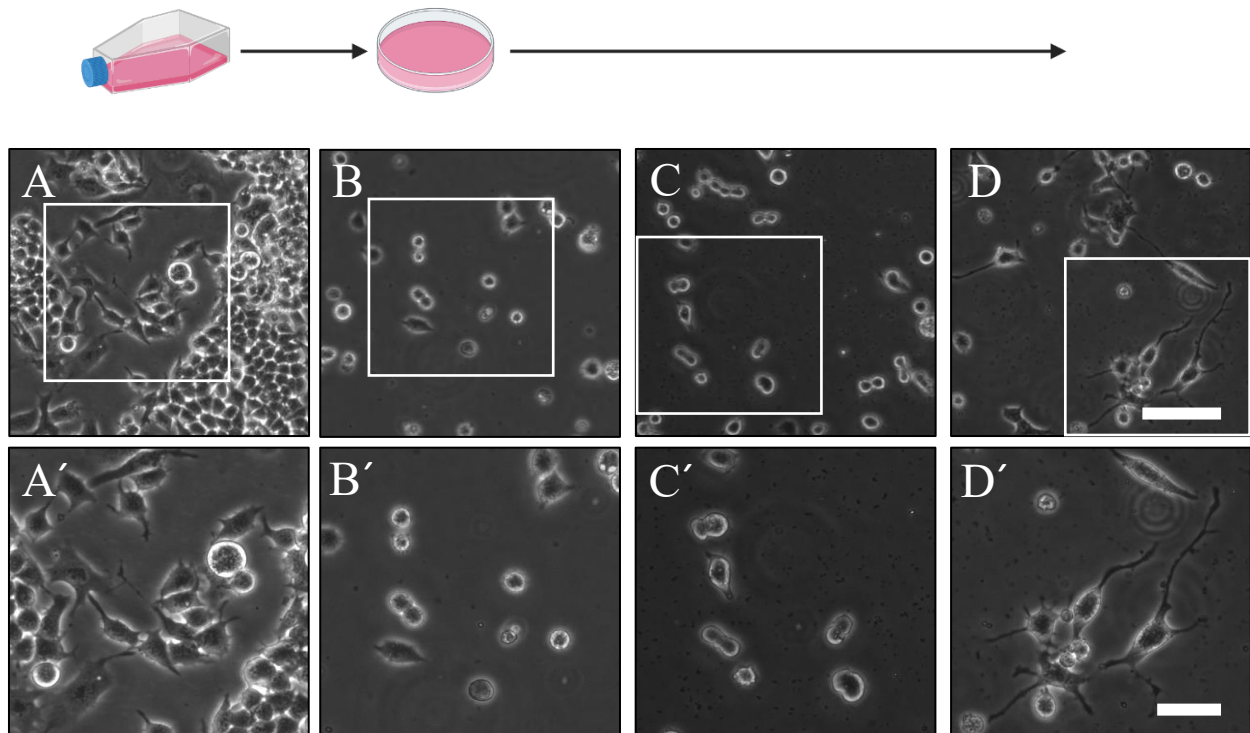
Neuro2a-Zellen wurden ursprünglich aus einem murinen Neuroblastom gewonnen. (194). Dabei handelt es sich um einen embryonalen Tumor, welcher vermutlich aus Zellen der Neuralleiste (171) hervorgeht. Es ist davon auszugehen, dass sich nicht nur im Rahmen der Tumorentstehung, sondern auch während der späteren Kultivierung verschiedene chromosomale, genetische und epigenetische Veränderungen entwickelten (195,196). Wie beschrieben, ist diese Zelllinie nicht mit Neuronen gleichzusetzen.

Zu Beginn der hier dargestellten Experimente wurden Neuro2a-Zellen verwendet, welche freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl Koch (AG Biochemie, hier bezeichnet als Neuro2a\_1) zur Verfügung gestellt wurden. Diese zeigten eine Morphologie von überwiegend bipolaren und multipolaren Zellen (fibroblastische Zellmorphologie) sowie einigen Zellen mit eher epithelialer Morphologie (größere Zell-Zell-Kontaktflächen und weniger Zellausläufer) sowie wenigen runden Zellen, teils mit dünnen Zellausläufern (s. **Abbildung 13**, A) (für die Beschreibung der verschiedenen Zellmorphologien s. auch (197)). Neuro2a-Zellen wachsen adhärent und eher separiert voneinander, teils bilden sich aber auch Ansammlungen von Zellen (s. **Abbildung 13**, A,B). Im Laufe der Zeit veränderte sich die Morphologie und der Anteil an (unerwünschten) runden sowie epitheloiden Zellen nahm zu. Runde und epitheloide Zellen eignen sich nicht für die Beurteilung von Abrundung und Neuritenretraktion. Deshalb wurden die Zellen verworfen und neue Zellen aufgetaut. Die Kultivierung in serumfreiem Medium führte bei Neuro2a\_1-Zellen lediglich zu geringfügigen Veränderungen der Zellmorphologie (inspektorisch etwas längere Zellausläufer) sowie zu einer reduzierten Proliferation. Auch eine Behandlung der Zellen mit Retinsäure (s.o.) führte nicht zu einer deutlichen Differenzierung (s. Methodenteil).

Im Sommer 2022 wurde eine Kontamination mehrerer Zelllinien unserer Arbeitsgruppe mit Mykoplasmen festgestellt. Zuvor aufgetretene Veränderungen (deutliche Verschlechterung) der Transfektionseffizienz und morphologische Veränderungen sind möglicherweise hierauf zurückzuführen. Leider betraf die Kontamination auch die bei -80 °C gefrorenen Zellen (P22). Aufgrund dessen musste ein Wechsel auf Neuro2a-Zellen einer anderen Arbeitsgruppe (AG Neurosensorik/Prof. Mouritzen, hier genannt Neuro2a\_2) erfolgen. Diese zeigten überraschenderweise eine abweichende Morphologie (s. **Abbildung 13** (B)), welche eher derjenigen entspricht, welche von kommerziellen Anbietern für Neuro2a-Zellen angegeben wird (198). Neuro2a\_2-Zellen zeigten eine ausgeprägte Differenzierungsneigung infolge der Kultivierung in serumfreiem Medium (s. **Abbildung 14**). Die für Neuro2a\_1 optimierten Verhältnisse für die Transfektion (mit Metafectene® Pro) konnten nicht äquivalent für Neuro2a\_2 genutzt werden.



**Abbildung 13: Vergleich Neuro2a-Morphologie:** **A:** Neuro2a\_1-Morphologie (P37): **A<sub>1</sub>:** epitheloid, **A<sub>2</sub>:** rund, **A<sub>3</sub>:** bipolar, **A<sub>4</sub>:** multipolar. **B:** Neuro2a\_2-Morphologie (P11): **B<sub>1</sub>:** nicht abgerundet, kurze Neuriten, **B<sub>2</sub>:** multipolar, **B<sub>3</sub>:** rund, **B<sub>4</sub>:** rund mit kurzen Neuriten. Aufnahmen mit Zellkulturmikroskop. P: Passage. Messbalken entsprechen 100  $\mu\text{m}$  (A/B)/25  $\mu\text{m}$  (A/B<sub>1-4</sub>).



**Abbildung 14: Neuronale Differenzierung von Neuro2a\_2 im Rahmen einer Kultivierung in serumfreiem Medium:** Veränderung der Morphologie der Neuro2a\_2 vor/nach Aussaat, Transfektion (hier: Kontrollplasmid CFPMem) und Wechsel auf ein Medium ohne FBS (äquivalent zum Vorgehen während der LPA-Experimente (s. 2.2.1.2)): **A:** gemischte Morphologie bei hoher Konfluenz vor Aussaat in T75-Flasche. **B:** 24 h nach Aussaat in Petrischalen (kurz vor Transfektion) vorwiegend runde Zellmorphologie. **C:** weiterhin vorwiegend runde Zellmorphologie 3 h nach Transfektion (direkt vor Mediumwechsel). **D:** Nach 16-20 h Kultivierung in Medium ohne FBS neuronale Differenzierung der Neuro2a\_2-Zellen deutlich erkennbar. FBS: fetales bovines Serum. Aufnahmen mit Zellkulturmikroskop. Messbalken entspricht in Abbildungen A-D 100  $\mu\text{m}$ / A'-D' 50  $\mu\text{m}$ . Abbildungen oberhalb (Flasche/Petrischale) erstellt mit Biorender.com.

In Anbetracht der morphologischen Divergenz sind Unterschiede auf genetischer und/oder epigenetischer Ebene zwischen den beiden verschiedenen Neuro2a-Zelllinien wahrscheinlich. Die Veränderungen könnten u.a. in Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Anzahl an Passagen der beiden Zelllinien stehen. Hierbei sollte jedoch bedacht werden, dass für beide Zelllinien die tatsächliche Anzahl an Passagen nicht bekannt ist, da die genannten Arbeitsgruppen, von welchen wir die Zellen bezogen, die Zellen wiederum von anderen Arbeitsgruppen bezogen und möglicherweise P0 (Passage 0) mehrmals neu definiert wurde. Hierfür spricht auch, dass bei einem käuflichen Erwerb von Neuro2a durch die Zellbank von ATCC laut Nachfrage im August 2022 die Zellen eine Passagenanzahl von P180 (Aussage von Christian Wolff am 1.8.2022, ATCC Product Specialist) besitzen. Aufgrund der genannten Unterschiede lassen sich die Ergebnisse nur bedingt von der einen auf die andere Zelllinie übertragen. Aus diesem Grund wird im Folgenden jeweils benannt, welche Zelllinie für die entsprechenden Experimente genutzt wurde (Neuro2a\_1 oder Neuro2a\_2).

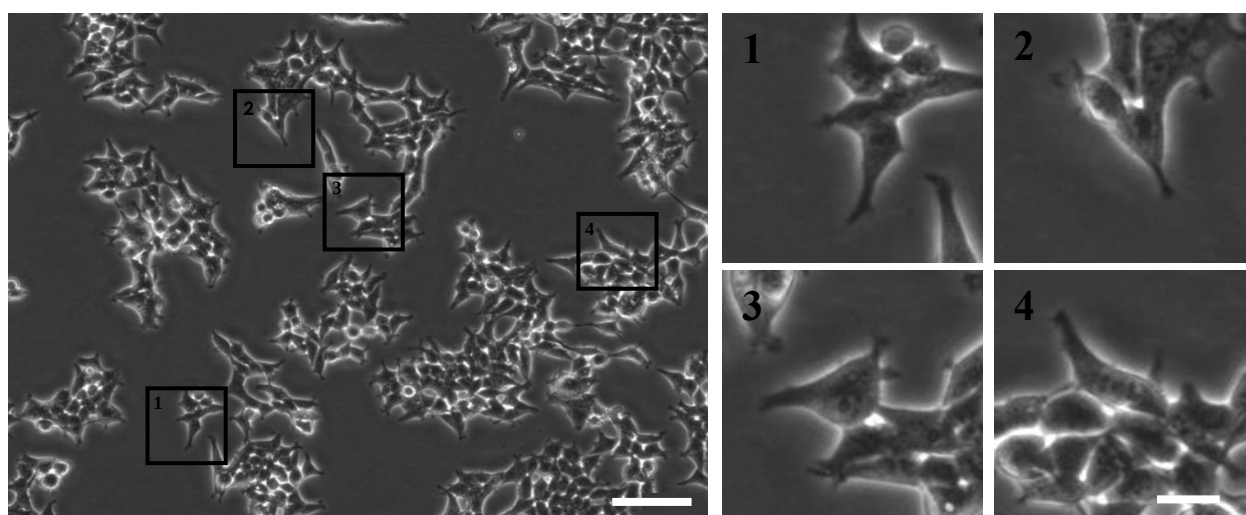
**Tabelle 36: Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Neuro2a-Zelllinien hinsichtlich Morphologie unter Kultivierung in DMEM mit/ohne FBS sowie Transfektionseffizienz.** Man beachte die unterschiedliche Anzahl an Passagen (P22 bzw. P6 war die angegebene Passage der jüngsten Kulturen (gefroren im Flüssigstickstofftank)). **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium. **FBS:** fetales bovines Serum. \* zuletzt Abnahme der Transfektionseffizienz, mutmaßlich aufgrund Mykoplasmen-Kontamination.

|                                                                         | Neuro2a_1                                                                                                                 | Neuro2a_2                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Passage</b>                                                          | 22+                                                                                                                       | 6+                                                                                                                |
| <b>überwiegende Morphologie bei Kultivierung in Medium mit FBS</b>      | bipolar/multipolar                                                                                                        | rund (teils mit kurzen Ausläufern), verschiedene Zelltypen gleichzeitig                                           |
| <b>morphologische Veränderungen bei Kultivierung in Medium ohne FBS</b> | kaum Veränderungen, teilweise Abrundung                                                                                   | neuronale Differenzierung und Vereinheitlichung der Morphologie                                                   |
| <b>Transfektion</b>                                                     | Metafectene® Pro sehr effizient (sehr geringe DNA/Metafectene® Pro Volumina ausreichend für hohe Transfektionseffizienz)* | Metafectene® Pro weniger effizient (Standardvolumina notwendig (deutlich höher), Transfektionseffizienz geringer) |

### 3.1.2 HEK293T-Zellen

Die als Referenzzelllinie verwendeten HEK293T-Zellen sind etwas kleiner als Neuro2a-Zellen und wachsen adhärent größtenteils in Zellverbänden dicht gedrängt mit großen Zell-Zell-Kontaktflächen. Es handelt sich dabei um humane embryonale Nierenzellen mit überwiegend epithelialer Morphologie (199). Vereinzelt können HEK-Zellen auch längere Zellausläufer (hier genannt: Filopodien) ausbilden (s. **Abbildung 15**). Der genaue Ursprung von HEK-Zellen ist unbekannt, da der Zelltyp vor der Immortalisierung nicht ausreichend charakterisiert wurde (200). Es könnte sich dabei um Vorläufer von Epithelzellen, Endothelzellen oder neuronalen Zellen handeln, wobei sich die Zellen nach der Immortalisierung und den daraus resultierenden (oder sich in der Folge entwickelten) (epi-)genetischen Veränderungen inklusive eines hypotriploiden Genotyps nicht als Modell für einen bestimmten Zelltyp eignen (200).

Die Kultivierung von HEK293T-Zellen war unproblematisch mit hohen, stabilen Proliferationsraten, hohen Transfektionsraten mittels PEI (zwischenzeitlich reduziert bei Mykoplasmen Kontamination) und einer einheitlichen, über die Zeit stabilen Morphologie. Auch diese Zellen waren von der Kontamination betroffen. Die Zellen im Stickstofftank waren jedoch nicht kontaminiert, sodass für alle Experimente dieselben Zellen verwendet werden konnten.



**Abbildung 15: HEK293T-Zellen Morphologie (P11):** epitheliale Zellmorphologie mit Bildung von Zellverbänden und teils Neuriten-ähnlichen, kurzen Zellausläufern (Filopodien). Aufnahmen mit Zellkulturmikroskop. P: Passage. Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$  (links) / 25  $\mu\text{m}$  (rechts: 1-4).



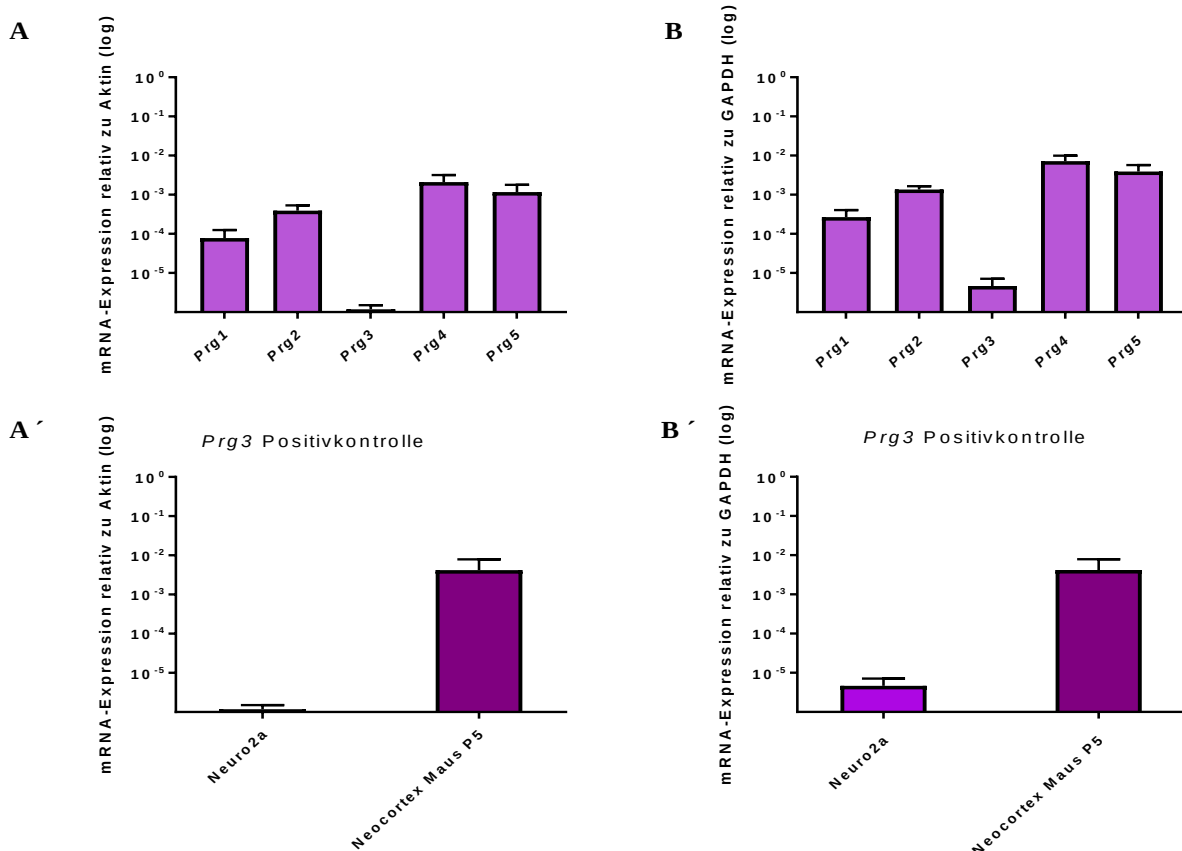
### 3.2 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden HEK293T- und Neuro2a-Zellen

Um morphologische Veränderungen induziert durch LPA in PRG-überexprimierenden Zellen beurteilen zu können, wurde zunächst die basale Morphologie infolge PRG-Überexpression ohne LPA-Stimulation untersucht. Hierbei lag der Fokus zum einen auf der subzellulären Lokalisation der Proteine, zum anderen auf der durch PRG-Überexpression induzierten Morphologie. Durch die Nutzung von HEK293T-Zellen zusätzlich zu Neuro2a-Zellen konnten die Ergebnisse mit publizierten Daten verglichen und die Funktionalität der verwendeten Plasmide getestet werden.

#### 3.2.1 Die natürliche Expression von PRGs in Neuro2a-Zellen

Zunächst wurde geprüft, ob in Neuro2a PRGs basal exprimiert werden. Dabei ist eine basale Expression für die u.g. Experimente wünschenswert, da in diesem Fall sichergestellt ist, dass die durch PRGs induzierten Signalwege eine Grundaktivität besitzen und die Proteine somit ihre Funktion in der Zelllinie erfüllen können. Da sich die Signalwege der verschiedenen PRGs überschneiden, ist eine Expression aller PRGs jedoch nicht zwingende Voraussetzung für die geplanten Experimente.

Tatsächlich konnten in Neuro2a\_1 niedrige mRNA-Expressionslevel für alle PRGs (mit einer nur sehr geringen Expression von PRG3 und höheren Expressionslevel für die anderen PRGs) nachgewiesen werden (s. **Abbildung 16**). Die höchsten Expressionslevel zeigten PRG4 und -5. Als Positivkontrolle für PRG3 (, um auszuschließen, dass eine defekte Primer-Sonde zu falschen Ergebnissen führte,) wurde murines Neocortexgewebe (P5) aus der laborinternen cDNA-Datenbank als Positivkontrolle verwendet (behördliche Anzeige s. Anhang). Im Neocortex konnte eine Expression von PRG3 (höher als in Neuro2a) nachgewiesen werden, sodass ein Versagen der Sonde ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 16: mRNA-Expression der PRGs in Neuro2a\_1:** relative mRNA-Expression normalisiert zu den Referenzgenen Aktin und GAPDH (ermittelt mit qRT-PCR). Alle PRGs (PRG3 nur sehr gering) sind in geringem Maße basal in Neuro2a exprimiert.

*Um ein Versagen der PRG3-Primer-Sonde auszuschließen, erfolgte der Nachweis von PRG3-Expression in murinem Neokortex (P5) als Positivkontrolle. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Für deskriptive Statistiken s. Anhang.  $n=3$ ,  $N\geq 6$ . **P**: postnataler Tag. **n**: Anzahl unabhängige RNA-Isolierungen. **N** = Gesamtanzahl Durchführungen der qRT-PCR (zwei technische Replikate pro biologisches Replikat). Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.*

#### 3.2.2 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden HEK293T-Zellen

Da die Morphologie von PRG-überexprimierenden HEK-Zellen mehrfach beschrieben ist, wurde diese Zelllinie verwendet, um die verwendeten Konstrukte hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und der induzierten Morphologie zu prüfen.

Bisher wurde die Lokalisation der fünf PRG-Proteine nie in den direkten Vergleich zu einem membrangebundenen Kontrollplasmid wie CFPMem gestellt. Mit einer Färbung des Aktinzytoskeletts und über einen Vergleich mit dem membrangebundenen Kontrollplasmid können jedoch auch hier (ohne Membranmarker und Untersuchungen der Kolokalisation) nur Annahmen über die Lokalisation der Konstrukte getroffen werden.

Eine Überexpression der GFP-markierten Proteine konnte durch die Fluoreszenz für alle Plasmide nachgewiesen werden (s. **Abbildung 17**), wobei die Transfektionseffizienz für CFPMem am besten und für PRG4 am schlechtesten war. CFPMem wurde als membrangebundenes Kontrollplasmid genutzt, um im Vergleich mit PRG-überexprimierenden Zellen zu beurteilen, ob diese a) eine ähnliche Fluoreszenzverteilung und damit mutmaßlich eine Lokalisation der Konstrukte in der Plasmamembran aufweisen und b) ob diese eine ähnliche Anzahl an Plasmamembranausstülpungen besitzen wie CFPMem-transfizierte Zellen.

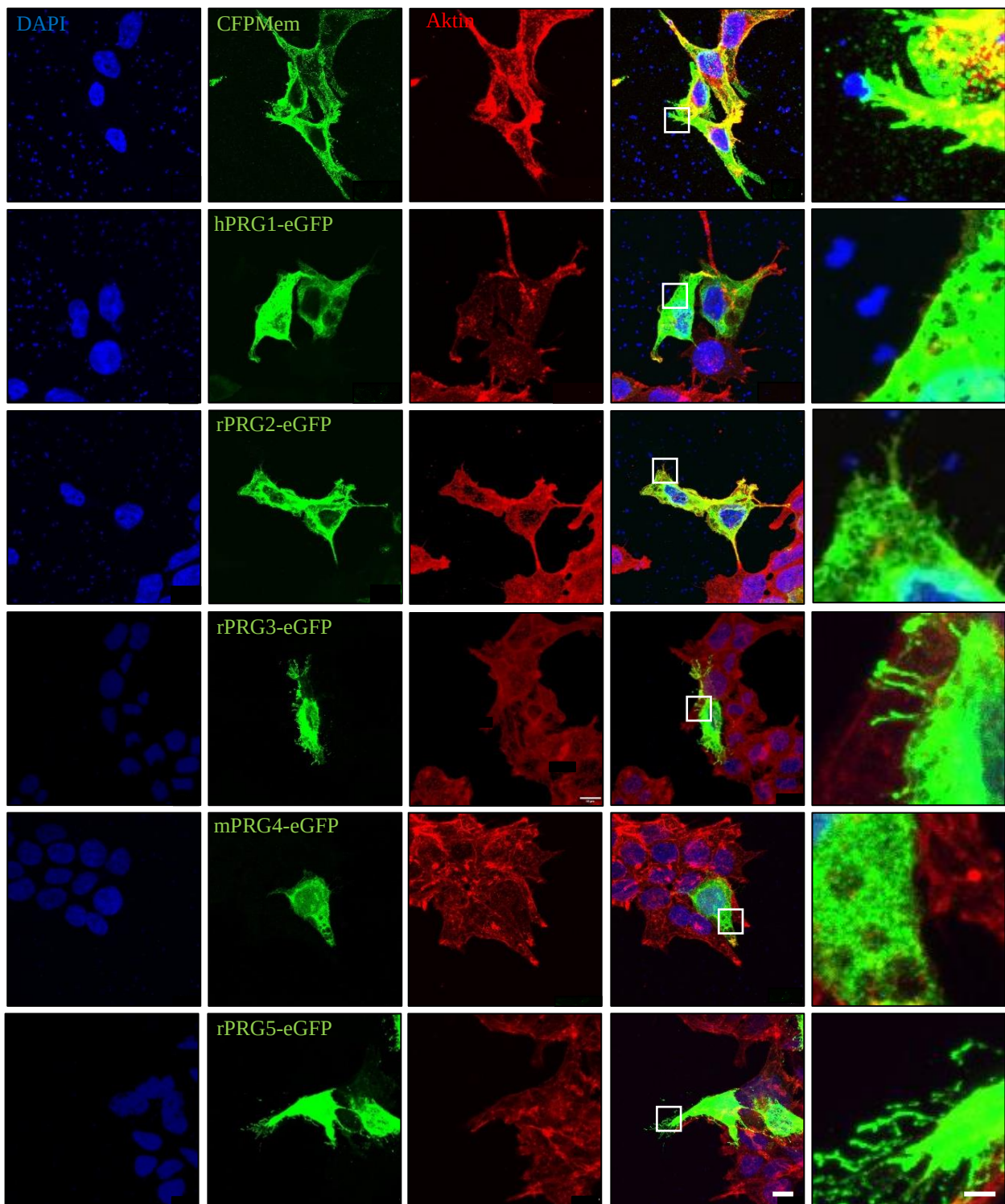
Wie erwartet zeigten PRG3- und PRG5-überexprimierende Zellen eine Fluoreszenzverteilungsmuster, welches demjenigen von CFPMem-überexprimierenden Zellen stark ähnelte. Während sich die Fluoreszenz von CFPMem vorrangig auf die Zellränder fokussierte, betraf die Fluoreszenz von PRG3 und -5 sowohl die Zellränder als auch zusätzlich Bereiche innerhalb der Somata. Daraus resultiert die Annahme, dass PRG3 und -5 ebenso wie CFPMem in der Plasmamembran sowie zusätzlich in intrazellulären Strukturen („vermutlich Membranen,“) lokalisiert sind. Eine Vermehrung der Filopodien war in PRG3/5-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu CFPMem-überexprimierenden Zellen zu erahnen, jedoch ohne Quantifizierung nicht eindeutig nachweisbar.

Für PRG2-überexprimierende Zellen ergab sich im Vergleich zu CFPMem-überexprimierenden Zellen ebenfalls die Annahme, dass dieses Protein in der Plasmamembran sowie in intrazellulären Membranen lokalisiert ist. Die Anzahl der Filopodien erschien in PRG2-überexprimierenden Zellen tendenziell geringer als in PRG3/5-exprimierenden Zellen und im Vergleich zu CFPMem-exprimierenden Zellen nicht erhöht.

PRG4-überexprimierende Zellen zeigten im Gegensatz zu den Kontrollzellen keine grün markierten Filopodien. Auch in der Betrachtung der Überlagerung von Aktin- und PRG4-Färbung wurde die Annahme gefestigt, dass PRG4 wie erwartet (33) nicht in der Plasmamembran lokalisiert ist, sondern sich vorrangig intrazellulär befindet. Ohne Membranmarker ist somit in PRG4-überexprimierenden Zellen nicht beurteilbar, ob die Anzahl der Membranausstülpungen im Vergleich zu CFPMem-transfizierten Zellen verändert ist oder nicht.

PRG1-überexprimierende Zellen zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster der (grünen) Fluoreszenz wie PRG4-überexprimierende Zellen, was einer Lokalisation des entsprechenden Konstruktes in der Plasmamembran widerspricht. Dies entsprach nicht den Erwartungen und wurde deshalb in weiteren Untersuchungen adressiert (s. 3.2.4).





**Abbildung 17: Morphologie von PRG-überexprimierenden HEK293T-Zellen:** PRG2,3 und -5 scheinen in der Plasmamembran lokalisiert zu sein. PRG3- und -5-überexprimierende Zellen zeigen tendenziell eine Vermehrung von Filopodien im Vergleich zum Kontrollplasmid CFPMem. Verwendung C-terminal GFP-markierter Konstrukte. Membrangebundenes Kontrollplasmid CFPMem. Konfokale Z-Stapel mit maximaler Z-Projektion. Laserintensität für GFP (Emission/Exzitation 520/488 nm): CFPMem 0,11 %, PRG1 0,1 %, PRG2 0,2 %, PRG3 0,14 %, PRG4 0,66 %, PRG5 0,22 %. Für die Phalloidin-Färbungen von F-Aktin wurde teilweise nachträglich die Intensität und der Kontrast mittels CellSens optimiert. Messbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$  (vergrößerte Ausschnitte: 2,5  $\mu\text{m}$ ).

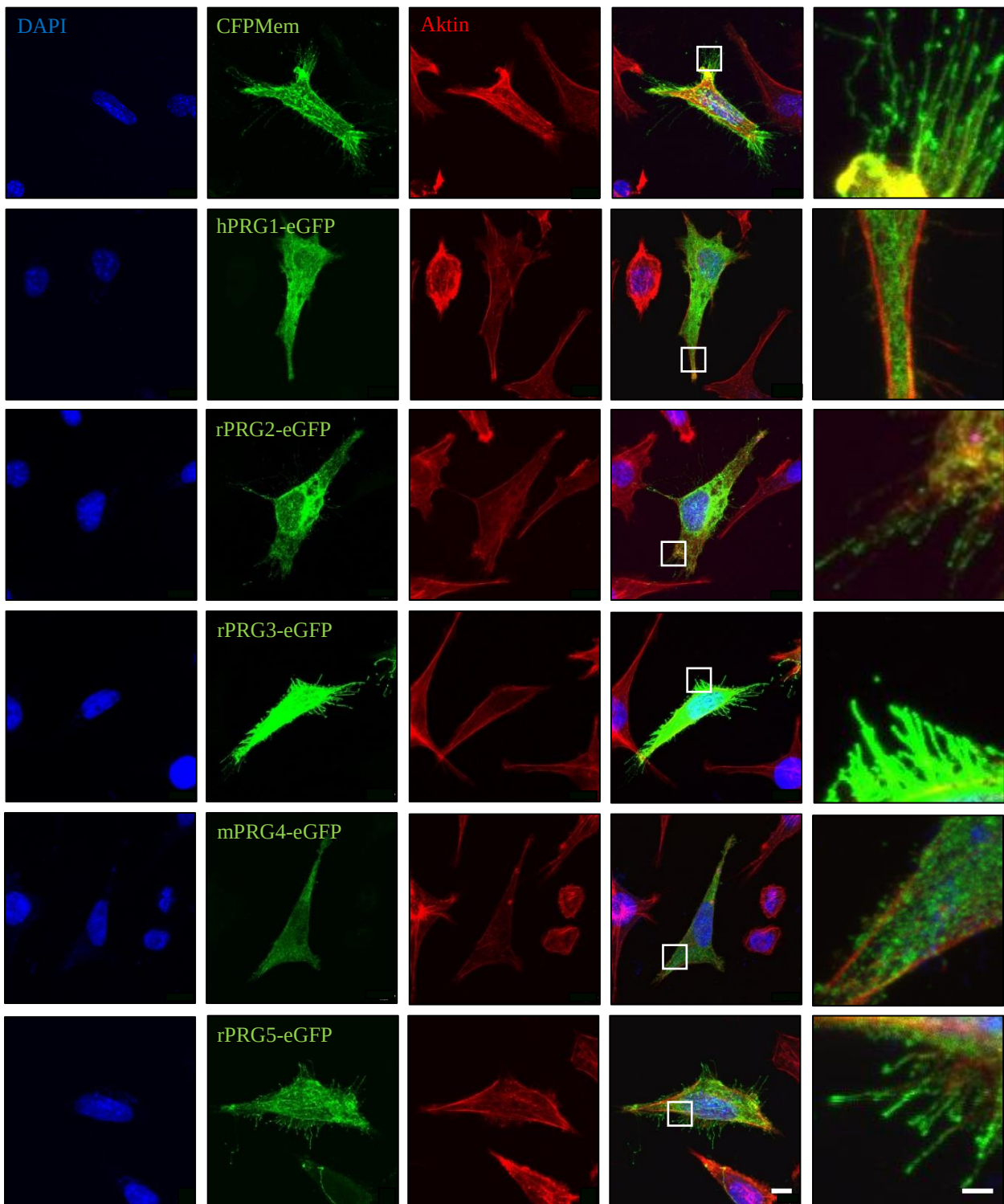
### 3.2.3 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden Neuro2a-Zellen

Anschließend wurden die entsprechenden Plasmide in undifferenzierten Neuro2a\_1-Zellen überexprimiert (s. **Abbildung 18**) und abermals die Lokalisation der PRGs und die durch deren Überexpression induzierte Morphologie mit derjenigen vom Kontrollplasmid CFPMem verglichen.

Durch Verwendung des Kontrollplasmids CFPMem wurde ersichtlich, dass (undifferenzierte) Neuro2a\_1-Zellen auch ohne PRG-Überexpression deutlich mehr zelluläre Ausläufer besitzen als HEK293T-Zellen (s. **Abbildung 18**).

Eine Lokalisation in der Plasmamembran konnte für PRG2, -3 und -5 auch in Neuro2a bestätigt werden. Eine Vermehrung der zellulären Ausläufer im Vergleich zum CFPMem transfizierten Zellen ist in undifferenzierten Neuro2a\_1 für keines der PRGs ohne Quantifizierung erkennbar. PRG4 zeigte sich, wie auch in HEK293T-Zellen, vorrangig intrazellulär lokalisiert.

Für PRG1 konnte eine Lokalisation in der Plasmamembran und deren Ausstülpungen auch in Neuro2a\_1 nicht bestätigt werden. Aufgrund dessen erfolgte ein Vergleich der Lokalisation und des Phänotyps von Neuro2a- und HEK293T-Zellen mit Überexpression verschiedener PRG1-Konstrukte sowie eine Sequenzierung der verwendeten Plasmide und ein Alignment mit den zur Verfügung stehenden Referenzsequenzen (s. 3.2.4).

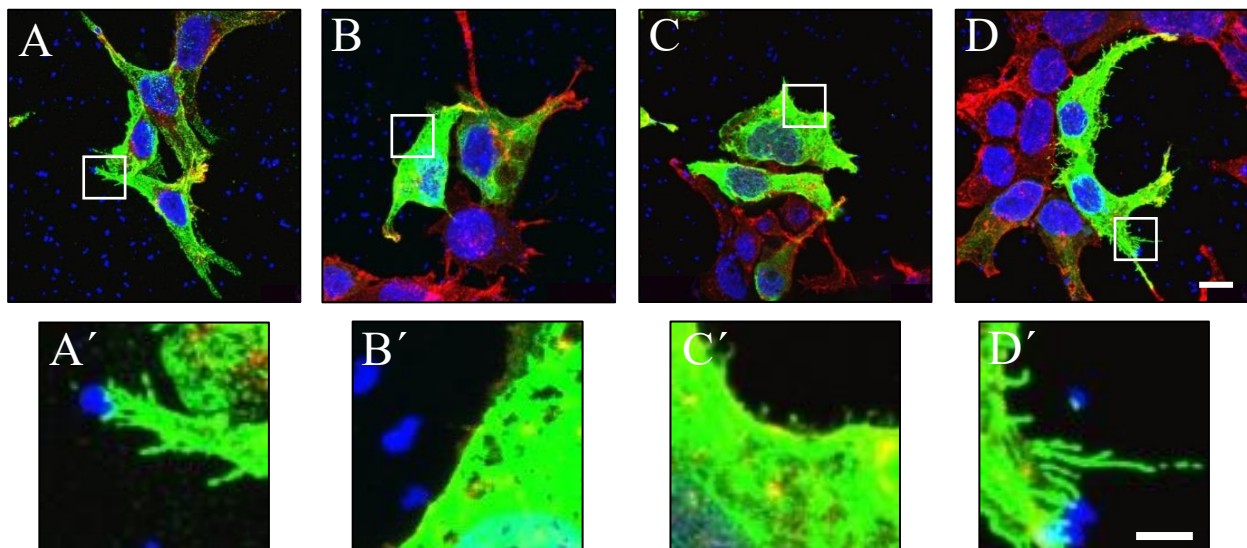


**Abbildung 18: Morphologie von PRG-überexprimierenden Neuro2a\_1-Zellen:** PRG2,3 und -5 zeigen sich im Vergleich zum Kontrollplasmid CFPMem in der Plasmamembran und ihren Ausstülpungen lokalisiert, wobei PRG4 und -1 nicht in dieser lokalisiert zu sein scheinen. Eine Erhöhung der Anzahl an Filopodien durch PRG-Überexpression im Vergleich zum Kontrollplasmid ist ohne Quantifizierung nicht nachweisbar. Konfokale Z-Stapel mit maximaler Z-Projektion. Laserintensität für GFP (Emission/Exzitation 520/488 nm): CFPMem 0,28 %, PRG1 0,34 %, PRG2 0,42 %, PRG3 0,37 %, PRG4 0,5 %, PRG5 0,19 %. Für die Phalloidin-Färbungen von F-Aktin wurde teilweise nachträglich die Intensität und der Kontrast mittels CellSens optimiert. Messbalken entsprechen 10 µm (vergrößerte Ausschnitte: 2,5 µm).

### 3.2.4 Die Morphologie von HEK293T- und Neuro2a-Zellen mit Überexpression verschiedener PRG1-Plasmide

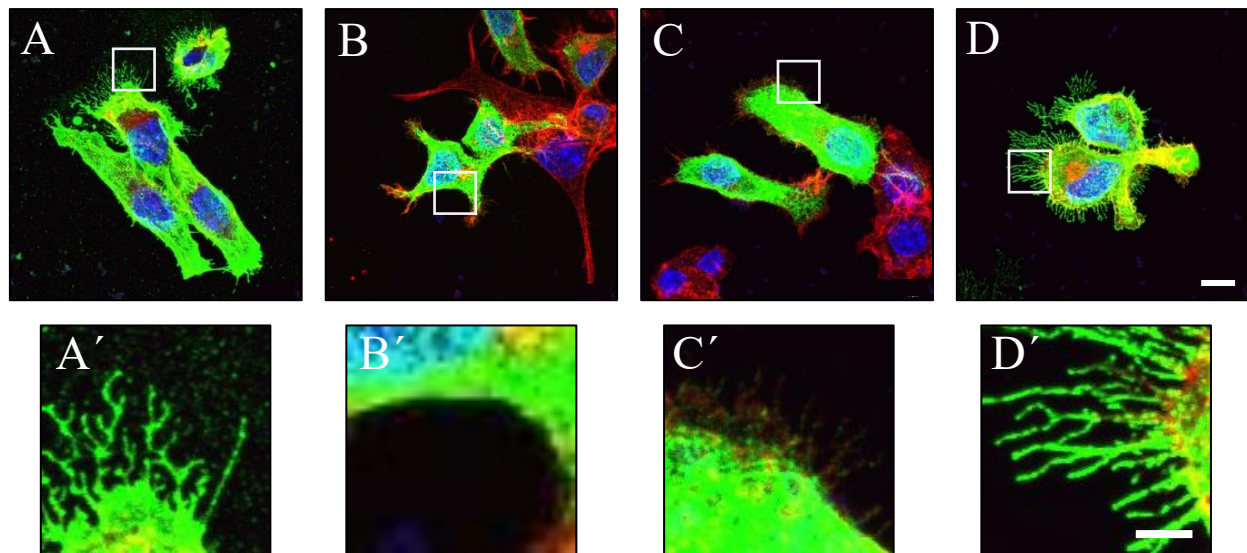
Aufgrund der in der Literatur verbreiteten Annahme, alle PRGs bis auf PRG4 seien in der Plasmamembran lokalisiert (s. u.a. Review (25)) war das Ergebnis, dass das verwendete hPRG1-eGFP-Konstrukt scheinbar nicht in der Plasmamembran lokalisiert war, irritierend. Um dieser Beobachtung nachzugehen, wurden die immunzytochemischen Färbungen in HEK293T- und (undifferenzierten) Neuro2a\_2-Zellen nach der Transfektion mit zwei weiteren *Prg1*-Plasmiden wiederholt und die Lokalisation der Proteine erneut im Vergleich zu CFPMem beurteilt (s. **Abbildung 19**, **Abbildung 20**).

Erstaunlicherweise konnte für beide hPRG1-beinhaltenen Konstrukte hPRG1-eGFP (c-terminale GFP-Markierung) und GFP-hPRG1 (n-terminale GFP-Markierung) im Vergleich zu CFPMem keine Lokalisation in der Plasmamembran und ihren Ausstülpungen nachgewiesen werden. Hingegen zeigte das Konstrukt mPRG1-eGFP ein mit CFPMem vergleichbares Verteilungsverhalten und damit eine Lokalisation in/nah der Membran. Zudem schien im direkten Vergleich zu den Kontrollzellen (sowohl in HEK- als auch in Neuro2a-Zellen) die Anzahl und Länge der Filopodien von mPRG1-eGFP-überexprimierenden Zellen erhöht zu sein (keine Quantifizierung erfolgt).



**Abbildung 19: Verschiedene PRG1-Konstrukte in HEK293T-Zellen:** A/A': CFPMem, B/B': hPRG1-eGFP, C/C': eGFP-hPRG1, D/D': mPRG1-eGFP. Nur mPRG1-eGFP (D) zeigt eine deutliche Expression in der Plasmamembran und ihren Ausläufern im Vergleich zum Kontrollplasmid CFPMem. Konfokale Z-Stapel mit maximaler Z-Projektion. Laserintensität für GFP (Emission/Exzitation 520/488 nm): CFPMem 0,28 %, hPRG1-eGFP 0,29 %, eGFP-hPRG1 0,08 %, mPRG1-eGFP 0,2 %. Grün: GFP/CFP, Rot: F-Aktin, Blau: DAPI. Messbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$  (vergrößerte Ausschnitte: 2,5  $\mu\text{m}$ ).





**Abbildung 20:** Verschiedene PRG1-Konstrukte in Neuro2a\_2-Zellen: A/A': CFPMem, B/B': hPRG1-eGFP, C/C': eGFP-hPRG1, D/D': mPRG1-eGFP. Nur mPRG1-eGFP (D) zeigt eine deutliche Expression in der Plasmamembran und ihren Ausläufern im Vergleich zum Kontrollplasmid CFPMem. Kultivierung der undifferenzierten Neuro2a\_2-Zellen in Medium mit Serum. Konfokale Z-Stapel mit maximaler Z-Projektion. Laserintensität für GFP (Emission/Exzitation 520/488 nm): CFPMem 0,24 %, hPRG1-eGFP 0,41 %, eGFP-hPRG1 0,26 %, mPRG1-eGFP 0,2 %. Grün: GFP/CFP. Rot: F-Aktin. Blau: DAPI. Messbalken entsprechen 10 µm (vergrößerte Ausschnitte: 2,5 µm).

### 3.2.4.1 Alignment der Sequenzen der verschiedenen PRG1-Plasmide

Um der Ursache dieser unerwarteten Beobachtung auf den Grund zu gehen, wurde die DNA der verwendeten Plasmide sequenziert (durch Eurofins (s. 2.1.3/2.1.6)). Die DNA-Sequenzen wurden mittels der Expasy-Software (s. 2.1.3) in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und diese mit den veröffentlichten Referenzsequenzen (UniProt (201)) verglichen (s. **Abbildung 21**). Während die Sequenz des verwendeten mPRG1-Konstruktes mit der Referenzsequenz identisch war, zeigten die Aminosäuresequenzen der hPRG1-Konstrukte an zwei Stellen Aminosäuremutationen (an Stelle 109 Serin (S) zu Guanin (G) sowie an Stelle 222 Cystein (C) zu Tyrosin (Y)) (rot markiert in **Abbildung 21**). Während Glycin und Serin verwandte chemische Strukturen besitzen, sodass die Proteinstruktur durch diese Mutation vermutlich nicht wesentlich beeinflusst wird, ist das normalerweise an Stelle 222 enthaltene Cystein an einer Disulfidbrücke beteiligt (s. **Abbildung 22**), die nach Austausch zu Tyrosin (, welches keine Thiolgruppe besitzt,) nicht mehr zustande kommen kann. Diese Aminosäuremutation hat somit mutmaßlich zur Folge, dass das Protein nicht richtig gefaltet werden kann, intrazellulär aggregiert und nicht zur Plasmamembran transportiert werden kann. Die Sequenzierungsergebnisse bieten somit eine Erklärung für die irritierenden Beobachtungen.

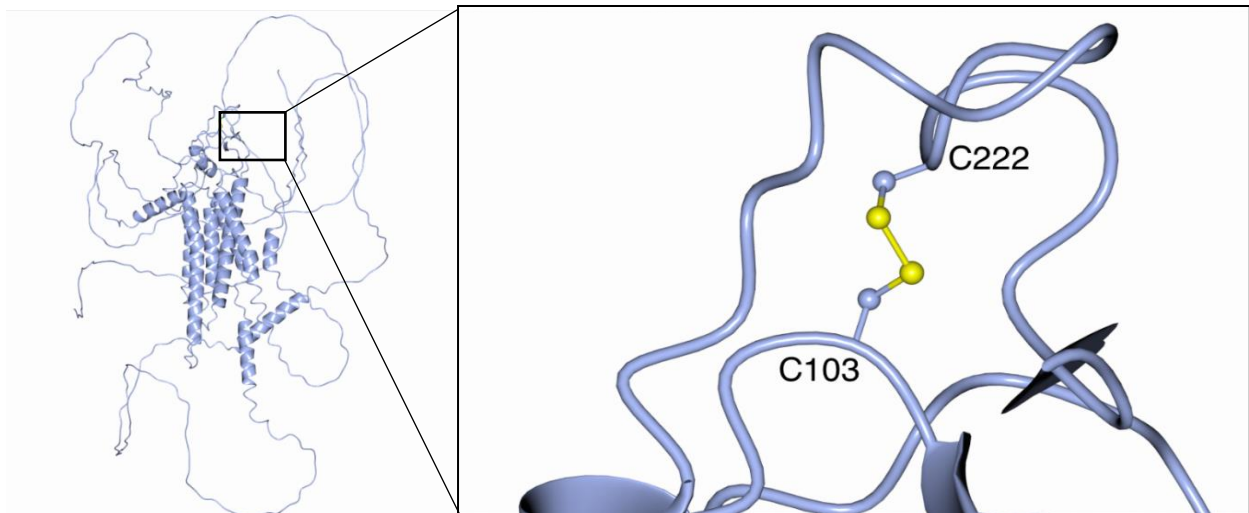
|            |                                                              |     |
|------------|--------------------------------------------------------------|-----|
| mPRG1      | MQRAGSSGARGECDISGAGRLRLEQAARLGGRVHTSPGGGLGARQAAGMSAKERPKGKV  | 60  |
| mPRG1-eGFP | MQRAGSSGARGECDISGAGRLRLEQAARLGGRVHTSPGGGLGARQAAGMSAKERPKGKV  | 60  |
| hPRG1      | MQRAGSSGGRGECDISGAGRLGLEEAARLSC-AVHTSPGGGRRPGQAAGMSAKERPKGKV | 59  |
| hPRG1-eGFP | MQRAGSSGGRGECDISGAGRLGLEEAARLSC-AVHTSPGGGRRPGQAAGMSAKERPKGKV | 59  |
| eGFP-hPRG1 | MQRAGSSGGRGECDISGAGRLGLEEAARLSC-AVHTSPGGGRRPGQAAGMSAKERPKGKV | 59  |
| mPRG1      | IKDSVTLLPCFYFVELPILASSVVSPLYFLELTDVFKPVHSGFSCYDRSLSPYIEPTQEA | 120 |
| mPRG1-eGFP | IKDSVTLLPCFYFVELPILASSVVSPLYFLELTDVFKPVHSGFSCYDRSLSPYIEPTQEA | 120 |
| hPRG1      | IKDSVTLLPCFYFVELPILASSVVSPLYFLELTDVFKPVHSGFSCYDRSLSPYIEPTQEA | 119 |
| hPRG1-eGFP | IKDSVTLLPCFYFVELPILASSVVSPLYFLELTDVFKPVHSGFSCYDRSLSPYIEPTQEA | 119 |
| eGFP-hPRG1 | IKDSVTLLPCFYFVELPILASSVVSPLYFLELTDVFKPVHSGFSCYDRSLSPYIEPTQEA | 119 |

### 3 Ergebnisse

|              |                                                                                               |     |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>mPRG1</b> | <b>IPFLMLLSLAFAGPAITIMVGEGILYCCLSKRRNGAGLEPNINAGGCNFSFLRAVRV</b>                              | 180 |
| mPRG1-eGFP   | <b>IPFLMLLSLAFAGPAITIMVGEGILYCCLSKRRNGAGLEPNINAGGCNFSFLRAVRV</b>                              | 180 |
| <b>hPRG1</b> | <b>IPFLMLLSLAFAGPAITIMVGEGILYCCLSKRRNG</b> VGLEPNINAGGCNFSFLRAVRV                             | 179 |
| hPRG1-eGFP   | <b>IPFLMLLSLAFAGPAITIMVGEGILYCCLSKRRNG</b> VGLEPNINAGGCNFSFLRAVRV                             | 179 |
| eGFP-hPRG1   | <b>IPFLMLLSLAFAGPAITIMVGEGILYCCLSKRRNG</b> VGLEPNINAGGCNFSFLRAVRV                             | 179 |
| <b>mPRG1</b> | <b>GVHVFGLCSTALITDIIQLSTGYQAPYFLTVCCKPNYTSLNVSCKENSYIVEDICSGSDLT</b>                          | 240 |
| mPRG1-eGFP   | <b>GVHVFGLCSTALITDIIQLSTGYQAPYFLTVCCKPNYTSLNVSCKENSYIVEDICSGSDLT</b>                          | 240 |
| <b>hPRG1</b> | <b>GVHVFGLCSTALITDIIQLSTGYQAPYFLTVCCKPNYTSLNVS</b> CKENSYIVEDICSGSDLT                         | 239 |
| hPRG1-eGFP   | <b>GVHVFGLCSTALITDIIQLSTGYQAPYFLTVCCKPNYTSLNVS</b> CKENSYIVEDICSGSDLT                         | 239 |
| eGFP-hPRG1   | <b>GVHVFGLCSTALITDIIQLSTGYQAPYFLTVCCKPNYTSLNVS</b> CKENSYIVEDICSGSDLT                         | 239 |
| <b>mPRG1</b> | <b>VINSGRKSFPSQHATLAFAAVVSMYFNSTLTDSSKLLKPLLVTFFIICGIICGLTRIT</b>                             | 300 |
| mPRG1-eGFP   | <b>VINSGRKSFPSQHATLAFAAVVSMYFNSTLTDSSKLLKPLLVTFFIICGIICGLTRIT</b>                             | 300 |
| <b>hPRG1</b> | VINSGRK <b>SFPSQHATLAFAAVVSMYFNSTLTDSSKLLKPLLVTFFIICGIICGLTRIT</b>                            | 299 |
| hPRG1-eGFP   | VINSGRK <b>SFPSQHATLAFAAVVSMYFNSTLTDSSKLLKPLLVTFFIICGIICGLTRIT</b>                            | 299 |
| eGFP-hPRG1   | VINSGRK <b>SFPSQHATLAFAAVVSMYFNSTLTDSSKLLKPLLVTFFIICGIICGLTRIT</b>                            | 299 |
| <b>mPRG1</b> | <b>QYKNHPVDVYCGFLIGGGIALYLGLYAVGNFLPSEDSMLQHRDALRSLTDLNQDPSRVLS</b>                           | 360 |
| mPRG1-eGFP   | <b>QYKNHPVDVYCGFLIGGGIALYLGLYAVGNFLPSEDSMLQHRDALRSLTDLNQDPSRVLS</b>                           | 360 |
| <b>hPRG1</b> | QYKNHPVD <b>VYCGFLIGGGIALYLGLYAVGNFLPS</b> DESM <b>F</b> QHRDALRSLTDLNQD <b>PNRL</b> LS       | 359 |
| hPRG1-eGFP   | QYKNHPVD <b>VYCGFLIGGGIALYLGLYAVGNFLPS</b> DESM <b>F</b> QHRDALRSLTDLNQD <b>PNRL</b> LS       | 359 |
| eGFP-hPRG1   | QYKNHPVD <b>VYCGFLIGGGIALYLGLYAVGNFLPS</b> DESM <b>F</b> QHRDALRSLTDLNQD <b>PNRL</b> LS       | 359 |
| <b>mPRG1</b> | <b>AKNGSSGDGIAHTEGILNRNHRDASSLTNLKRANADVEIITPRSPMGKESMVTFSNTLPR</b>                           | 420 |
| mPRG1-eGFP   | <b>AKNGSSGDGIAHTEGILNRNHRDASSLTNLKRANADVEIITPRSPMGKESMVTFSNTLPR</b>                           | 420 |
| <b>hPRG1</b> | AKNGSS <b>S</b> DGIAHTEGILNRNHRDASSLTNLKRANADVEIITPRSPMGKE <b>N</b> MVTFSNTLPR                | 419 |
| hPRG1-eGFP   | AKNGSS <b>S</b> DGIAHTEGILNRNHRDASSLTNLKRANADVEIITPRSPMGKE <b>N</b> MVTFSNTLPR                | 419 |
| eGFP-hPRG1   | AKNGSS <b>S</b> DGIAHTEGILNRNHRDASSLTNLKRANADVEIITPRSPMGKE <b>N</b> MVTFSNTLPR                | 419 |
| <b>mPRG1</b> | <b>ANTPSVEDPVRNASIHASMDSARSKQLLTQWKSKNESRKMSLQVMDTEPEGQSPPRSIE</b>                            | 480 |
| mPRG1-eGFP   | <b>ANTPSVEDPVRNASIHASMDSARSKQLLTQWKSKNESRKMSLQVMDTEPEGQSPPRSIE</b>                            | 480 |
| <b>hPRG1</b> | ANTPSVEDPVRNASIHASMDSARSKQLLTQW <b>K</b> KNESRK <b>L</b> SLQV <b>IE</b> EP <b>-</b> GQSPPRSIE | 478 |
| hPRG1-eGFP   | ANTPSVEDPVRNASIHASMDSARSKQLLTQW <b>K</b> KNESRK <b>L</b> SLQV <b>IE</b> EP <b>-</b> GQSPPRSIE | 478 |
| eGFP-hPRG1   | ANTPSVEDPVRNASIHASMDSARSKQLLTQW <b>K</b> KNESRK <b>L</b> SLQV <b>IE</b> EP <b>-</b> GQSPPRSIE | 478 |
| <b>mPRG1</b> | <b>MRSSEPSRVGVNGDHHVPGNQYLKIQPGTVPGCNNSMPGGPRVSIQSRPGSSQLVHIPE</b>                            | 540 |
| mPRG1-eGFP   | <b>MRSSEPSRVGVNGDHHVPGNQYLKIQPGTVPGCNNSMPGGPRVSIQSRPGSSQLVHIPE</b>                            | 540 |
| <b>hPRG1</b> | MRSSEPSRVGVNGDHHGPGNQYLKI <b>Q</b> PG <b>A</b> VPGCNNSMPGGPRVSIQSRPGSSQLVHIPE                 | 538 |
| hPRG1-eGFP   | MRSSEPSRVGVNGDHHGPGNQYLKI <b>Q</b> PG <b>A</b> VPGCNNSMPGGPRVSIQSRPGSSQLVHIPE                 | 538 |
| eGFP-hPRG1   | MRSSEPSRVGVNGDHHGPGNQYLKI <b>Q</b> PG <b>A</b> VPGCNNSMPGGPRVSIQSRPGSSQLVHIPE                 | 538 |
| <b>mPRG1</b> | <b>ETQENISTSPKSSSARAKWLKAAEKTACNRSNNQPRIMQVIAMSKQQGVLQSSPKNAEG</b>                            | 600 |
| mPRG1-eGFP   | <b>ETQENISTSPKSSSARAKWLKAAEKTACNRSNNQPRIMQVIAMSKQQGVLQSSPKNAEG</b>                            | 600 |
| <b>hPRG1</b> | ETQENISTSPKSSSARAKWLKAAEKTACNRSNSQPRIMQVIAMSKQQGVLQSSPKNTEG                                   | 598 |
| hPRG1-eGFP   | ETQENISTSPKSSSARAKWLKAAEKTACNRSNSQPRIMQVIAMSKQQGVLQSSPKNTEG                                   | 598 |
| eGFP-hPRG1   | ETQENISTSPKSSSARAKWLKAAEKTACNRSNSQPRIMQVIAMSKQQGVLQSSPKNTEG                                   | 598 |
| <b>mPRG1</b> | <b>STVTCTGSIRYKTLTDHEPSGIVRVEAHPENNRPIIQIPSSTEGEGSGSWKKAPEKSSI</b>                            | 660 |
| mPRG1-eGFP   | <b>STVTCTGSIRYKTLTDHEPSGIVRVEAHPENNRPIIQIPSSTEGEGSGSWKKAPEKSSI</b>                            | 660 |
| <b>hPRG1</b> | STVSCTGSIRYKTLTDHEPSGIVRVEAHPENNRPIIQIP <b>S</b> -TEGEGSGSWKKAPEK <b>G</b> SL                 | 657 |
| hPRG1-eGFP   | STVSCTGSIRYKTLTDHEPSGIVRVEAHPENNRPIIQIP <b>S</b> -TEGEGSGSWKKAPEK <b>G</b> SL                 | 657 |
| eGFP-hPRG1   | STVSCTGSIRYKTLTDHEPSGIVRVEAHPENNRPIIQIP <b>S</b> -TEGEGSGSWKKAPEK <b>G</b> SL                 | 657 |

|              |                                                              |     |
|--------------|--------------------------------------------------------------|-----|
| <b>mPRG1</b> | RQTYELNDLNRDSESCESLKDSFGSGDRKRSNIDSNEHHHHGITTIRVTPVEGSEIGSET | 720 |
| mPRG1-eGFP   | RQTYELNDLNRDSESCESLKDSFGSGDRKRSNIDSNEHHHHGITTIRVTPVEGSEIGSET | 720 |
| <b>hPRG1</b> | RQTYELNDLNRDSESCESLKDSFGSGDRKRSNIDSNEHHHHGITTIRVTPVEGSEIGSET | 717 |
| hPRG1-eGFP   | RQTYELNDLNRDSESCESLKDSFGSGDRKRSNIDSNEHHHHGITTIRVTPVEGSEIGSET | 717 |
| eGFP-hPRG1   | RQTYELNDLNRDSESCESLKDSFGSGDRKRSNIDSNEHHHHGITTIRVTPVEGSEIGSET | 717 |
| <b>mPRG1</b> | LSVSSSRDSTLRRKGNIIILIPERSNSPENTRNIFYKGTSPTRAYKD              | 766 |
| mPRG1-eGFP   | LSVSSSRDSTLRRKGNIIILIPERSNSPENTRNIFYKGTSPTRAYKD              | 766 |
| <b>hPRG1</b> | LS <b>T</b> SSSRDSTLRRKGNIIILIPERSNSPENTRNIFYKGTSPTRAYKD     | 763 |
| hPRG1-eGFP   | LS <b>T</b> SSSRDSTLRRKGNIIILIPERSNSPENTRNIFYKGTSPTRAYKD     | 763 |
| eGFP-hPRG1   | LS <b>T</b> SSSRDSTLRRKGNIIILIPERSNSPENTRNIFYKGTSPTRAYKD     | 763 |

**Abbildung 21: Alignment der Aminosäuresequenzen der verwendeten PRG1-Konstrukte mit Referenzsequenzen:** In der Aminosäuresequenz von hPRG1-eGFP und eGFP-hPRG1 zeigen sich zwei Mutationen. Der Austausch von Cystein geht höchstwahrscheinlich mit einer fehlenden Ausbildung einer dortigen Disulfidbrücke und mit einer gestörten Faltung des Proteins einher, sodass das Konstrukt nicht zur Plasmamembran transportiert werden kann. Verwendete Plasmide: peGFP-N1-mPrg1, peGFP-N1-hPrg1 und peGFP-C1-mPrg1. **Blau** markiert sind die (identischen) Sequenzen von mPRG1-Referenzsequenz und Konstrukt. **Gelb** sind abweichende Sequenzen von hPRG1 markiert, welche in Referenzsequenz und den verwendeten Konstrukten identisch vorkommen. **Rot** sind die Mutationen in den verwendeten hPRG1-Konstrukten markiert (Glycin statt Serin an Stelle 118 und Tyrosin statt Cystein an Stelle 222). **Grün** markiert sind die in der Referenzsequenz an diesen Stellen vorkommenden Aminosäuren. **Fett gedruckt** sind die Transmembranomänen (s. UniProt). Damit liegen die Mutationen in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife. Die DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide (Sequenzierung mittels Eurofins) wurden in Aminosäuresequenzen umgeschrieben (mithilfe von Expasy) und die Gesamtsequenz mittels Zusammenfügen der zwei erhaltenen Sequenzen (bei Verwendung von Forward- und Reverse-Primer) ermittelt. Das Alignment von erhaltenen Sequenzen und Referenzsequenzen wurde mittels UniProt erstellt (Referenzsequenzen von UniProt: UniProt ID Q7Z2D5 für hPRG1 und Q7TME0 für mPRG1). Modifizierte Abbildung basierend auf dem Alignment von UniProt (s. 2.1.3).

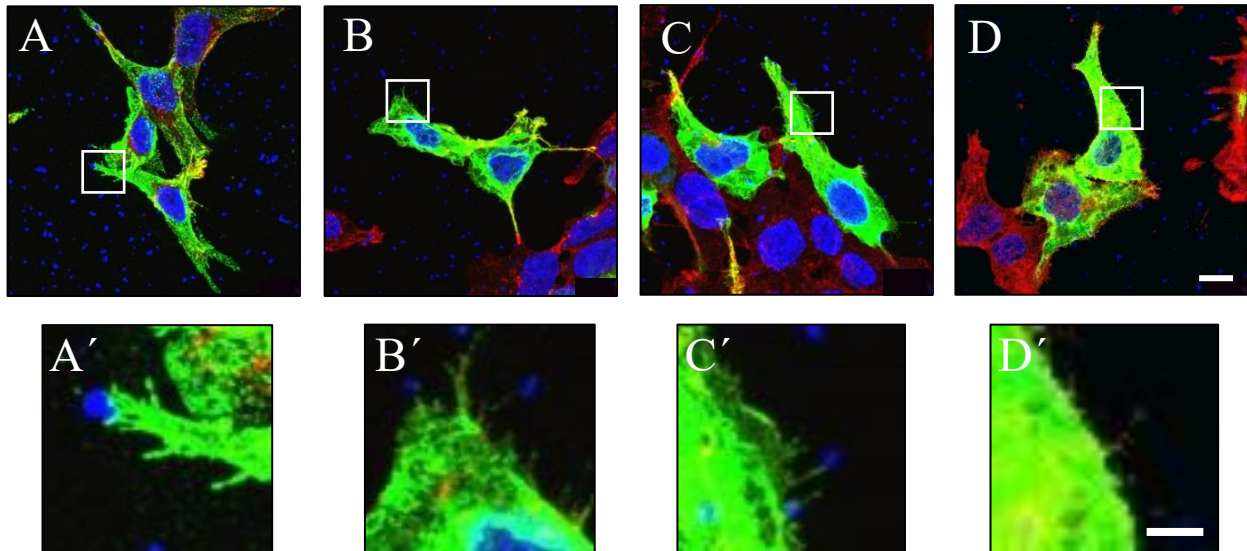


**Abbildung 22: Strukturvorhersage von PRG1 und Disulfidbrücke in zweiter extrazellulärer Schleife:** Da Cystein an der Stelle 222 in den verwendeten hPRG1-Konstrukten zu Tyrosin mutiert ist, kann an dieser Stelle keine Disulfidbrücke mehr ausgebildet werden. Dies stört vermutlich die Faltung des Proteins, sodass es nicht mehr zur Plasmamembran transportiert werden kann. Basierend auf AlphaFold. Abbildung kreiert mittels CCP4mg, freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Dr. Jens Hausmann.

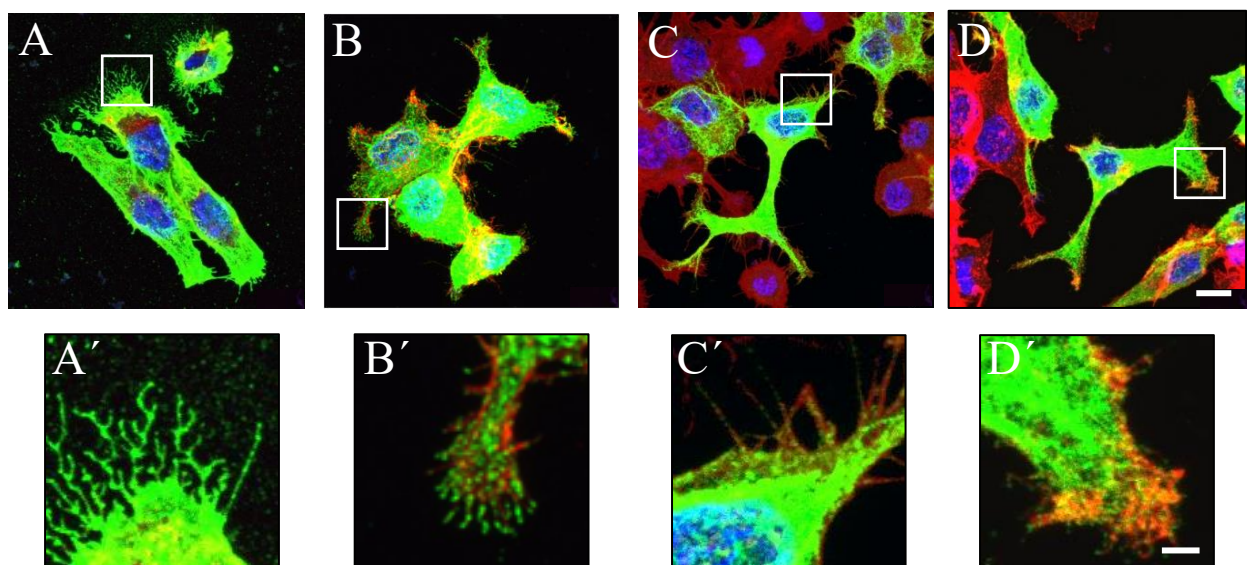
### 3.2.5 Die Morphologie von HEK293T- und Neuro2a-Zellen mit Überexpression verschiedener PRG2-Plasmide

Da für u.g. Lebendzellmikroskopie-Experimente verschiedene PRG2-Plasmide verwendet wurden, wurde ein immunzytochemischer Vergleich der Lokalisation und der induzierten Morphologie durchgeführt (s. **Abbildung 23** und **Abbildung 24**).

Ebenso wie rPRG2-eGFP scheint auch eGFP-rPRG2 im Vergleich zu CFPMem in der Plasmamembran und ihren Ausstülpungen lokalisiert zu sein. Im direkten Vergleich zu CFPMem erschien jedoch der Anteil des in der Plasmamembran lokalisierten Proteins in PRG2-überexprimierenden Zellen geringer zu sein. Dies spricht dafür, dass nur ein Teil der PRG2-Proteine in die Plasmamembran transportiert wird und ein Teil der Proteine intrazellulär (möglicherweise innerhalb intrazellulärer Membranen) verbleibt. Für das C-terminal-trunkierte Konstrukt konnte dagegen kein Nachweis in der Plasmamembran und deren Ausstülpungen erbracht werden. Ein Einfluss der PRG2-Konstrukte auf Filopodienanzahl und -länge war ohne Quantifizierung nicht erkennbar.



**Abbildung 23: Verschiedene PRG2-Konstrukte in HEK293T-Zellen:** A/A': CFPMem, B/B': rPRG2-eGFP, C/C': eGFP-rPRG2, D/D': eGFP-rPRG2-ΔC. Die PRG2-Konstrukte erscheinen im Vergleich zu CFPMem reduziert in der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Die trunkierte Version von PRG2 ist kaum in zellulären Membranausstülpungen nachweisbar. Konfokale Z-Stapel mit maximaler Z-Projektion. Laserintensität für GFP (Emission/Exzitation 520/488 nm): CFPMem 0,28 %, rPRG2-eGFP 0,11 %, eGFP-rPRG2 0,2 %, eGFP-rPRG2-ΔC 0,18 %. Grün: GFP/CFP. Rot: F-Aktin. Blau: DAPI. Für die Phalloidin-Färbungen von F-Aktin wurde teilweise nachträglich die Intensität und der Kontrast mittels CellSens optimiert. Messbalken entsprechen 10 µm (vergrößerte Ausschnitte: 2,5 µm).



**Abbildung 24: Verschiedene PRG2-Konstrukte in undifferenzierten Neuro2a\_2-Zellen:** A: CFPMem, B: rPRG2-eGFP, C: eGFP-rPRG2, D: eGFP-rPRG2-ΔC. Erklärung s. Text. Konfokale Z-Stapel mit maximaler Z-Projektion. Laserintensität für GFP (Emission/Exzitation 520/488 nm): CFPMem 0,24 %, hPRG2-eGFP 0,7 %, eGFP-hPRG2 0,24 %, mPRG2-eGFP 0,4 %. Grün: GFP/CFP. Rot: F-Aktin. Blau: DAPI. Für die Phalloidin-Färbungen von F-Aktin wurde teils (C) der Kontrast optimiert (CellSens). Messbalken entsprechen 10 µm (vergrößerte Ausschnitte: 2,5 µm).



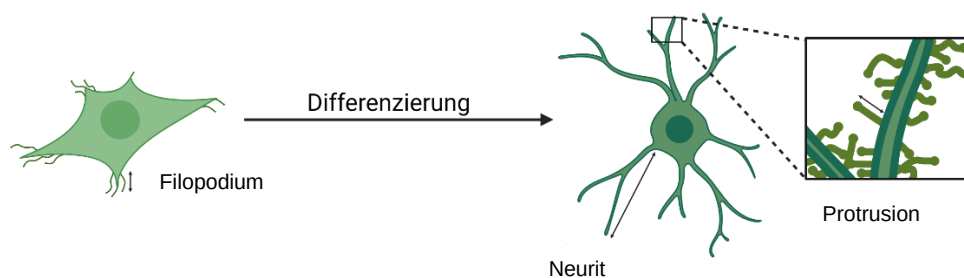
Mittels Sequenzierung wurde sichergestellt, dass keine Aminosäuremutationen in den verwendeten PRG2-Plasmiden vorliegen, welche Faltung und Lokalisation der Proteine beeinflussen könnten (s. **Abbildung 50**, Anhang).

### 3.2.6 Neuriten und Protrusionen in PRG-überexprimierenden, differenzierten Neuro2a\_2-Zellen

Da bekannt ist, dass PRG2 und -3 an der Ausbildung und Verzweigung von zellulären Ausläufern neuronaler Zellen beteiligt sind (s. 1.4.2), und in dieser Arbeit untersucht wurde, ob PRG2 ebenso wie PRG3 in der Lage ist, den LPA-induzierten Neuritenkollaps zu verringern, stellte sich die Frage, inwiefern schon vor Beginn bzw. unabhängig von jeglicher (LPA-)Behandlung Auswirkungen der Überexpression auf Anzahl und/oder Länge der zellulären Fortsätze bestehen. Dieser Frage wurde mittels morphologischer Analysen einschließlich Quantifizierungen der Neuriten/Protrusionen differenzierter Neuro2a\_2 (infolge Kultivierung in serumfreiem Medium analog zu den u.g. LPA-Experimenten) anhand von immunzytochemischen Färbungen nachgegangen.

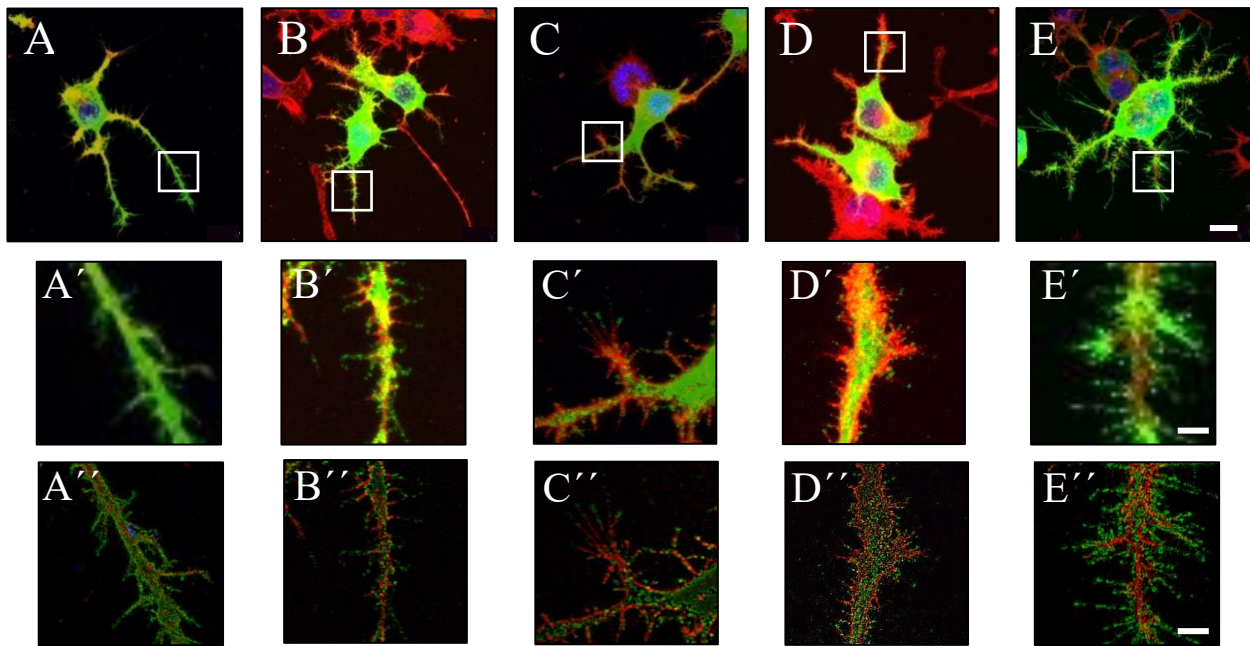
#### 3.2.6.1 Die Morphologie von PRG2/3-überexprimierenden, differenzierten Neuro2a\_2-Zellen

Differenzierte Neuro2a\_2-Zellen unterscheiden sich von undifferenzierten Neuro2a\_1/2 Zellen dadurch, dass sie längere, sich verzweigende zelluläre Ausstülpungen besitzen (sog. Neuriten) (s. **Abbildung 25**). Bei genauerer Betrachtung zeigen die Neuriten zahlreiche kleine Ausstülpungen der Plasmamembran, welche hier als Protrusionen bezeichnet werden.



**Abbildung 25: Schematische Darstellung der Differenzierung von Neuro2a-Zellen und die Benennung der zellulären Fortsätze:** Undifferenzierte Neuro2a-Zellen besitzen keine Neuriten, sondern nur kürzere zelluläre Ausläufer (Filopodien). Nach Kultivierung in serumfreiem Medium differenzieren Neuro2a\_2-Zellen und bilden Neuriten, welche bei näherer Betrachtung zahlreiche kleine Ausstülpungen der Membran zeigen (genannt Protrusionen). Abbildung erstellt mit BioRender.com

Auch in den differenzierten Zellen wurde zunächst die Lokalisation der verwendeten PRG2/3-Konstrukte überprüft. Für PRG3 konnte im Vergleich zu CFPMem die Lokalisation in der Plasmamembran einschließlich der Membran der Neuriten und den davon ausgehenden Protrusionen bestätigt werden (s. **Abbildung 26**, E/E'/E''). Die PRG2-Konstrukte zeigten ein etwas anderes Lokalisationsmuster (s. **Abbildung 26**, B/B'/B'', C/C'/C''): Ebenso wie CFPMem und PRG3 zeigten sich die PRG2-Konstrukte sowohl im Soma als auch in den Neuriten lokalisiert (B/C), doch war eine Lokalisation in der Plasmamembran nicht deutlich erkennbar (B'/C'). Es entsteht der Eindruck, das Protein könnte in Strukturen direkt unterhalb der Plasmamembran lokalisiert sein. In den Protrusionen schienen die PRG2-Konstrukte in der Basis sowie teilweise zusätzlich an deren Spitzen lokalisiert zu sein. Das C-terminal-trunkierte Konstrukt zeigte erneut den geringsten Anteil an in der Plasmamembran lokalisiertem Protein sowie kaum Proteinanreicherungen an den Enden der Protrusionen.



**Abbildung 26: Verschiedene PRG2/3-Konstrukte in differenzierten Neuro2a\_2-Zellen:** A: CFPMem, B: eGFP-rPRG2, C: rPRG2-eGFP, D: eGFP-rPRG2- $\Delta$ C, E: rPRG3-eGFP. Die Lokalisation in der Plasmamembran lässt sich im Vergleich zu CFPMem nur für PRG3 deutlich erkennen. Die PRG2-Plasmide sind zwar ebenfalls in den Protrusionen lokalisiert, jedoch weniger in deren Schaft, sondern eher an deren Ende. Dies ist besonders in den geschärften Abbildungen A' bis D' erkennbar. Es lässt sich erahnen, dass eGFP-rPRG2 sowie rPRG3-eGFP überexprimierende Zellen eine Vermehrung der Neuriten (B,E) aufweisen sowie rPRG3-eGFP überexprimierende Zellen zusätzlich eine Vermehrung der längeren Protrusionen (s. 3.2.6.2). Konfokale Z-Stapel mit maximaler Z-Projektion in A-E und den Vergrößerungen A' bis D', in A' bis D' zusätzlich geschärfte Abbildungen (Deconvolution CellSens). Intensität für alle Kanäle wurde im Nachhinein adjustiert (CellSens). Grün: GFP/CFP. Rot: Aktinzytoskelett. Blau: Kernfärbung (DAPI). Messbalken entsprechen 10  $\mu$ m (vergrößerte Ausschnitte: 2,5  $\mu$ m).

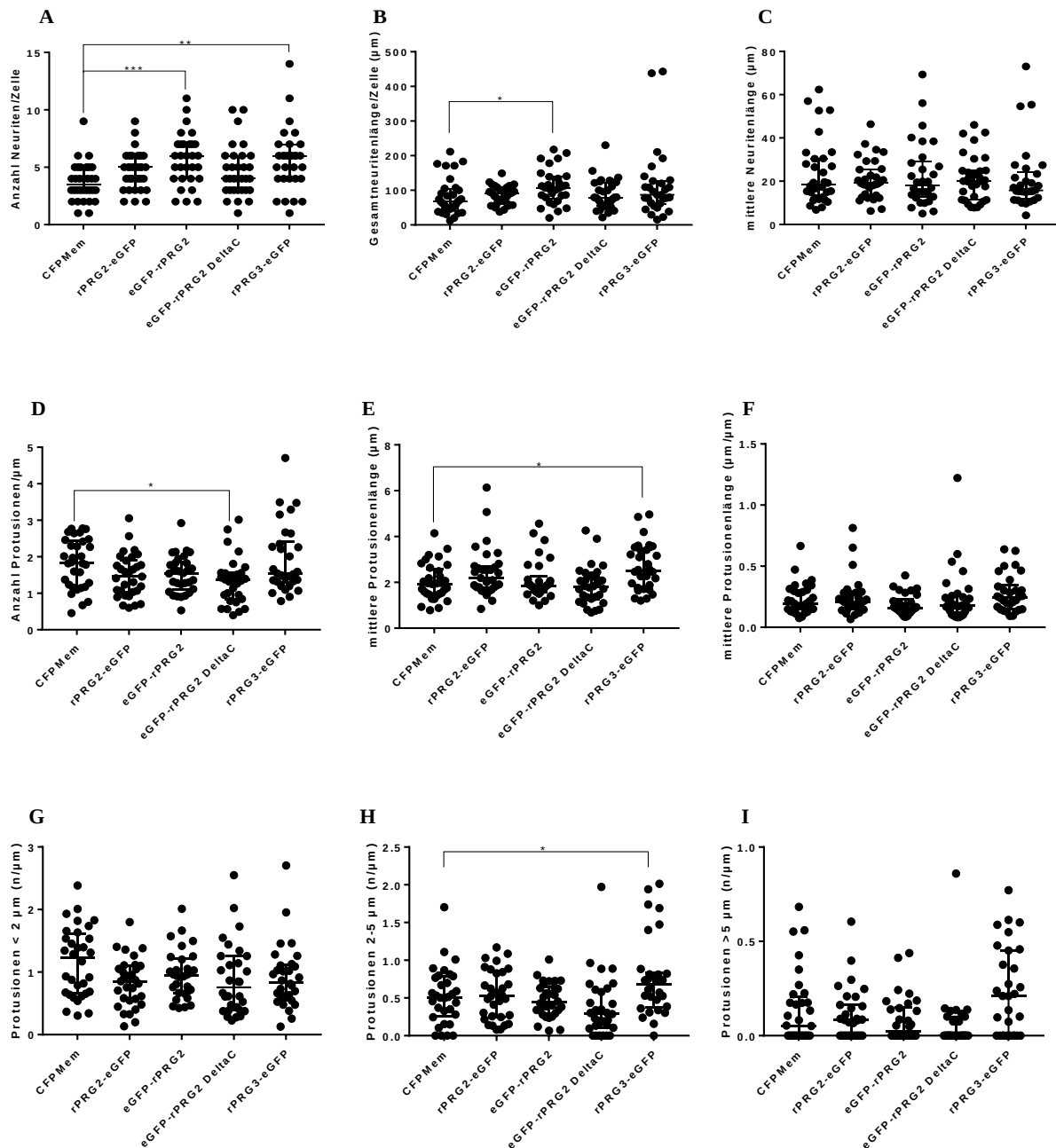
### 3.2.6.2 Quantifizierung der Neuriten und Protrusionen in PRG2/3-überexprimierenden, differenzierten Neuro2a 2

In der Tat zeigte sich bei der Quantifizierung der zellulären Ausläufer in differenzierten Neuro2a\_2 Zellen, dass PRG2 ebenso wie PRG3 Einfluss auf die Neuritenbildung in Neuro2a besitzt, jedoch scheinbar keine Auswirkungen auf die Protrusionen hat. Der C-Terminus scheint für die Neuriten-initiiierende Funktion von PRG2 entscheidende Bedeutung zu besitzen.

Für eGFP-rPRG2- und rPRG3-eGFP-überexprimierende Neuro2a\_2-Zellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Neuriten/Zelle (CFPMem  $\leftrightarrow$  eGFP-rPRG2:  $p=0,0005$ ; CFPMem  $\leftrightarrow$  rPRG3-eGFP:  $p=0,0022$ ), s. **Abbildung 27 (A)**). Die Neuritenlänge dagegen scheint weder durch PRG3- noch durch PRG2-Überexpression wesentlich beeinflusst zu werden: Die Gesamtnuritenlänge zeigte sich zwar signifikant (CFPMem  $\leftrightarrow$  eGFP-rPRG2:  $p=0,0141$  (\*), s. **Abbildung 27 (B)**) erhöht für eGFP-PRG2-überexprimierende Zellen im Vergleich zu CFPMem-überexprimierende Zellen, jedoch spiegelt sich dies nicht in der mittleren Neuritenlänge (mittlere Neuritenlänge = Gesamtnuritenlänge/Anzahl Neuriten) wider (s. **Abbildung 27 (C)**,  $p$ -Werte  $>0,9999$  für alle Plasmide im Vergleich zu CFPMem). Dementsprechend scheint dieser Unterschied lediglich die erhöhte Anzahl an Neuriten widerzuspiegeln.

Bezüglich der Protrusionen (s. **Abbildung 27** (D-I)) zeigen sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Plasmiden, wobei ausschließlich PRG3 Einfluss auf die Protrusionenbildung in Neuro2a zu haben scheint. (Niedrig) signifikante Unterschiede ergeben sich für die Anzahl an Protrusionen mit einer reduzierten Anzahl in eGFP-PRG2- $\Delta$ C-überexprimierenden Zellen (CFPMem  $\leftrightarrow$  eGFP-rPRG2- $\Delta$ C:  $p=0,0124$ , s. **Abbildung 27** (D)) als auch für die

mittlere Protrusionenlänge zugunsten rPRG3-eGFP-überexprimierenden Zellen (CFPMem  $\leftrightarrow$  rPRG3-eGFP:  $p=0,0430$ , s. **Abbildung 27 (E)**), wobei sich dies nach Standardisierung der Werte (pro  $\mu\text{M}$  Neurit) nicht mehr nachweisen lässt (s. **Abbildung 27 (F)**). Diese tendenziell erhöhte Länge der Protrusionen von PRG3-überexprimierenden Neuro2a\_2-Zellen könnte mit einer Erhöhung der Anzahl längerer Protrusionen (signifikant für Protrusionen der Länge 2-5  $\mu\text{M}$  (CFPMem  $\leftrightarrow$  rPRG3-eGFP:  $p=0,0456$  (\*), s. **Abbildung 27 (H)**), nicht signifikant, aber möglicherweise dennoch relevant auch für Protrusionen der Länge  $>5$   $\mu\text{M}$  (CFPMem  $\leftrightarrow$  rPRG3-eGFP:  $p=0,3310$  (ns), s. **Abbildung 27 (I)**) zusammenzuhängen.



**Abbildung 27: Neuriten und Protrusionen in PRG2/3-überexprimierenden, differenzierten Neuro2a\_2:** PRG3- und eGFP-PRG2-überexprimierende Neuro2a\_2-Zellen weisen eine Vermehrung der Neuriten (A) bei gleichbleibender mittlerer Neuritenlänge (C) auf. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Protrusionen finden sich zwischen PRG3-überexprimierenden Zellen und den Kontrollzellen (E,H). In PRG3-überexprimierenden Zellen kommt es zu einer Vermehrung der längeren Protrusionen (signifikant für 2-5  $\mu\text{m}$  lange Protrusionen (H)), was sich auch in der mittleren Länge der Protrusionen niederschlägt. Diese Tendenz spiegelt sich jedoch bei den (in Bezug auf den zugrundeliegenden Neuriten) normalisierten Werten nicht signifikant wider (F). Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Korrektur für

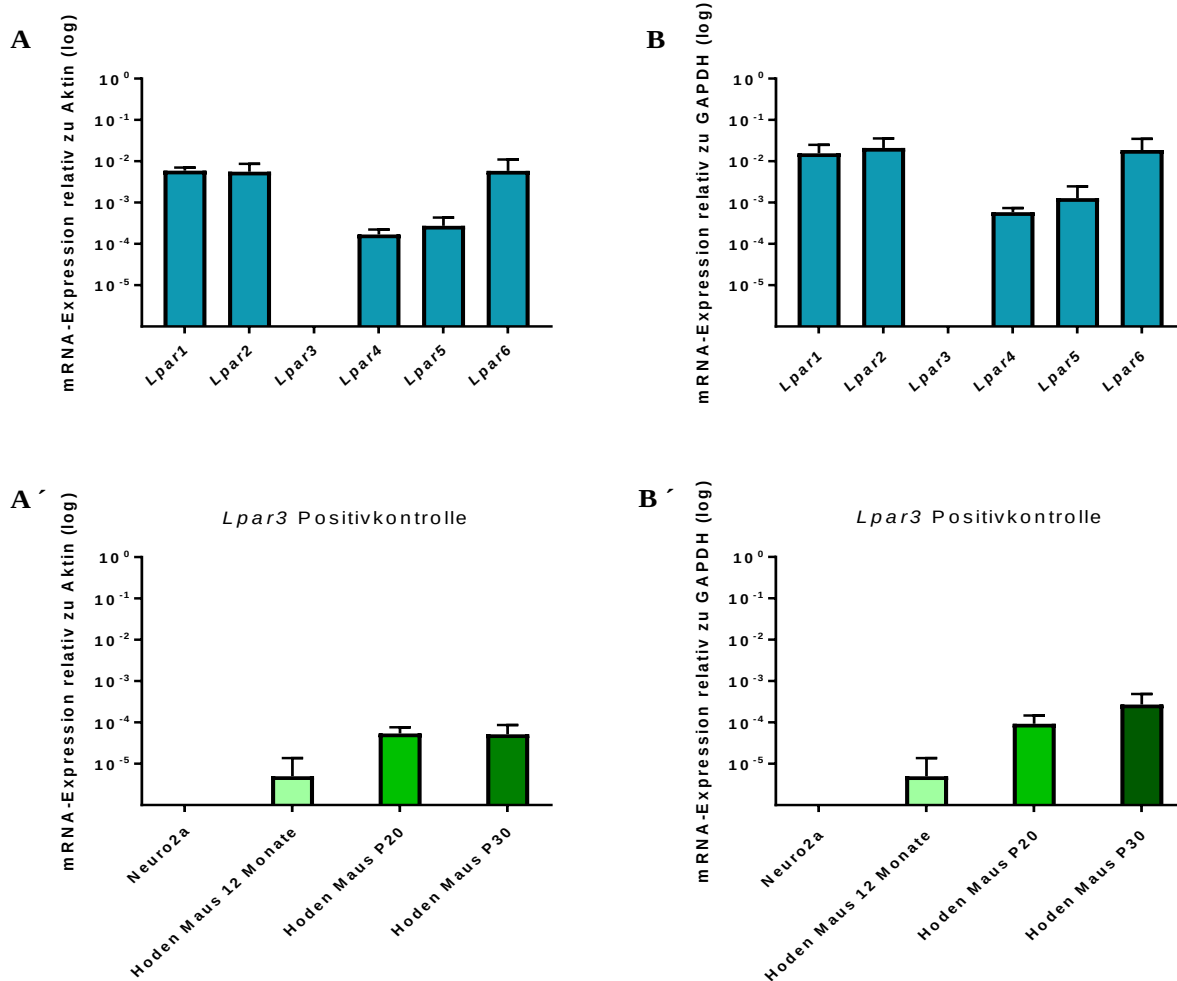
multiple Testen verwendet. *p*-Werte: ns -  $p > 0.05$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ . Die Balken geben Median und IQR als eher Ausreißer-unabhängige Marker an. Für *p*-Werte und deskriptive Statistik s. Anhang.  $n=3$ ,  $N=30-32$ .  $n$ =biologische Replikate (unabhängige Aussaat, Transfektion, Fixierung),  $N$ =Gesamtanzahl gemessene Zellen/Plasmid. Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.

### 3.3 Der LPA-induzierte Kollaps

#### 3.3.1 Die natürliche Expression von LPA-Rezeptoren in Neuro2a-Zellen

Um den LPA-induzierten Kollaps in Neuro2a untersuchen zu können, ist eine LPA-Sensibilität der verwendeten Zelllinie Voraussetzung. Aufgrund dessen sollte zunächst mittels qRT-PCR geprüft werden, ob (die klassischen sechs G-Protein gekoppelten) LPA-Rezeptoren LPA<sub>1-6</sub> (Nomenklatur der entsprechenden Gene bei der Maus: *Lpar1-6*) in der verwendeten Zelllinie exprimiert werden. Es war zudem von Interesse, welche LPA-Rezeptoren exprimiert werden, um zu bestimmen, welche Signalwege in Neuro2a durch LPA induziert werden können.

Mittels qRT-PCR wurden recht hohe Expressionslevel für *Lpar1,2* und *6* gefunden und etwas geringere für *Lpar4* und *5* (s. **Abbildung 28, A/B**). Lediglich *Lpar3* scheint in Neuro2a-Zellen nicht exprimiert zu sein. Dies ist konsistent mit der Literatur, welche eine *Lpar3*-Expression v.a. in Hoden, Ovarien und Herz angibt (202). Deshalb wurde als Positivkontrolle aus murinem Hoden gewonnene cDNA (aus der laborinternen cDNA-Datenbank) verwendet (s. **Abbildung 28, A/B**). Die Expression von *Lpar3* konnte im murinen Hoden nachgewiesen werden (Expressionslevel abhängig vom Postnatalstadium), sodass ein Versagen der *Lpar3*-Primer-Sonde ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 28: Expression der LPA-Rezeptoren in Neuro2a\_1:** relative mRNA-Expression normalisiert zu den Referenzgenen Aktin und GAPDH (qRT-PCR). Alle LPA-Rezeptoren außer LPA-Rezeptor 3 sind basal in Neuro2a exprimiert (A,B). Um ein Versagen der Lpar3-Primer-Probe auszuschließen, erfolge der Nachweis von Lpar3-Expression in murinem Hoden verschiedenen Alters (A',B'). P: postnataler Tag. Angegeben ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Für deskriptive Statistiken s. Anhang.  $n=3$ ,  $N \geq 6$ .  $n$ : Anzahl unabhängige RNA-Isolierungen.  $N$  = Gesamtanzahl Durchführungen der qRT-PCR (zwei technische Replikate pro biologisches Replikat). Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.

### 3.3.2 Der LPA-induzierte Kollaps in untransfizierten Neuro2a-Zellen

Für Neuro2a- und N1E-115-Zellen wird eine Neuritenretraktion und Zellrundung als Antwort auf LPA-Exposition beschrieben (22–24,69). Als Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen in transfizierten Zellen musste zunächst ein Versuchsaufbau mit Bedingungen entwickelt werden, unter welchen reproduzierbar valide Messungen einer durch LPA induzierten Neuritenretraktion messbar sind.

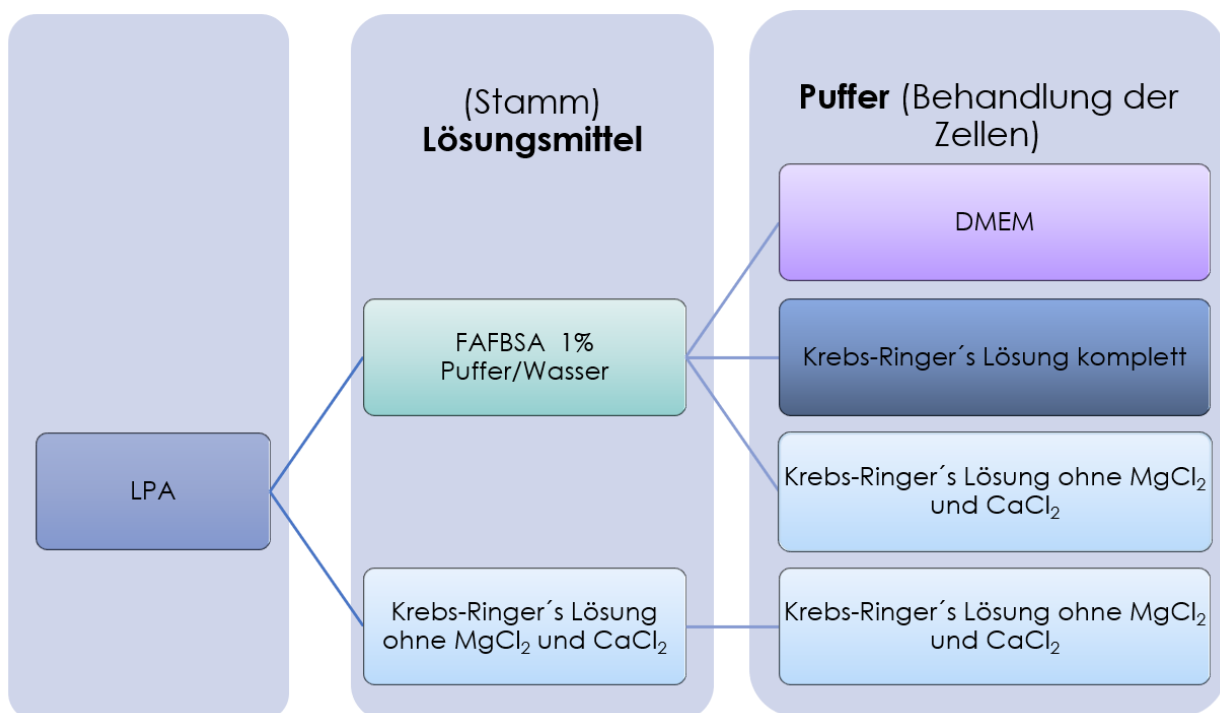
Für die LPA-Behandlung wurde (wie oben beschrieben (s. 2.2.2.2)) ein Versuchsaufbau verwendet, bei welchem Zellen kontinuierlich mit einem Puffer umspült werden, dem bei Bedarf LPA hinzugesetzt werden können. LPA wurden als Pulver bezogen und zunächst mittels eines Lösungsmittels in Lösung gebracht. Diese Stammlösung wurde anschließend bei -20 °C bis zum jeweiligen Experiment gelagert und erst direkt vor der Anwendung aufgetaut und in den Puffer gegeben (s. auch 2.1.4).

Für die Wahl des Puffers und Lösungsmittels orientierte ich mich zunächst an dem, was in unserem Labor zuvor für Calciummessungen unter LPA-Stimulation (mithilfe desselben Versuchsaufbaus mit Mikroskop und Pump-Schlauch-

System) genutzt wurde (bisher nicht publiziert, experimentelle Leitung: Frau Dr. Nicola Brandt). Während dieser Messungen war zunächst mit einem albuminhaltigen Lösungsmittel gearbeitet worden. Jedoch zeigten sich hier ohne Hinzugabe von LPA in der Kontrolle Veränderungen des intrazellulären Calciumspiegels, weswegen auf ein Lösungsmittel ohne Albumin gewechselt wurde. Als physiologischer Puffer für Zellkulturexperimente eignet sich Krebs-Ringer's Lösung. Allerdings reduzieren die normalerweise enthaltenen Ionen der Salze  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$  die Löslichkeit unpolareter Fettsäuren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde somit Krebs-Ringer's Lösung ohne diese Salze als (primäres Stamm-)Lösungsmittel sowie während der Behandlung als Puffer verwendet.

Entsprechend verwendete auch ich zu Beginn meiner LPA-Experimente Krebs-Ringer's Lösung ohne  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$  sowohl als primäres Lösungsmittel als auch als Puffer während den Behandlungen. In der Tat war bei einer Behandlung untransfizierter Neuro2a mit LPA 10  $\mu\text{M}$  unter diesen Bedingungen eine Neuritenretraktion zu beobachten. Überraschenderweise zeigte sich jedoch auch während der Kontrollbehandlung (mit Krebs-Ringer's Lösung ohne Salze ohne LPA) ein Zellkollaps. Es musste somit nach einem anderen Lösungsmittel-Puffer-System gesucht werden.

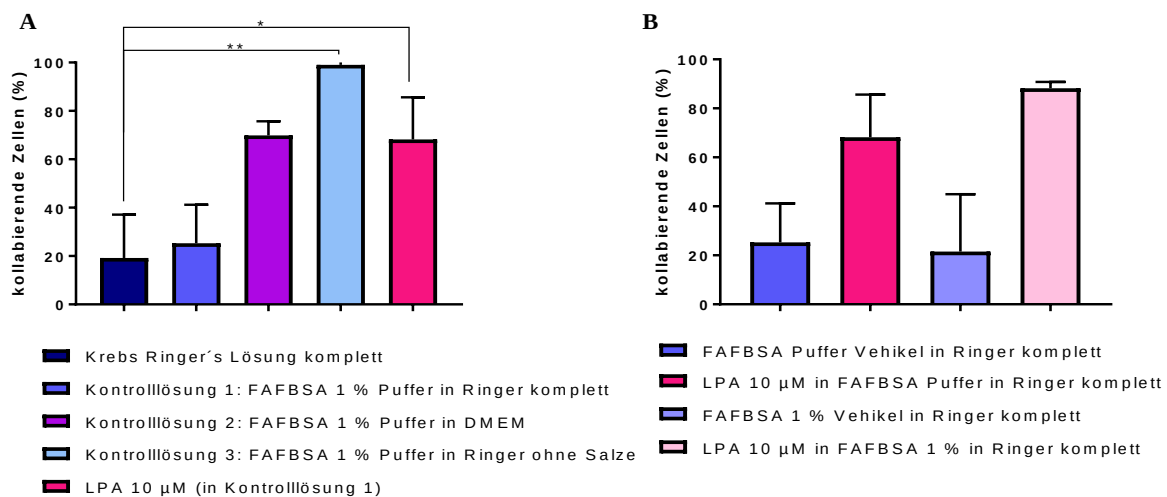
Um LPA in Lösung zu bringen, eignen sich insbesondere Proteine wie Albumin (ohne Fettsäuren: FAFBSA (Fatty Acid Free Bovine Serum Albumine)). Wird ein albuminhaltiges Lösungsmittel (FAFBSA 1% in Wasser/Puffer (s. 2.1.4)) für die Stammlösung verwendet, können für die Behandlung auch ionenhaltige Puffersysteme genutzt werden: Neben Krebs-Ringer's Lösung ohne Salze kann auch vollständige Krebs-Ringer's Lösung sowie auch das für die Kultivierung der Zellen genutzte Medium (DMEM) verwendet werden (s. **Abbildung 29**).



**Abbildung 29: Mögliche Kombinationen von Lösungsmittel und Puffer für die Behandlung von Zellen mit LPA:** LPA (Pulver) wird zunächst mit einem (Stamm-)Lösungsmittel in Lösung gebracht. Hierzu eignen sich entweder als wässriges Lösungsmittel Krebs-Ringer's Lösung (jedoch nur ohne Zusatz der Salze  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$ ) oder ein albuminhaltiges Lösungsmittel. Wird Krebs-Ringer's Lösung ohne Salze für die primäre Lösung verwendet, dürfen auch in dem bei der Behandlung der Zellen verwendeten Puffer keine die Löslichkeit störenden Ionen enthalten sein. Somit eignet sich hier ausschließlich ebenfalls Krebs-Ringer's Lösung ohne Salze. Wird ein albuminhaltiges Lösungsmittel verwendet, wird hierdurch die Löslichkeit von LPA erhöht und bei der Wahl des Puffers eröffnen sich verschiedene Möglichkeiten: Zu der Krebs-Ringer's Lösung können nun auch die entsprechenden Salze hinzugefügt werden oder alternativ kann auch das für die Kultivierung der Zellen verwendete DMEM im Experiment als Puffer genutzt werden. **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium. **FAFBSA:** fatty acid free bovine serum albumine.

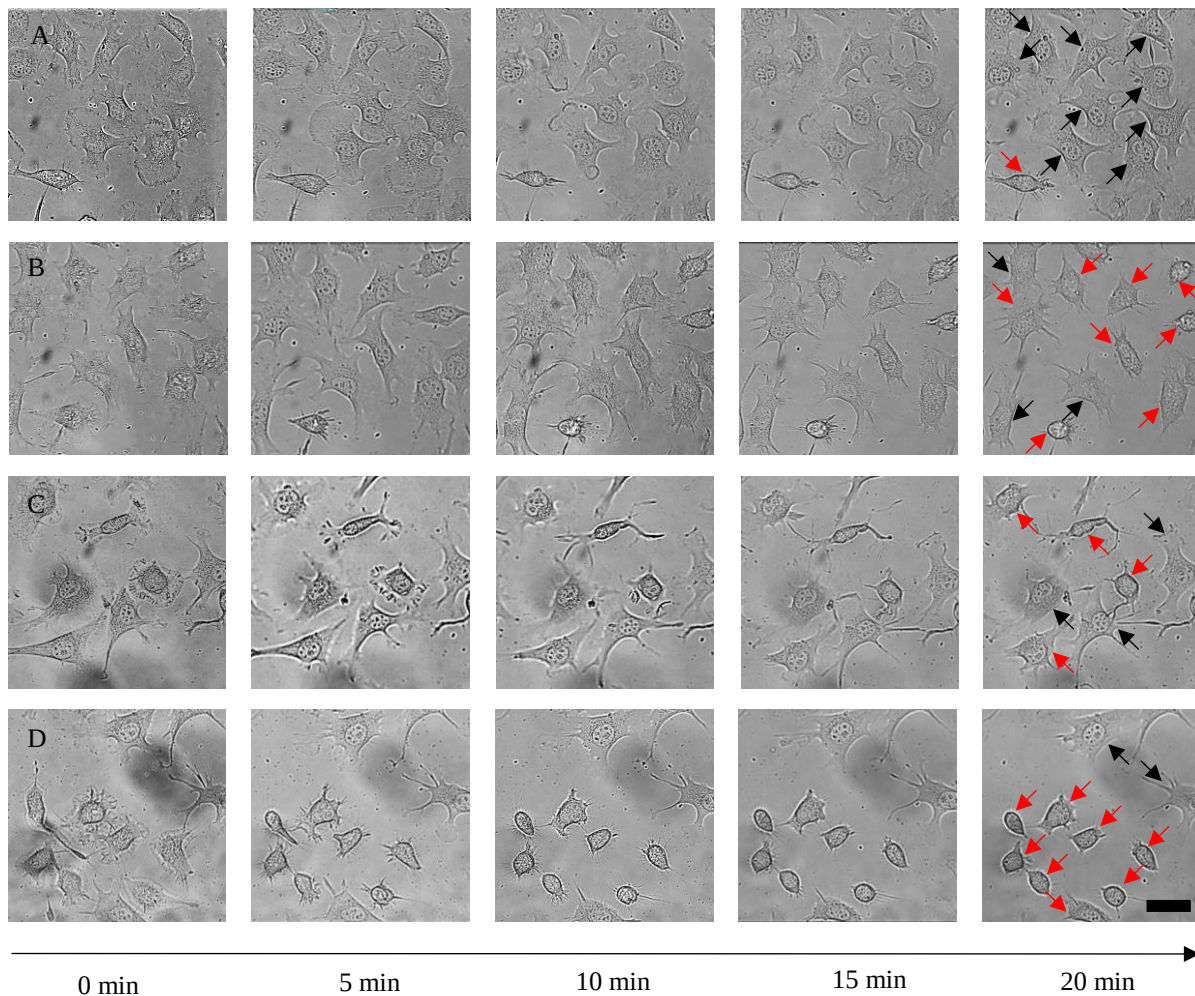
Ich testete diese verschiedenen Kombinationen dahingehend, ob sie (ohne Zusatz von LPA) morphologische Veränderungen im Sinne einer Neuritenretraktion/Zellkollaps in Neuro2a\_1 hervorrufen (s. **Abbildung 30**, A und **Abbildung 31**). Es zeigte sich, dass eine Behandlung der Zellen mit Krebs-Ringer's Lösung ohne  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$  einen im Vergleich zu der Behandlung mit vollständiger Ringer Krebs' Lösung signifikanten Kollaps von Neuro2a verursachte ( $p=0,0058$ ). Auch die Behandlung mit dem für die Kultivierung der Zellen verwendeten Medium (DMEM) war mit einer hohen Rate an kollabierenden Zellen verbunden.

Für die valide Untersuchung von durch LPA induzierter Neuritenretraktion in Neuro2a ist somit als (primäres) Lösungsmittel für LPA ausschließlich ein Albumin-haltiges Lösungsmittel verwendbar. Dabei kann ein Albumin enthaltener Puffer (FAFBSA 1% Puffer) oder reines Wasser mit Albumin (FAFBSA 1% in Wasser) verwendet werden (s. **Abbildung 30**, B). Als Puffersystem während der Behandlung eignet sich ausschließlich Krebs-Ringer's Lösung mit den entsprechenden Salzen. In Neuro2a\_2 (s. **Abbildung 32**) konnte unter diesen Bedingungen ebenfalls ein valider Versuchsaufbau etabliert werden.

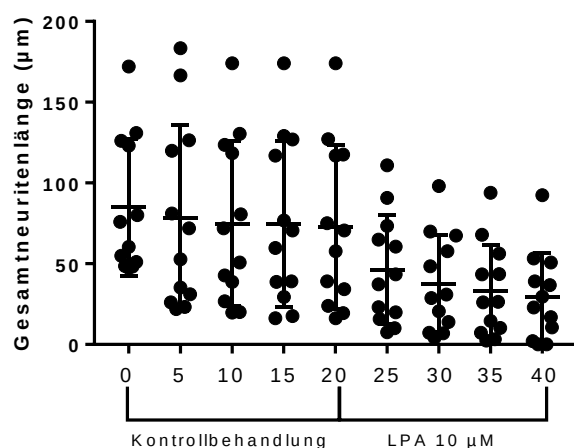


**Abbildung 30: Zellkollaps in untransfizierten Neuro2a\_1-Zellen induziert durch verschiedene Lösungsmittel und LPA 10  $\mu M$ :**  
**A:** Eine Behandlung von Zellen mit Krebs-Ringer's Lösung ohne  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$  führt zu einem Kollaps von >90 % der Zellen innerhalb von 20 min Behandlung (signifikant mehr als bei Verwendung von vollständiger Krebs-Ringer's Lösung). Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Korrektur für multiples Testen verwendet ( $p$ -Werte: ns -  $p > 0,05$ , \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ ).  $p$  (Krebs-Ringer's Lösung komplett vs. Kontrolllösung 3) = 0,0058 (\*\*),  $p$  (Krebs-Ringer's Lösung komplett vs. LPA) 0,0383 (\*).  $n=3$ ,  $N=5-14$  (pro Messung 18-34 Zellen) **B:** Es besteht kein Unterschied zwischen der Verwendung von FAFBSA-Puffer oder FAFBSA 1% in Wasser für die LPA-Stammlösung. Da bei den Experimenten in A FAFBSA-Puffer verwendet wurde, anschließend jedoch auf den einfacher herzustellenden (und weniger möglicherweise interagierende Stoffe enthaltenden) Puffer FAFBSA 1% in Wasser umgeschwenkt wurde, wurde hier einmalig gezeigt, dass auch dieses Stammlösungsmittel geeignet ist.  $n=1$ ,  $N=2$  (37 Zellen). Angegeben werden jeweils Mittelwert sowie Standardabweichung. Für  $p$ -Werte und deskriptive Statistik s. Anhang.  $n$ : voneinander unabhängige Experimente an unterschiedlichen Messungstagen,  $N$ : Gesamtzahl an Messungen. Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.





**Abbildung 31: Kollaps induziert durch verschiedene Kontrolllösungen im Vergleich zu dem Kollaps induziert durch LPA:** A: Kontrolllösung 1 (FAFBSA Vehikel in Krebs-Ringer's Lösung mit Salze), B: Kontrolllösung 2 (FAFBSA Vehikel in Krebs-Ringer's Lösung ohne Salze), C: Kontrolllösung 3 (FAFBSA Vehikel in DMEM), D: LPA 10  $\mu$ M in FAFBSA Stamm in Krebs-Ringer's Lösung mit Salzen. Pfeile: schwarz: keine Veränderung, rot: Retraktion/Kollaps. Für Quantifizierung s. **Abbildung 30**. Messbalken entspricht 30 $\mu$ m.

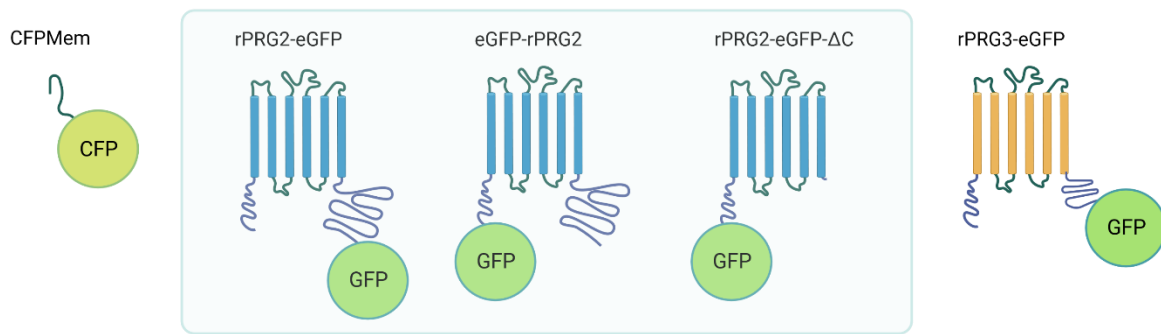


**Abbildung 32: Neuritenretraktion in untransfizierten Neuro2a\_2-Zellen induziert durch LPA 10  $\mu$ M im Vergleich zur Kontrollbehandlung:** Da die Experimente bezüglich Lösungsmittel und Puffer in Neuro2a\_1 durchgeführt wurden (s.o.), wurde hiermit bestätigt, dass auch Neuro2a\_2 unter diesen Bedingungen verlässlich auf LPA reagieren und unter der Kontrollbehandlung stabil bleiben. **Kontrollbehandlung:** Krebs-Ringer's Lösung (mit  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$ ) mit FAFBSA-Vehikel (Kontrolllösung 1). **Gesamtneuritenlänge/Zelle:** Summe der Längen aller Neuriten einer Zelle. Angegeben werden Einzelwerte sowie (mittels der Balken) Mittelwert und Standardabweichung. n=1, N=2 (insgesamt 12 Zellen). n: voneinander unabhängige Experimente an unterschiedlichen Messungstagen. N: Gesamtzahl an Messungen. Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.



### 3.3.3 Der LPA-induzierte Kollaps in PRG2/PRG3-überexprimierenden Neuro2a-Zellen

Nachdem ein Versuchsaufbau erarbeitet wurde, welcher valide Messungen der LPA-induzierten Neuritenretraktion in Neuro2a ermöglichte (s. 3.3.2), wurde die Neuritenretraktion in transfizierten, PRG-überexprimierenden Zellen untersucht. Da die Effekte der Überexpression von PRG1, -3 und -5 auf die LPA-induzierte Neuritenretraktion beschrieben sind, fokussierte ich mich in meinem Forschungsprojekt auf PRG2. Um der Bedeutung des C-Terminus für die Interaktion mit den durch LPA induzierten Signalwegen näher zu kommen, wurden drei verschiedene PRG2-Konstrukte (in Analogie zu 3.2.6) inklusive einem mit C-terminaler Trunkierung verwendet (s. **Abbildung 33**). PRG3-überexprimierende Zellen wurden als Vergleichsobjekte im Sinne einer Positivkontrolle verwendet.

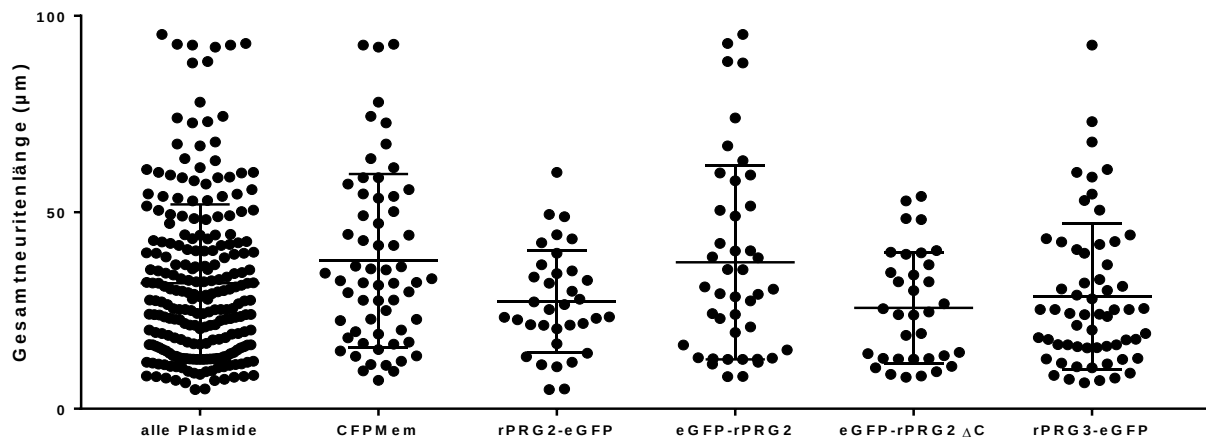


**Abbildung 33:** Die für die Lebendzellmikroskopie unter LPA-Bedingungen verwendeten Überexpressions-Konstrukte: **CFPMem**: in der Plasmamembran verankertes CFP-Konstrukt (Negativkontrolle). **rPRG2-eGFP**: C-terminal GFP-markiertes PRG2 Protein. **eGFP-rPRG2**: N-terminal GFP-markiertes PRG2-Protein. **eGFP-rPRG2-ΔC**: N-terminal GFP-markiertes, C-terminal-trunkiertes PRG2-Protein. **rPRG3-eGFP**: C-terminal GFP-markiertes PRG3-Protein (Positivkontrolle). CFP: Cyan fluoreszierendes Protein. GFP: Grün fluoreszierendes Protein. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die Neuritenretraktion wurde zum einen durch die Messung der absoluten Längen der Neuriten (Gesamtneuritenlänge ( $\mu\text{m}$ ): Summe der Längen aller Neuriten einer Zelle) und zum anderen durch die Berechnung der prozentualen Werte (Gesamtneuritenlänge (%): prozentualer Anteil der Neuritenlänge zum Zeitpunkt  $t_2=x$  im Vergleich zum Zeitpunkt  $t_2=0$  (0 min LPA-Behandlung)) beschrieben (s. auch 2.2.1.2).

#### 3.3.3.1 Neuritenlänge zu Beginn der Behandlung

Bereits zum Zeitpunkt  $t_1=0$  min vor Beginn jeglicher Behandlung bestanden signifikante Unterschiede hinsichtlich der absoluten Neuritenlängen zwischen den mit den verschiedenen Plasmiden transfizierten Zellen ( $p=0,034$  (\*)) bei insgesamt hoher Streuweite (s. **Abbildung 34**). In der Post-hoc Analyse (mit Dunn- Bonferroni-Korrektur angepasste Signifikanzwerte für multiples Testen) waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Plasmiden im Vergleich mit dem Kontrollplasmid CFPMem nicht signifikant. Wie beschrieben (s. 3.2.6), liegt vermutlich kein Unterschied in der Neuritenlänge, jedoch in der Neuritenanzahl vor (s.o.).



**Abbildung 34: Gesamtneuritenlänge vor Beginn der Kontrollbehandlung:** Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der absoluten Gesamtneuritenlänge zwischen den Plasmiden, jedoch fällt eine hohe Varianz auf und eine tendenziell erhöhte Anzahl von Zellen mit hohen Neuritenlängen bei den Plasmiden CFPMem (Kontrollplasmid), eGFP-rPRG2 und rPRG3-eGFP. Angegeben sind die Standardabweichung und der Mittelwert. **Links** (alle Plasmide): Gesamtneuritenlängen aller gemessenen Zellen unabhängig vom Plasmid.  $n=10$ ,  $N=243$ . **Rechts:** Gesamtneuritenlängen aufgeteilt nach Plasmid.  $n \geq 6$ ,  $N(\text{CFPMem})=61$ ,  $N(\text{rPRG2-eGFP})=35$ ,  $N(\text{eGFP-rPRG2})=43$ ,  $N(\text{eGFP-rPRG2-}\Delta\text{C})=34$ ,  $N(\text{rPRG3-eGFP})=60$ .  $n$ : Anzahl unabhängige Experimente.  $N$ : Gesamtzahl gemessene Zellen (alle gemessenen Zellen aus allen  $5\mu\text{M}$  und  $10\mu\text{M}$  Experimenten). Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.

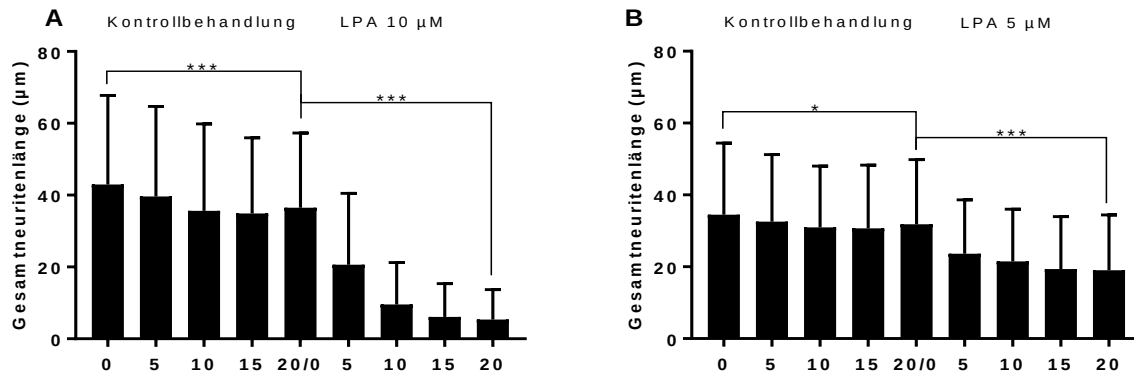
### 3.3.3.2 Effekt von Kontroll- und LPA-Behandlung

Des Weiteren stellte sich (in Anschluss an die Experimente mit untransfizierten Zellen (s. 3.3.2)) die Frage, ob durch die Kontrollbehandlung eine signifikante Reduktion der Neuritenlänge induziert wird sowie ob diese signifikant geringer ist als diejenige, welche durch LPA induziert wird.

Tatsächlich erreicht die Neuritenretraktion induziert durch die Kontrollbehandlung (absolute Werte  $t_1=0$  versus  $t_1=20$ ) ein signifikantes Ausmaß (sowohl bei Zusammenfassen aller Plasmide (Kontrollbehandlung  $10\mu\text{M}$ :  $p<0,001$ ; Kontrollbehandlung  $5\mu\text{M}$ :  $p<0,001$ ) als auch für das Kontrollplasmid CFPMem alleine (s. **Abbildung 35**)).

Die relative Neuritenretraktion induziert durch LPA ( $10/5\mu\text{M}$ ) zeigte jedoch wie erwartet ein signifikant höheres Ausmaß als diejenige induziert durch die Kontrollbehandlung (Gesamtneuritenlänge (%) nach entsprechender Kontrollbehandlung ( $t_1=20$ ) versus Gesamtneuritenlänge (%) nach LPA  $5\mu\text{M}$  ( $t_2=20$ ):  $p<0,001$ ; Gesamtneuritenlänge (%) nach entsprechender Kontrollbehandlung versus Gesamtneuritenlänge (%) nach LPA  $10\mu\text{M}$ :  $p<0,001$  (Wilcoxon-Test)). Dies spiegelt sich ebenfalls in deutlich geringeren Effektstärken für die absolute Neuritenretraktion induziert durch die Kontrollbehandlung im Vergleich zu derjenigen induziert durch die LPA-Behandlung wider. Die Effektstärke der Kontrollbehandlung erwies sich mit  $r=0,697$  (für Kontrollbehandlung zur  $10\mu\text{M}$  LPA-Behandlung) und  $r=0,319$  (für Kontrollbehandlung zur  $5\mu\text{M}$  LPA-Behandlung) als deutlich geringer als diejenige für die LPA-Behandlung ( $r=0,875$  für  $10\mu\text{M}$  LPA-Behandlung und  $r=0,808$  für  $5\mu\text{M}$  LPA-Behandlung).

Den Erwartungen entsprechend ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Plasmiden bezüglich der Neuritenretraktion während der Kontrollbehandlung (Analyse ohne Ausschluss einzelner Zellen: Gesamtneuritenlänge 5 min (%):  $p=0,983$  (ns), Gesamtneuritenlänge 10 min (%):  $p=0,394$  (ns), Gesamtneuritenlänge 15 min (%):  $p=0,748$  (ns), Gesamtneuritenlänge 20 min (%):  $p=0,925$  (ns)).

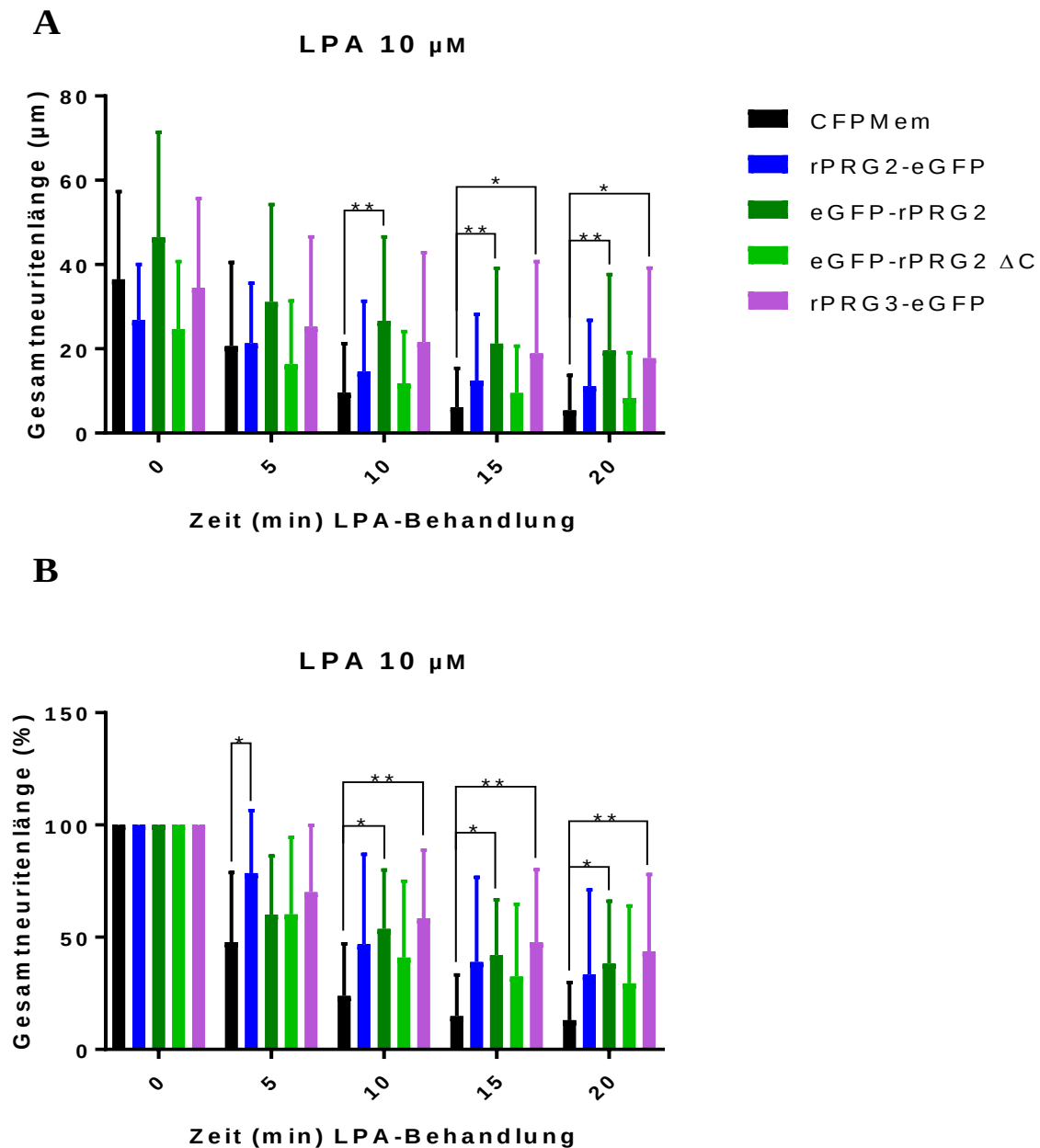


**Abbildung 35: Entwicklung der Gesamtneuritenlänge während Kontroll- und LPA-Behandlung in CFPMem-transfizierten Zellen:** A: Behandlung mit 10 µM LPA oder FAFBSA-Vehikel (Volumen wie LPA 10 µM, Kontrollbehandlung). B: Behandlung mit 5 µM LPA oder FAFBSA-Vehikel (Volumen wie LPA 5 µM, Kontrollbehandlung). Verwendeter Puffer: Krebs-Ringer's Lösung mit Salzen. X-Achse: Angabe der Messzeitpunkte ( $T_{1/2}=0-20$  (s. 2.2.2.2)). Die Neuritenlänge wird während der Kontrollbehandlungen und LPA-Behandlungen signifikant reduziert. Als statistischer Test wurde der asymptotische Wilcoxon-Test (SPSS) durchgeführt (**p-Werte:** ns -  $p > 0.05$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ). p-Werte: Neuritenretraktion während Kontrollbehandlung (zu 10 µM LPA):  $p < 0,001$  (\*\*\*); Neuritenretraktion während Kontrollbehandlung (zu 5 µM LPA)  $p = 0,049$  (\*); Neuritenretraktion während LPA-Behandlung 10 µM:  $p < 0,001$  (\*\*\*); Neuritenretraktion während LPA Behandlung 5 µM:  $p < 0,001$  (\*\*\*). Hier wurden alle Werte der Zellen einbezogen, welche in der Kontrolle keinen Kollaps (definiert als Neuritenretraktion auf  $< 20$  % des Ausgangswertes) zeigten. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. FAFBSA: Fatty Acid Free Bovine Serum Albumine.  $n$  (10 µM) = 3,  $N$  (10 µM) = 23,  $n$  (5 µM) = 3,  $N$  (5 µM) = 38.  $n$ : Anzahl unabhängige Experimente.  $N$ : Gesamtzahl gemessene Zellen. Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.

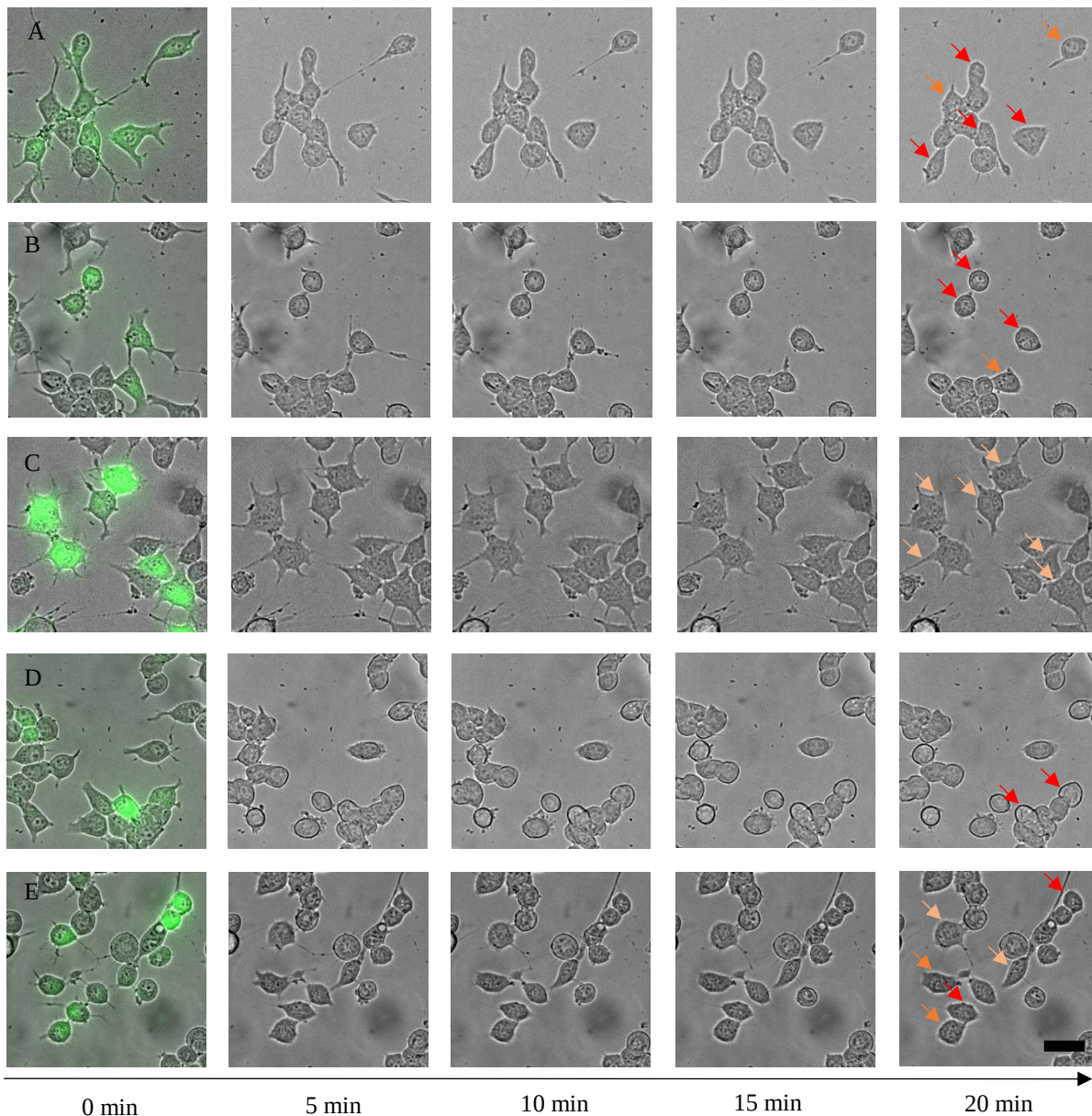
### 3.3.3.3 LPA-Behandlung 10 µM

Bei der Verwendung einer hohen LPA-Konzentration von 10 µM konnte in Analogie zur Literatur eine Reduktion der Neuritenretraktion in rPRG3-eGFP überexprimierenden Zellen im Vergleich zu CFPMem festgestellt werden. Zusätzlich zeigte sich auch bei der Überexpression eines der PRG2-Konstrukte, nämlich des nicht trunkierten, N-terminal GFP-markierten Konstruktes eGFP-rPRG2 eine im Vergleich zu CFPMem reduzierte Neuritenretraktion.

Hinsichtlich der prozentualen (relativen) Neuritenlängen wurde zu Beginn der Messung (5 min:  $p = 0,029$ ) kein signifikanter Unterschied zwischen den Plasmiden festgestellt, ab dem Zeitpunkt 10 min LPA-Behandlung zeigten sich jedoch signifikant unterschiedliche Neuritenlängen zwischen den Plasmiden (10 min:  $p = 0,003^{**}$ ; 15 min:  $p = 0,002^{**}$ ; 20 min:  $p = 0,005^{**}$ ). Mittels Dunn-Bonferroni-Post-hoc-Tests wurden ab dem Zeitpunkt 10 min/15 min nach Beginn der LPA-Behandlung signifikant höhere Neuritenlängen für eGFP-PRG3 und eGFP-PRG2 in Vergleich jeweils zum Kontrollplasmid CFPMem festgestellt (s. **Abbildung 36** und **Abbildung 37**). Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in der Analyse der absoluten Werte wider (s. ebd.).



**Abbildung 36: Neuritenretraktion in PRG-überexprimierenden Neuro2a\_2-Zellen durch LPA 10  $\mu$ M:** A: absolute Werte (in  $\mu$ m). B: relative Werte (in %, Gesamtneuritenlänge zum jeweiligen Zeitpunkt ( $t_2=x$ ) im Verhältnis zu der Länge am Beginn der LPA-Behandlung ( $t_2=0$ )). Eine signifikante Reduktion der LPA-induzierten Neuritenretraktion zeigt sich für eGFP-PRG2 und für eGFP-PRG3. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Korrektur für multiples Testen (SPSS) verwendet (**p-Werte:** ns -  $p > 0.05$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ). Für die Signifikanzniveaus und deskriptive Statistik s. Anhang. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung.  $n=3$ ,  $N(\text{CFPMem})=23$ ,  $N(\text{rPRG2-eGFP})=15$ ,  $N(\text{eGFP-rPRG2})=17$ ,  $N(\text{eGFP-rPRG2-}\Delta\text{C})=16$ ,  $N(\text{rPRG3-eGFP})=26$ . Hier wurden alle Werte der Zellen einbezogen, welche in der Kontrolle keinen Kollaps (definiert als Neuritenretraktion auf  $<20$  % des Ausgangswertes) zeigten. n: Anzahl unabhängige Experimente. N: Gesamtzahl gemessene Zellen. Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.



**Abbildung 37: LPA 10  $\mu$ M induzierter Kollaps in PRG-überexprimierenden Neuro2a\_2-Zellen:** A: CFPMem, B: rPRG2-eGFP C: eGFP-rPRG2, D: eGFP-rPRG2- $\Delta$ C, E: rPRG3-eGFP; **Pfeile:** Je dunkler der Rotton, desto stärker der Kollaps/die Retraktion. Für Quantifizierung s. **Abbildung 36**, Messbalken entspricht 30 $\mu$ m.

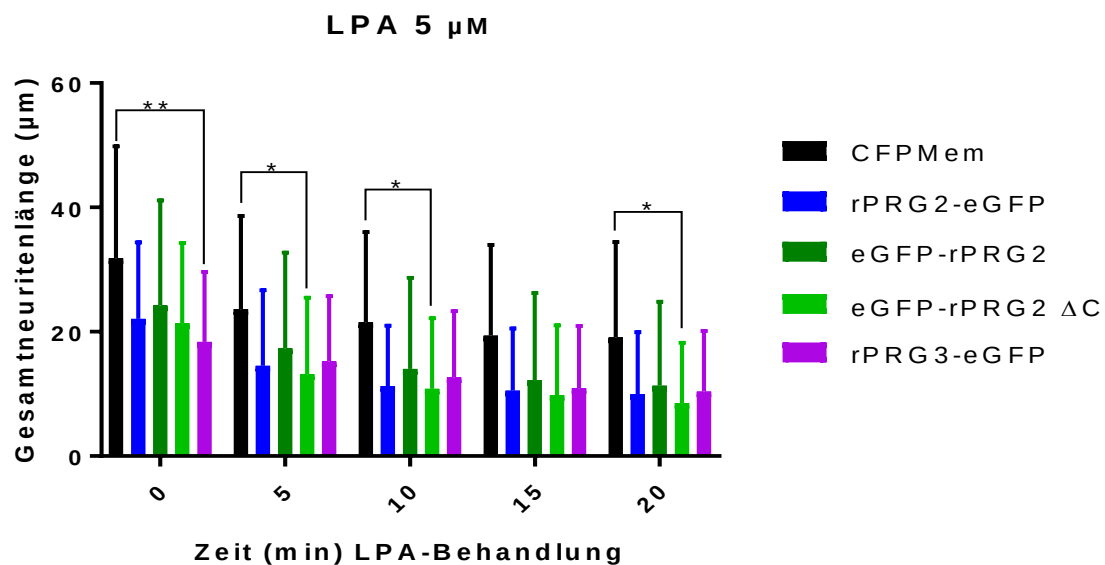
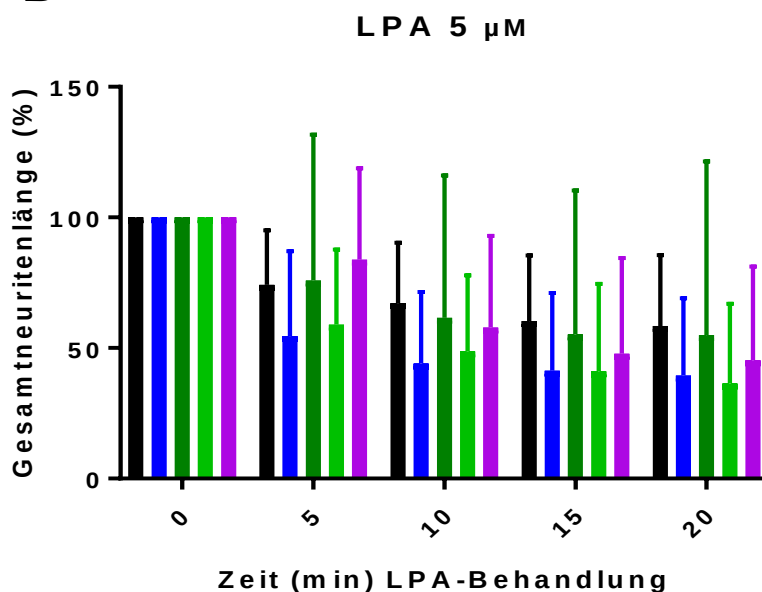
### 3.3.3.4 LPA-Behandlung 5 $\mu$ M

Anschließend wurde das Experiment mit einer geringeren LPA-Konzentration von 5  $\mu$ M wiederholt. Die Ergebnisse aus den Experimenten mit einer LPA-Konzentration von 10  $\mu$ M konnten hier nicht repliziert werden.

Stattdessen zeigte sich während der gesamten Behandlung tendenziell eine im Vergleich zu den PRG-überexprimierenden Zellen erhöhte absolute Gesamtneuritenlänge von CFPMem-überexprimierenden Zellen. Diese Tendenz spiegelt sich in signifikanten Unterschieden zwischen den Plasmiden (ohne Anwendung von Dunn-Bonferroni-Korrektur bei multiplem Testen) wider (0 min LPA:  $p=0,012(*)$ ; 5 min LPA:  $p=0,023(*)$ ; 10 min LPA:  $p=0,008(**)$ ; 15 min LPA:  $p=0,019(*)$ ; 20 min LPA:  $p=0,013(*)$ ). Im Post-hoc-Test (mit Dunn-Bonferroni-Korrektur) sind diese Unterschiede jedoch nur im Vergleich von CFPMem zu eGFP-rPRG2- $\Delta$ C transfizierten Neuro2a-Zellen signifikant (s. **Abbildung 38**).

Auch hinsichtlich der relativen Neuritenlänge sind zu Beginn der LPA-Behandlung signifikante Unterschiede zwischen den Plasmiden vorhanden (Kruskal-Wallis-Test ohne Bonferroni-Korrektur: 5 min LPA:  $p=0,011(*)$ ; 10 min LPA:  $p=0,049(*)$ ). Diese Unterschiede reduzieren sich unter der Behandlung (15 min LPA:  $p=0,151(\text{ns})$ ; 20 min LPA:  $p=0,141(\text{ns})$ ). In den Post-hoc-Tests (unter Dunn-Bonferroni-Korrektur für multiples Testen) sind jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollplasmid und PRG-Plasmiden nachweisbar.

Aufgrund der Hypothese, dass bei den CFPMem-transfizierten Zellen mehr Zellen mit ungewöhnlich hoher Neuritenlänge zu Beginn der Behandlung gemessen wurden und dadurch die Ergebnisse verändert worden sein könnten, wurde die Analyse bei Ausschluss aller Zellen, die zu Beginn der Analyse eine Neuritenlänge  $>50,00 \mu\text{M}$  oder  $<15,00 \mu\text{M}$  zeigten, wiederholt. Auch bei dieser Analyse konnten in den Post-hoc-Tests signifikante Unterschiede zwischen den Plasmiden hinsichtlich der relativen Neuritenlängen nicht festgestellt werden.

**A****B**

**Abbildung 38: Neuritenretraktion in PRG-überexprimierenden Neuro2a\_2-Zellen durch LPA 5  $\mu\text{M}$ :** A: absolute Werte (in  $\mu\text{M}$ ). B: relative Werte (in %, Gesamtneuritenlänge zum jeweiligen Zeitpunkt ( $t_2=x$ ) im Verhältnis zu der Länge bei Beginn der LPA-Behandlung ( $t_2=0$ )). Es zeigt sich, dass die absolute Neuritenlänge in CFPMem-überexprimierenden Zellen signifikant höher ist

als in PRG-überexprimierenden Zellen. Diese Tendenz spiegelt sich auch in den prozentualen Werten bezüglich der durch LPA 5  $\mu$ M induzierten Neuritenretraktion wider, jedoch sind die Unterschiede hier nicht signifikant. Bei nicht normalverteilten Daten wurde hier der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Korrektur für multiples Testen (SPSS) verwendet (**p-Werte:** ns -  $p > 0.05$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ). Für die Signifikanzniveaus und deskriptive Statistik s. Anhang. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung.  $n \geq 3$ ,  $N(\text{CFPMem})=38$ ,  $N(r\text{PRG2-eGFP})=20$ ,  $N(\text{eGFP-rPRG2})=26$ ,  $N(\text{eGFP-rPRG2-}\Delta C)=18$ ,  $N(r\text{PRG3-eGFP})=34$ . Hier wurden alle Werte der Zellen einbezogen, welche in der Kontrolle keinen Kollaps (definiert als Neuritenretraktion auf  $<20$  % des Ausgangswertes) zeigten. n: Anzahl unabhängige Experimente. N: Gesamtzahl gemessene Zellen. Abbildung erstellt mit GraphPad PRISM.



## 4 Diskussion

Im Folgenden sollen die im letzten Abschnitt erläuterten Ergebnisse (s. 3.1 bis 3.3) mit vorliegenden Forschungsergebnissen (s. 1.1 bis 1.5) verknüpft und eingeordnet werden sowie die Limitationen meiner Arbeit diskutiert werden. Anschließend wird ein auf der vorgestellten Literatur und den eigenen Ergebnissen basierendes Modell vorgestellt, wie PRG2 mutmaßlich den LPA-Metabolismus und die induzierten Signalwege beeinflusst. Anhand dessen sollen offene Fragen und damit zukünftig interessante Forschungsschwerpunkte abgesteckt werden.

### 4.1 Einordnung der Ergebnisse

#### 4.1.1 Neuro2a unter Standardbedingungen (s. 3.1)

##### **Uneinheitlichkeit der Morphologie von Neuro2a-Zellen ist herausfordernd.**

In dieser Arbeit wurde mit HEK293T- und Neuro2a-Zellen gearbeitet. Während HEK293T durch eine einheitliche, gleichbleibende Morphologie und dauerhaft hohe Transfektionsraten (mit Ausnahme einer kurzzeitigen Verringerung vermutlich aufgrund der Mykoplasmenkontamination) geprägt waren, erwies sich die Kultivierung von Neuro2a-Zellen als wesentlich anspruchsvoller. Neuro2a-Zellen wiesen eine uneinheitliche, instabile Morphologie auf: Zum einen lagen innerhalb einer Passage verschiedene Zelltypen vor, welche sich im Laufe der Zeit zudem veränderten. Zum anderen bestanden deutliche Unterschiede hinsichtlich Morphologie, Differenzierungsverhalten und Transfektionseffizienz zwischen den zwei verwendeten Neuro2a-Linien (s. Abschnitt 3.1.1). Diese Unterschiede sind unklarer Genese. Vermutlich spielen (epi)genetische Unterschiede, welche im Rahmen der vorhergehenden Kultivierung (beeinflusst durch Passagenanzahl und -häufigkeit, Medium etc.) entstanden sind, eine Rolle.

Die für einen Großteil der Experimente verwendeten Neuro2a\_2-Zellen zeigten eine ausgeprägte neuronale Differenzierungsneigung infolge 16-20 h Kultivierung in serumfreiem Medium. In der Literatur ist beschrieben, dass Neuro2a-Zellen infolge Kultivierung in serumreduziertem Medium eine moderate Verlängerung der Neuriten im Sinne einer neuronalen Differenzierung zeigen (173,203,204). Die Differenzierung, welche durch eine relativ kurze (<24 h), alleinige Serumdeprivation in Neuro2a hervorgerufen wird, ist im Vergleich zu derjenigen durch längere Serumdeprivation in Kombination mit verschiedenen Agenzien eher gering bis moderat ausgeprägt (172,173,203–206). Für die Analyse der Neuritenretraktion ist eine mäßig ausgeprägte Differenzierung optimal, da bei längeren Neuriten die Messbarkeit durch deren Überschneidung eingeschränkt wäre. Die beschriebene Morphologie von durch Serumdeprivation differenzierten Zellen ist mit derjenigen in der Literatur gut vergleichbar (vgl. z.B. Abb. 8 in (173) sowie Abb. 1 in (203)). Unterschiede der Quantifizierung (z.B. Länge des längsten Neuriten, Anzahl Verzweigungspunkte, Prozent differenzierter Zellen (bei ungenauer Definition)) schränken jedoch die Vergleichbarkeit ein. Unterschiede zu den publizierten Arbeiten (wie z.B. die Angabe, dass nach 48 h Serumdeprivation nur <20 % der Zellen differenziert seien (205)) lassen sich vermutlich zum einen auf Unterschiede in Quantifizierung/Definition und zum anderen auf Unterschiede in Bezug auf die Zellen (z.B. Passagenanzahl) und die Kultivierungsbedingungen (z.B. genaue Zusammensetzung des verwendeten Mediums etc.) zurückführen. Es ist beschrieben, dass die Differenzierung durch alleinige Serumdeprivation ohne zusätzliche Agenzien wie Retinsäure eine gemischte Differenzierung (nicht rein dendritische oder axonale Eigenschaften) verursacht (204).

#### 4.1.2 Die Morphologie von PRG-überexprimierenden Zelllinien (s. 3.2)

##### **PrGs werden in Neuro2a zu einem geringen Niveau exprimiert (s. 3.2.1).**

Mittels qRT-PCR wurde nachgewiesen, dass für alle *PrGs* (mit nur minimalen mRNA-Mengen für *Prg3*) eine geringe basale (mRNA-)Expression mit der relativ höchsten Expression für *Prg4* und -5 vorliegt.

Die Daten ähneln denen, welche von Iwaka *et al.* (24) publiziert wurden, wobei dort nicht Referenzgene, sondern eine Standardkurve einer Plasmid-DNA bekannter Konzentration verwendet wurde, sodass die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar sind. Äquivalent zu den o.g. Ergebnissen lag die Expression von *Prg3* in dieser Arbeit unterhalb der Nachweisgrenze (24). Ebenso wie in der genannten Arbeit zeigte sich die höchste Expression für PRG4 (24). Eine (andauernd) hohe Expression von *Prg4* ist auch für (murines) Gehirngewebe während der Entwicklung beschrieben, wobei die Bedeutung von PRG4 weiterhin unklar ist (33).

Im Vergleich zu den publizierten Daten bezüglich der mRNA-Expression der PRGs im Gehirn (unabhängig vom Zeitpunkt) ist die Expression in den von mir verwendeten Neuro2a\_1-Zellen deutlich geringer (33). Selbst zu sehr frühen embryonalen Zeitpunkten (E14) liegt die mRNA-Expression für alle PRGs (außer ähnlich für PRG5) im Gehirn (33) deutlich oberhalb des Niveaus in Neuro2a.

Als Positivkontrolle für PRG3 wurde von mir murines Neocortexgewebe verwendet, worin eine PRG3-Expression nachgewiesen und damit ein komplettes Versagen der Sonde ausgeschlossen werden konnte. Die Expression lag jedoch unterhalb des Expressionslevels, welches für murines Neocortexgewebe publiziert ist (33). Woran dies liegt, ist unklar. Womöglich schwankt das Expressionslevel zwischen einzelnen Individuen oder methodische Unterschiede liegen diesen Ergebnissen zugrunde. Denkbar wäre auch, dass die cDNA aus der Datenbank während der Lagerung teilweise degradierte.

Eine geringgradige basale Expression der PRGs ist Voraussetzung dafür, dass mittels Überexpression tatsächlich Veränderungen in der Zelle hervorgerufen werden können. Gleichzeitig setzt ein sinnvolles Überexpressionsexperiment voraus, dass eine gewisse basale Expression besteht, sodass die entsprechenden Signalwege bzw. die involvierten Proteine vorhanden und aktivierbar sind. Dies ist vermutlich trotz der kaum nachweisbaren (mRNA-)Expression auch für PRG3 gegeben, da davon ausgegangen werden kann, dass sich die Signalwege der verschiedenen PRGs überschneiden (s. 1.3.3).

Da die qRT-PCR in undifferenzierten Neuro2a\_1 durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass (differenzierte) Neuro2a\_2-Zellen ein anderes Expressionsmuster aufweisen. Beispielsweise ist bekannt, dass P19-Zellen, bei denen es sich um Abkömmlinge eines embryonalen Karzinoms handelt (207), infolge der Differenzierung mit Retinsäure eine erhöhte Expression von *Prg3* aufweisen (22).

Zudem wurde die PRG-Expression in der als Referenzzelllinie verwendeten HEK293T-Zellen nicht untersucht. Aufgrund des vermutlich nichtneuronalen Ursprungs dieser Zellen (s. 3.1.2) ist ein hohes Ausmaß einer *Prg*-Expression als unwahrscheinlich anzusehen.

**Bei Überexpression werden alle PRGs außer PRG4 in HEK293T und undifferenzierten Neuro2a in der Plasmamembran exprimiert und haben teilweise Einfluss auf die Bildung von Filopodien (s. 3.2.2-3.2.5).**

Im ersten Teil meines Forschungsprojektes wurde untersucht, wo PRG2 im Vergleich zu anderen PRGs lokalisiert ist und ob eine Überexpression die Bildung von Filopodien/Neuriten/Protrusionen induziert. Der Einfluss auf die Filopodienbildung aller PRGs wurde in nichtneuronalen HEK293T-Zellen und undifferenzierten Neuro2a-Zellen beschrieben, jedoch nicht quantifiziert, sodass diesbezüglich nur Annahmen über Tendenzen getroffen werden können. Hingegen wurden die Neuriten und Protrusionen in differenzierten Neuro2a-Zellen unter PRG2/3-Überexpression quantifiziert.

Dass alle PRGs bis auf PRG4 in der Plasmamembran lokalisiert sind und an der Formation von Filopodien beteiligt sind, ist allgemein anerkannt (22,23,30,34,35,73,90,130,131). Die Lokalisation in der Plasmamembran muss

allerdings weiterhin als (wahrscheinliche, aber nicht gesicherte) Annahme gelten, denn es fehlen hochauflösende, direkte Vergleiche der Lokalisation von sicher membranständigen Proteinen mit den PRGs. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass (einzelne oder mehrere) PRGs nicht in die Plasmamembran integriert sind, sondern möglicherweise nah der Plasmamembran (z.B. in der Plasmamembran anliegenden Strukturen) lokalisiert sind.

Während die Morphologie von PRG-überexprimierender HEK-Zellen mehrfach untersucht wurde (28,30,33–35), wurde die Morphologie von PRG-überexprimierenden Neuro2a-Zellen bisher nicht in der Literatur beschrieben. Allerdings finden sich Angaben zur Morphologie von PRG-überexprimierenden N1E-115-Zellen, einer anderen Neuroblastomzelllinie (22,23,28).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Morphologie von Neuro2a- (sowie HEK293T-) Zellen im Rahmen der Überexpression aller PRGs im Vergleich zueinander und zu der Überexpression eines in der Membran lokalisierten Kontrollplasmids (CFPMem) verglichen. Im Vergleich des Fluoreszenzverteilungsmusters und der Morphologie von CFPMem- und PRG-überexprimierenden Zellen lassen sich (indirekt) Rückschlüsse auf die Lokalisation sowie die Induktion von Filopodien ziehen.

PRG1 scheint in der Plasmamembran lokalisiert zu sein und eine Überexpression ist tendenziell mit einer erhöhten Anzahl von Filopodien in HEK293T assoziiert. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Literatur, wo eine Lokalisation in der Plasmamembran (ebenfalls mit Verwendung eines membrangebundenem Kontrollplasmids (MEM-DsRed)) sowie eine Vermehrung der Filopodien (30) in PRG1-überexprimierenden HEK293T-Zellen beschrieben wurde. Die dort gezeigten Aufnahmen sind jedoch unzureichend, um eine Plasmamembranlokalisation sicher zu belegen, da Detailaufnahmen der Plasmamembran und Koloalisationsstudien fehlen (vgl. ebd., Abbildung 1G).

Bei den o.g. Experimenten wurde zunächst ein hPRG1-Konstrukt verwendet, welches nicht oder nur zu einem kleinen Anteil in die Plasmamembran eingebaut wird. Dem zugrunde liegt vermutlich eine Mutation im verwendeten Plasmid mit Einfluss auf die Aminosäuresequenz der zweiten extrazellulären Schleife (Austausch von Cystein an Stelle 222 durch Tyrosin). Das normalerweise an dieser Stelle vorliegende Cystein ist in eine Disulfidbrücke integriert. Es ist anzunehmen, dass das entstehende Protein aufgrund dieser Mutation nicht richtig gefaltet werden kann, sodass das Protein intrazellulär (z.B. im endoplasmatischen Retikulum) akkumuliert anstatt in die Plasmamembran eingebaut zu werden. Eine Verwendung dieses Plasmids in zukünftigen Studien setzt eine zielgerichtete Mutagenese voraus. Anschließend sollte die Lokalisation mittels konfokaler Mikroskopie erneut überprüft werden.

PRG2 scheint (im Vergleich zu CFPMem-überexprimierenden Zellen) ebenfalls in der Zellmembran und deren Ausstülpungen lokalisiert zu sein, wobei der Anteil an in der Plasmamembran gebundenem Protein im Vergleich zu CFPMem etwas geringer zu sein scheint. Die C-terminale Trunkierung von PRG2 reduzierte den Anteil von plasmamembrangebundenem PRG2 weiter. Die Morphologie von PRG2-überexprimierenden HEK-Zellen ist bisher nur unzureichend beschrieben (28). Für N1E-115 Zellen ist (bei Kotransfektion des membrangebundenen fGFP (farnesyliert)) beschrieben, dass PRG2 in der Plasmamembran sowie in Filopodien lokalisiert sei und eine Überexpression die Anzahl an Filopodien in diesen Zellen erhöhe (vgl. (28), Abbildung S4A-C). Es sind jedoch weder Nahaufnahmen mit Koloalisationsstudien von Membranmarker und PRG2 gezeigt noch wird eine Quantifizierung der Filopodien vorgelegt (vgl. ebd.). Dass der Transport an die Plasmamembran durch eine C-terminale Trunkierung beeinträchtigt werden kann, ist für andere PRGs beschrieben (35). Es bleibt festzuhalten, dass im Vergleich zu CFPMem und PRG3/5 eine Lokalisation in der Plasmamembran für PRG2 weniger deutlich nachweisbar ist und es nicht auszuschließen ist, dass PRG2 in Strukturen unterhalb der Plasmamembran und nicht in der Membran selbst lokalisiert ist. Insbesondere bei der Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen von PRG2-überexprimierenden,

differenzierten Neuro2a (s.o., **Abbildung 26**) entsteht dieser Eindruck. Eine mikroskopisch hochauflösende Darstellung von PRG2 sowie eines Markers der Plasmamembran könnten hier zu Klarheit verhelfen.

Für PRG3 und -5 konnte im Vergleich zu CFPMem die Annahme einer Plasmamembranlokalisation weiter unterstützt werden. Eine Vermehrung der Filopodien war in HEK293T-Zellen zu erahnen und in Neuro2a-Zellen ohne Quantifizierung nicht nachweisbar. Dies ist konsistent mit der Literatur, in welcher für HEK293-Zellen eine Lokalisation in der Plasmamembran (u.a. mittels Färbung der membranständigen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase) für PRG3 (34,35) beschrieben wurde. Allerdings sind in der Arbeit von Velmans *et al.* zum einen erneut keine Detailaufnahmen gezeigt, zum anderen sind die präsentierten Aufnahmen deshalb nur wenig überzeugend, weil die Färbung der Plasmamembran mittels des Ionenkanals weniger weit in die Peripherie der Zelle und der Fortsätze zu reichen scheint als die Färbung von PRG3 (vgl. (34), Abbildung 2D). Eine Erhöhung der Anzahl an Filopodien durch Überexpression von PRG3 und -5 ist sowohl in HEK293T-Zellen (u.a. im Vergleich zu PRG4 mit CFPMem-Kotransfektion als Membranmarker, aber nicht im direkten Vergleich mit CFPMem) (33–35) als auch in Neuroblastomzellen der Linie N1E-115 beschrieben worden (23). Leider werden auch hier keine (Nah-)Aufnahmen der PRGs unter CFPMem-Kotransfektion gezeigt, um die Plasmamembranlokalisation sicher zu belegen (vgl. (33), Abbildung 4C).

PRG4 zeigte sich in meinen Experimenten im Vergleich zu CFPMem intrazellulär lokalisiert (kein Nachweis in Filopodien). Dies entspricht den Erwartungen, da PRG4 als einziges nicht in der Membran verankertes PRG gilt (33,35). Einmalig wurde für N1E-115 Zellen behauptet, dass eine PRG4-Überexpression einen bipolaren Phänotyp verursache (ohne Angabe einer Quantifizierung) (22). Dies konnte in meinem Projekt nicht repliziert werden.

**PRG2 und -3 erhöhen die Neuritenanzahl bei gleichbleibender Neuritenlänge in differenzierten Neuro2a-Zellen. Während PRG3 in den Protrusionen lokalisiert ist und Auswirkungen auf deren Länge und Anzahl hat, ist PRG2 nur teilweise an deren Spitzen lokalisiert und hat keine Auswirkungen auf deren Länge und Anzahl (s. 3.2.6).**

In differenzierten Neuro2a\_2-Zellen zeigen sich PRG2- und -3 ebenso wie CFPMem in den Neuriten lokalisiert. Allerdings unterscheidet sich die Lokalisation innerhalb der von den Neuriten ausgehenden Protrusionen. Während PRG3 entlang des gesamten Protrusionsschaftes nachweisbar ist, zeigte sich PRG2 nur an der Basis sowie teilweise an den Spitzen der Protrusionen lokalisiert. Das C-terminal-trunkierte Konstrukt war im Vergleich zum vollständigen Protein nur vereinzelt in den Protrusionsspitzen nachweisbar.

Bei der Quantifizierung zeigte sich, dass PRG2- ebenso wie PRG3-überexprimierende Zellen eine erhöhte Anzahl an Neuriten bei gleichbleibender mittlerer Länge aufweisen. Die Überexpression der beiden Konstrukte, welche eine C-terminale GFP-Markierung bzw. eine C-terminale Trunkierung aufwiesen, war nicht mit einer Vermehrung an Neuriten assoziiert. Davon ist vermutlich abzuleiten, dass der C-Terminus an intrazellulären Prozessen beteiligt ist, welche für die Auswirkungen auf die Neuriteninduktion essentiell sind. Mutmaßlich stört nicht nur die C-terminale Trunkierung, sondern auch die GFP-Markierung die Faltung des C-Terminus und/oder die Interaktion mit intrazellulären Partnern. In der Literatur ist beschrieben, dass der C-Terminus von PRG3 ebenfalls für die Induktion von Neuriten notwendig, jedoch (auch bei Insertion in die Membran) für die vollständig unbeeinträchtigte Funktion nicht ausreichend ist (22). Bemerkenswert ist, dass der Transport in die Plasmamembran des Protrusionsschaftes nicht eine Voraussetzung für die Funktion von PRG2 bei der Induktion von Neuriten zu sein scheint.

Entsprechend der divergierenden Lokalisation innerhalb der Protrusionen unterscheidet sich auch die Auswirkung von PRG-Überexpression auf deren Anzahl und Länge. Während eine PRG3-Überexpression eine statistisch signifikante

Vermehrung der längeren Protrusionen (2-5  $\mu\text{m}$ ) und damit eine erhöhte mittlere Protrusionenlänge bewirkt, zeigt die Überexpression der drei PRG2-Konstrukte keine Auswirkungen auf die Protrusionenanzahl oder -länge.

Die Ergebnisse für PRG3 stehen in Übereinstimmung mit der Literatur. So wird berichtet, dass PRG3 die Neuritenlänge und die Anzahl von deren Verzweigungen in Neuroblastomzellen der Linie N1E-115 (22) erhöhe. Bezüglich der Auswirkungen von PRG2 auf die Anzahl und Länge der Neuriten in Neuroblastomzelllinien sind bisher keine Ergebnisse publiziert. In PC-12 Zellen, einer vom Phäochromozytom abgeleiteten Zelllinie (208), wurde die Induktion von Neuriten durch Überexpression des strukturell mit PRG2 verwandten PRG1 beschrieben (130). Auch das Lokalisationsverhalten von PRG2 in von den Neuriten ausgehenden Protrusionen wurde bisher nicht untersucht. Das von mir beobachtete Muster von PRG2-Ansammlungen an den Enden von Protrusionen ist für von Filopodien ausgehende Protrusionen nicht beschrieben (vgl. (28), Abbildung S4C). Die Beobachtung, dass die Überexpression von PRG2 die Anzahl der von Neuriten ausgehenden Verzweigungen nur geringfügig (nicht signifikant im Vergleich zu GFP) und im Vergleich zu PRG3 wesentlich weniger erhöht (vgl. (22), Abbildung S1B und C), entspricht möglicherweise meinen Beobachtungen. Inwiefern die dort gemessenen Verzweigungen den von mir gemessenen Protrusionen entsprechen, lässt sich jedoch aufgrund einer Unschärfe der dort verwendeten Definitionen nur unzureichend klären (vgl. ebd.).

Eine Limitation der durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen von Lokalisation und Morphologie sowie der Quantifizierungen ergibt sich daraus, dass die Lokalisation nur aus dem Vergleich (nicht identischer) CFPMem- und PRG-transfizierter Zellen sowie mittels Überlagerung mit der Färbung des Aktinzytoskelettes ermittelt wurde (s. oben, 4.1.2). Bei nur punktueller Lokalisation von PRG2-Konstrukten in den Protrusionen und damit fehlender Markierung von deren Plasmamembran wurde möglicherweise auch die Länge der Protrusionen unterschätzt, da das Aktinzytoskelett nicht bis zum Ende der Protrusionen verfolgbar ist.

### 4.1.3 Der LPA-induzierte Kollaps (s. 3.3)

Im zweiten Teil meines Forschungsprojektes wurde untersucht, inwiefern PRG2 Auswirkungen auf die LPA-induzierte Neuritenretraktion hat. Hierfür wurden Neuro2a-Zellen verwendet, weil für diese Zelllinie die Neuritenretraktion als Antwort auf LPA beschrieben wurde (24,69).

#### Neuro2a exprimieren alle LPA-Rezeptoren bis auf $\text{LPA}_3$ (s. 3.3.1).

Die Untersuchung der mRNA-Expression der LPA-Rezeptoren diente der Erkenntnis, welche Signalwege durch die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren in Neuro2a induziert werden können. Mittels qRT-PCR wurde nachgewiesen, dass in Neuro2a fünf der sechs bekannten G-Protein-gekoppelten LPA-Rezeptoren (alle außer *Lpar3*) exprimiert werden. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass es weitere Rezeptoren für LPA gibt, die nicht erfasst wurden (17,209,210).

Diese Ergebnisse stimmen im Wesentlichen mit den publizierten Daten überein (69,211). Entsprechend wurde durch Sun und Gotoh *et al.* in Neuro2a eine Expression der Rezeptoren *Lpar1,2,4,5* und -6 bei tendenziell geringerer Expression für *Lpar4* und -5 sowie fehlender Expression von *Lpar3* nachgewiesen (69,211). Ein Unterschied ergibt sich daraus, dass die *Lpar6*-Expression in der Literatur als deutlich höher als die *Lpar1*-Expression angegeben wird, wobei sich dies in meinen Ergebnissen nicht widerspiegelt (211).

Mit relativ hoher Expression von *Lpar1,2* und -6 und geringerer Expression von *Lpar4* ähnelt das Expressionsmuster demjenigen in Hippocampus und Neocortex während embryonaler Stadien (168). Das Expressionslevel von *Lpar3*, aber auch *Lpar5* liegt nach Suckau *et al.* während der embryonalen Entwicklung im Mausgehirn unterhalb der

Nachweisgrenze (qRT-PCR E16 bis P30 (168)). Für *Lpar3* wurde jedoch an anderer Stelle eine RNA-Expression insbesondere in späten embryonalen und frühen postnatalen Stadien im Gehirn (Northern Blot) nachgewiesen (202).

Die LPA-Rezeptoren 1-3 sind für den LPA-induzierten Kollaps von Wachstumskegeln mutmaßlich von untergeordneter Bedeutung (71). Im Gegenteil scheint insbesondere LPA-Rezeptor 3 (in Neuro2a nicht exprimiert) an der Verzweigung der Neuriten beteiligt zu sein (63). Durch den Nachweis einer Expression aller LPA-Rezeptoren außer LPA<sub>3</sub> in Neuro2a ist sichergestellt, dass zahlreiche LPA-induzierte Signalwege in Neuro2a induziert werden können – einschließlich solcher, welche Neuritenretraktion induzieren. Eine Differenzierung des Effektes der verschiedenen Rezeptoren ist unter diesen Umständen jedoch nicht möglich.

An dieser Stelle soll zudem auf Limitationen der Ergebnisse der qRT-PCR hingewiesen werden. Zum einen wurde die Testung bei undifferenzierten Neuro2a\_1-Zellen durchgeführt, eine Veränderung im Rahmen der Differenzierung und Unterschiede zu Neuro2a\_2 können nicht ausgeschlossen werden. Auch ist eine Veränderung der *Lpar*-Expression induziert durch PRG-Überexpression denkbar und wurde in meinen Untersuchungen nicht adressiert. Auch ist der Nachweis von mRNA-Expression nicht gleichzusetzen mit der tatsächlichen Proteinexpression.

#### **Die Wahl von Lösungsmittel und Puffer ist entscheidend für die valide Untersuchung von LPA-induzierter Neuritenretraktion (s. 3.3.2).**

Unerwarteterweise zeigte sich während meiner Experimente, dass die Wahl des LPA-Lösungsmittels und des Puffers von entscheidender Bedeutung ist. Bei Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels und Puffers (Krebs-Ringer's Lösung ) ohne Magnesium- und Calciumionen wird ein Zellkollaps von Neuro2a ohne Hinzugabe von LPA induziert.

Bivalente Ionen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  sind wichtige Signalmoleküle und in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert (212,213), weswegen eine eindeutige Zuordnung der Ursache dieser Beobachtung ohne Weiteres nicht möglich ist. U.a. sind diese Kationen von Bedeutung für die Wirkweise bestimmter Membranadhäsionsmoleküle (214–216). Es ist beschrieben, dass das Auswachsen von Wachstumskegeln von kultivierten Hinterstrangganglienzellen in Medium ohne Calcium reduziert ist, wobei hier keine Retraktion beschrieben wurde (217). Es ist denkbar, dass eine verringerte Zelladhäsion mit einer Destabilisierung der Neuriten und einer Retraktion einhergeht.

Auch die Verwendung von DMEM als Puffersystem während der Behandlung war mit einer hohen Rate an kollabierenden Zellen vergesellschaftet. Dies könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei DMEM um ein durch Bikarbonat gepuffertes Medium handelt, welches nur unter stabilen CO<sub>2</sub>-Bedingungen (von mind. 5 % CO<sub>2</sub>) einen stabilen pH-Wert hat (218). Dies konnte in der verwendeten Inkubationskammer mangels CO<sub>2</sub>-Anschluss nicht ermöglicht werden, sodass die Zellen einem instabilen pH-Wert ausgesetzt waren.

Die Verwendung von (Fettsäure-freiem) Albumin ermöglichte die Verwendung eines Puffers mit Magnesium- und Calciumionen. Auf diese Weise wurde schließlich ein Versuchsaufbau etabliert, mit welchem die Untersuchung einer LPA-induzierten Neuritenretraktion möglich wurde. Es soll darauf hingewiesen werden, dass Albumin die Wirkung von LPA modulieren kann (52). Albumin hemmt dabei insbesondere die Wirkung von LPA an LPA-Rezeptor 3 (vgl. ebd.), welcher in Neuro2a nicht exprimiert ist (s.o.). Mit der Verwendung von mittels Albumin gelösten LPA reihen sich meine Untersuchungen in vorige LPA-Experimente mit PRG-überexprimierenden Zellen ein (10,24). In zwei Untersuchungen mit PRG-überexprimierenden Zellen unter LPA-Bedingungen von Brogini *et al.* (22,23) wurde das LPA-Lösungsmittel nicht angegeben.

### **Neuro2a zeigen eine ausgeprägte Neuritenretraktion als Reaktion auf LPA 10 $\mu$ M (s. 3.3.3).**

Nach Etablierung dieses Versuchsaufbaus konnte in Analogie zu publizierten Ergebnissen (24,69) in meinen Experimenten gezeigt werden, dass LPA bei Konzentrationen von 5 und 10  $\mu$ M eine signifikante Neuritenretraktion in Neuro2a auslöst. In Übereinstimmung zu publizierten Daten kommt es innerhalb von 20 min nicht zu einer vollständigen Zellrundung, sondern nur zu einer Neuritenretraktion eines Anteils der Zellen (vgl. (69)). Die beobachtete Reaktion ähnelt dem Retraktionsverhalten von DIV12-Neuronen, wie sie als Reaktion auf 0,5  $\mu$ M LPA beschrieben wurden (68).

Allerdings kam es trotz Optimierung des Puffers und des Lösungsmittels auch ohne Behandlung mit LPA zu einer im Vergleich zu der LPA-induzierten Retraktion zwar geringeren, jedoch weiterhin signifikanten Reduktion der Neuritenlänge innerhalb von einem Beobachtungszeitraum von 20 min Kontrollbehandlung. Dabei handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Stressreaktion der Zellen. Vor und während der Behandlung sind die Zellen mehreren, in diesem Versuchsaufbau nicht veränderbaren Stressoren ausgesetzt (vgl. 2.2.1.2). Diese beinhalten einen Umgebungswechsel mit Temperaturschwankungen (mehrere (ca. 10) Minuten bei Raumtemperatur, anschließend bei ca. 37 °C in der Inkubationskammer), die kurzzeitige Trockenlegung der Zellen (Einbau des Deckplättchens in die Zellkammer bis zum Anschluss der Schläuche), eine veränderte extrazelluläre Umgebung durch den Wechsel des Mediums (zuvor DMEM, anschließend Krebs-Ringer's Lösung ) sowie die ständige Aussetzung der Zellen gegenüber dem Strom des fließenden Puffers. Als Reaktion auf diese Beobachtung wurden für die Analyse der LPA-induzierten Neuritenretraktion die Zellen, welche mit einem Kollaps (definiert als Reduktion der Neuritenlänge auf <20 % der ursprünglichen Länge) auf die Kontrollbehandlung reagierten, von den weiteren Analysen (der LPA-induzierten Retraktion) ausgeschlossen.

### **Die Überexpression von PRG3 und -2 scheint in Neuro2a die Neuritenretraktion durch LPA 10 $\mu$ M relevant zu reduzieren, jedoch lässt sich dieses Ergebnis bei einer Konzentration von 5 $\mu$ M nicht replizieren (s. 3.3.3).**

Bei dem Vergleich verschiedener PRG-überexprimierender Zellen mit CFPMem-überexprimierenden Kontrollzellen bei einer LPA-Konzentration von 10  $\mu$ M konnte gezeigt werden, dass PRG3 analog zur Literatur (22,24) die Neuritenretraktion von Neuro2a signifikant reduziert. Ebenso konnte erstmals gezeigt werden, dass die Überexpression eines N-terminal GFP-markierten PRG2-Plasmids ebenfalls wirkungsvoll die durch 10  $\mu$ M LPA induzierte Neuritenretraktion reduziert.

Hingegen waren das C-terminal GFP-markierte und das N-terminal GFP markierte, aber C-terminal-trunkierte Protein nicht in der Lage, die Neuritenretraktion zu modulieren. Der C-Terminus scheint somit für die Modulation von Signalwegen im Rahmen der LPA-induzierten Neuritenretraktion eine wichtige Rolle zu spielen. Auch für PRG5 wurde beschrieben, dass der C-Terminus entscheidend für die Modulation der LPA-induzierten Neuritenretraktion ist (23). Für PRG1 und -4 sind keine Daten zur Modulation LPA-induzierter Neuritenretraktion publiziert.

In Zusammenschau mit der Beobachtung, dass PRG2-überexprimierende, differenzierte Neuro2a-Zellen eine erhöhte Anzahl an Neuriten aufweisen (s.o.), ist vorstellbar, dass die durch PRG-Überexpression zusätzlich gebildeten Ausläufer stabiler gegenüber LPA-Effekten sind, z.B. aufgrund einer erhöhten Adhäsion (s.u.). Interessanterweise ist auch für die Effekte von PRG2 bei der Induktion von Neuriten der C-Terminus von Bedeutung (s.o.).

Bei einer Exposition mit LPA in einer Konzentration von 5  $\mu$ M konnten diese Ergebnisse jedoch nicht repliziert werden. Da für PRG3 die Reduktion des Neuritenkollaps bei einer LPA-Konzentration von 0,5  $\mu$ M beschrieben ist (22), lässt sich dieses Ergebnis nur unzureichend mit bisherigen Forschungsergebnissen und den daraus resultierenden Hypothesen in Einklang bringen.



Es ist anzunehmen, dass es sich bei den Ergebnissen im Rahmen der 5  $\mu$ M LPA-Behandlung nicht um einen tatsächlichen biologischen Effekt handelt, sondern um das Resultat technischer Probleme. Insbesondere fällt auf, dass zu Beginn der Messung CFPMem-überexprimierende Kontrollzellen im Vergleich zu den PRG-transfizierten Zellen eine erhöhte Gesamtneuritenlänge aufwiesen. Erhöhte Werte für die absolute und auch relative Neuritenlänge finden sich anschließend durchgehend, sodass für alle PRGs keine reduzierte Neuritenretraktion nachweisbar wurde. In der Betrachtung der Werte der PRGs untereinander finden sich analog zu den Werten im Rahmen der 10  $\mu$ M Behandlung die jeweils höchsten Werte (und damit die geringste Neuritenretraktion) für das PRG3- und das N-terminal GFP-markierte PRG2 Konstrukt.

Es stellt sich die Frage, weshalb CFPMem-transfizierten Zellen erhöhte absolute und relative Messwerte aufwiesen. Möglicherweise ist ursächlich, dass sich CFPMem als Kontrollplasmid dadurch auszeichnet, dass eine Überexpression die Zellen weniger beeinflusst/stresst, da es soweit bekannt keine intrazellulären Signalwege verändert und die Integrität der Plasmamembran durch seine geringere Größe weniger stört. Weniger „gestresste“, intakte Neuro2a-Zellen haben längere Neuriten und sind womöglich auch stabiler gegenüber äußeren Stressoren wie LPA. Zudem ist denkbar, dass möglicherweise die deutlich bessere Transfektionseffizienz für CFPMem im Vergleich zu den *Prg*-Plasmiden Auswirkungen auf die Auswahl der gemessenen Zellen gehabt hat. Da stets nach einem Ausschnitt mehrerer morphologisch gesunder, neuritentragender Zellen gesucht wurde, war bei CFPMem-transfizierten Zellen die Chance/das Risiko erhöht, dass ein Ausschnitt mit besonders gesunden Zellen mit besonders langen Neuriten gefunden wurde, was zu einer Verzerrung der Analyse beigetragen haben könnte. In der Annahme, dass Zellen mit längeren Neuriten im Allgemeinen eine reduzierte Neuritenretraktion zeigen, wurde analysiert, ob sich signifikante Unterschiede zwischen den Plasmiden ergeben, wenn alle „Ausreißer“ mit einer Neuritenlänge  $>50,00 \mu\text{m}$  oder  $<15,00 \mu\text{m}$  von der Analyse ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Auch nach dieser Adjustierung war jedoch kein signifikanter Effekt von PRG3 und -2 nachweisbar.

Zudem fällt bei Vergleich der Ergebnisse der Experimente mit 10 und 5  $\mu$ M auf, dass die Gesamtneuritenlänge zu Beginn der Messung für alle Plasmide geringer ist als zu Beginn der Behandlung mit LPA 10  $\mu$ M (s. 3.3.3, **Abbildung 36** und **Abbildung 38**). Mögliche Ursachen ergeben sich dadurch, dass zwischenzeitlich neue Zellen aufgetaut wurden und somit die Messungen mit 5  $\mu$ M teilweise mit Zellen einer jüngeren Passage durchgeführt wurden, die eventuell geringfügig andere Eigenschaften besaßen. U.a. schienen diese jüngeren Neuro2a\_2-Zellen eine etwas höhere Proliferationsrate zu besitzen, was bei gleichbleibender ausgesäter Zellzahl eine höhere Konfluenz und damit erschwerte Messbedingungen einbrachte.

Um auszuschließen, dass das LPA während der Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  degradiert sein könnte (Messungen 10  $\mu$ M Experimente Oktober/November 2022, 5  $\mu$ M Experimente Dezember/Januar 2022/23) und somit möglicherweise nicht mehr LPA-Effekte, sondern z.B. die Effekte eventueller Abbauprodukte gemessen wurden, wurde einmalig frisch gelöstes LPA und die (für ansonsten alle in Abschnitt 3.3.3 genannten Experimente verwendete) alte LPA-Charge bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M in CFPMem-transfizierten Neuro2a\_2 getestet (Daten hier nicht gezeigt). Die durch das alte LPA-Lot induzierte Neuritenretraktion zeigte sich nicht geringer ausgeprägt als der Kollaps durch das frisch gelöste, neue LPA-Lot. Die Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  scheint somit keine wesentliche Degradation bewirkt zu haben.

Zuletzt ist auf einige spezifische Gegebenheiten einzugehen, welche die Aussagekraft der vorgestellten Ergebnisse bezüglich der LPA-induzierten Neuritenretraktion einschränken. Der während meines Forschungsprojektes verwendete Versuchsaufbau (s. 2.2.2.2) hat (im Vergleich zu einem direkten Hinzupipettieren einer LPA-Lösung zu

dem Medium der Zellen in ihren Kultivierungsgefäßen) den Vorteil, dass die Zellen während der Behandlung die gesamte Zeit mit derselben Menge LPA in Kontakt kommen und so einer Verfälschung durch einen eventuellen Abbau der LPA durch LPPs etc. entgegengewirkt wird. Der Abbau von LPA könnte ansonsten zu einer reduzierten LPA-Konzentration und damit einem verringertem LPA-Effekt oder zu einer Akkumulation von Abbauprodukten, die wiederum eigene zelluläre Reaktionen bedingen könnten, führen.

Allerdings hat der verwendete Versuchsaufbau auch Nachteile. U.a. kann die Startzeit der LPA-Behandlung nur ungenau angegeben werden (Grauzone während der Vermischung der Trägerlösung und der LPA-haltigen Lösung). Des Weiteren sollte darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der Verwendung von Plastikschläuchen während der Behandlung das Risiko besteht, dass die Konzentration von LPA, welche die Zellen erreichte, geringer war als diejenige, welche zu Beginn angesetzt wurde. Zudem ist die Vergleichbarkeit mit vorhergehenden Experimenten eingeschränkt, da diese keine kontinuierliche Behandlung durchführten. Da die die Zellen tragenden Deckgläser mit Vaseline, einer fetthaltigen Creme, in der Versuchskammer befestigt wurden, muss zudem die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Inhaltsstoffe Einfluss auf die Zellen genommen haben. Dieser Effekt gilt jedoch für den gesamten Versuchsaufbau und hat somit mutmaßlich nicht zu gerichteten Fehlern beigetragen. Außerdem soll erwähnt werden, dass in meinem Versuchsaufbau die Kontrollbehandlung systematisch immer vor der LPA-Behandlung durchgeführt wurde. Die Zellen waren somit während der Kontrollbehandlung weniger Stressoren ausgesetzt als während der LPA-Behandlung (nur ein Mediumwechsel, kürzere Zeit in neuer Umgebung). Aufgrund der somit ungleichen Bedingungen kann ein Vergleich des Retraktionsverhaltens unter LPA- und Kontrollbedingungen nur eingeschränkt verwertet werden.

Da die Messung der Neuritenlänge bei dem gewählten Versuchsaufbau per Hand durchgeführt wurde, soll zudem an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass diese Messungen ohne Verblindung nur von eingeschränkter Aussagekraft sind. Mehrere methodische Gegebenheiten erschwerten die Messungen. Zu diesen Schwierigkeiten zählt eine nicht optimale Auflösung der Neuriten, welche sich während der Messung u.a. in der Z-Ebene (nach oben und unten) bewegten und damit aus dem Fokus gelangen konnten. Auch ist die Auflösung des von uns verwendeten, für Calciummessungen optimierten Mikroskops (und Objektivs, welches nicht für Phase-Kontrast Aufnahmen vorgesehen ist,) limitiert. Detailaufnahmen der Neuriten, der davon ausgehenden Protrusionen und der Wachstumskegel waren somit nicht möglich. Außerdem variieren die Neuriten von Neuro2a teilweise stark in Durchmesser und Morphologie, sodass die Abschätzung der tatsächlichen Länge der Neuriten erschwert und die Vergleichbarkeit von verschiedenen Formen von Neuriten in Frage zu stellen ist. Infolge der Retraktion verblieben zudem häufig (ähnlich der Beschreibung der Retraktion von DIV12-Neuronen (68)) dünne Neuritenreste, deren Messung aufgrund des geringen Durchmessers erschwert war. Zudem ist dieser dünne Neuritenrest möglicherweise zwar noch relativ lang, jedoch hinsichtlich des Durchmessers kollabiert, was mit Messung der Länge nicht erfasst wurde, sodass die Retraktion teilweise möglicherweise unterschätzt wurde. Alles in allem scheinen diese Probleme insbesondere zufällige Fehler zu bedingen und sind somit womöglich Teilursache der beobachteten hohen Varianz. Unterschiede zwischen den Plasmiden sind hierdurch eher nicht zu erklären, wobei nicht auszuschließen ist, dass auch zufällige Fehler bei einer insgesamt eher geringen Stichprobengröße einen gerichteten Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben könnten. Die fehlende Verblindung könnte auch zu gerichteten Fehlern beigetragen haben.

Im Vergleich zu den Messwerten der Neuritenlänge, welche in gefärbten, differenzierten Neuro2a\_2 (s. 3.2.6) erhoben wurden, ergeben sich deutliche Unterschiede zu denjenigen, welche vor Beginn der Behandlung von lebenden differenzierten Neuro2a\_2 im Rahmen der LPA-Experimente erhoben wurden (s. 3.3.3.1). Um dies einzuordnen, muss darauf hingewiesen werden, dass die Messung der Neuritenlänge während der Lebendzellmikroskopie nicht als

tatsächlich repräsentativ für die einzelne Zelle/das Plasmid eingeschätzt werden sollte, da bei der Auswahl der gemessenen Neuriten vor allem darauf geachtet wurde, dass der Neurit in seiner Gänze beurteilbar ist, also nicht durch andere Zellen überlagert, und somit ein Teil der Neuriten nicht in die Messungen mit einbezogen wurde. Eine geringgradig höhere Konfluenz der Zellen in der betrachteten Region konnte somit dazu führen, dass mehr Überlagerungen zwischen den Zellen/Neuriten vorlagen und eine geringere Neuritenlänge pro Zelle gemessen wurde. Die Neuritenlänge ist bei diesem Verfahren somit nicht repräsentativ für die Beurteilung von absoluten Unterschieden zwischen den Plasmiden zu einem bestimmten Zeitpunkt, sondern nur repräsentativ für die prozentuale Reduktion der Neuritenlänge über die Zeit. Die zusätzliche immunzytochemische Untersuchung ermöglichte eine repräsentative Erhebung der Anzahl und Länge von Neuriten in ihrem gesamten Ausmaß sowie auch der von diesen ausgehenden kurzen und dünnen Protrusionen.

Trotz der Verwendung standardisierter Werte (Neuritenlänge in %) kann nicht ausgeschlossen werden, dass Unterschiede der absoluten Werte zu Beginn der Messung auch gewisse Unterschiede in der prozentualen Reduktion bedingen. Wenn sich beispielsweise ein zu Beginn kurzer Neurit (Bsp. 5  $\mu\text{m}$ ) etwas verkürzt (Bsp. -2  $\mu\text{m}$ ), so ist eine absolut (in  $\mu\text{m}$ ) geringe Verkürzung prozentual eine recht starke Verkürzung (Bsp. auf  $3/5=60\%$ ). Die absolut selbe Verkürzung (Bsp. 2  $\mu\text{m}$ ) eines längeren Neuriten (Bsp. 20  $\mu\text{m}$ ) entspricht im Vergleich einer geringeren relativen Verkürzung (Bsp. auf  $18/20=90\%$ ). Wenn gegen Ende der Messung nur ein kurzer Neuritenstumpf bleibt (Bsp. 2  $\mu\text{m}$ ), so wird dies bei einem zu Beginn kurzem Neuriten einen prozentual höheren Wert (Bsp.  $2/5=40\%$ , scheinbar geringere Retraktion) ergeben als bei einem zu Beginn langen Neuriten (Bsp.  $2/20=10\%$ ). Diese Überlegungen bedingen ein gewisses Risiko dafür, dass die Retraktion von zu Beginn längeren Neuriten zu Beginn der Messung überschätzt und gegen Ende unterschätzt wird (umgekehrt für zu Beginn kurze Neuriten).

Letztendlich konnte mit dem Nachweis der Modulation der LPA-induzierten Neuritenretraktion bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  durch LPA ein weiterer Hinweis zugunsten der Hypothese erbracht werden, dass PRG2 LPA-induzierte Signalwege beeinflusst (s.u.). Insbesondere aufgrund der eingeschränkten Replizierbarkeit der Daten bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  sind jedoch auch die Ergebnisse bei 10  $\mu\text{M}$  allgemein kritisch zu hinterfragen und sollten unabhängig wiederholt werden.

### 4.2 Die Modulation LPA-induzierter Signalwege durch PRG2

Im Folgenden werden vorbestehende Erkenntnisse zu der Modulation LPA-induzierter Signalwege durch PRGs mit den vorgestellten Ergebnissen verknüpft und hieraus ein Modell entwickelt, wie PRG2 in den LPA-Metabolismus bzw. die durch LPA induzierten Signalwege eingreift. Mithilfe dieses Modells werden Hypothesen generiert, anhand welcher zukünftige Forschungsfragen abgeleitet werden können.

Die dargestellten Ergebnisse sind vor allem in folgender Hinsicht hochinteressant: Bisher wurde vermutet, dass PRG2 im Gegensatz zu den anderen PRGs den LPA-Effekt verstärkt/vermittelt anstatt ihn zu verringern (25,159). Dies scheint nicht generell der Fall zu sein. Auch wenn beschrieben ist, dass PRG2 die LPA-induzierte Wachstumskegelwendung vermittelt (20), scheint PRG2 gleichzeitig die LPA-induzierte Neuritenretraktion zu verringern (s.o., insb. Abschnitt 3.3.3.e). Die genannten Ergebnisse deuten darauf hin, dass PRG2 kein alleiniger Hemmer oder Aktivator LPA-induzierter Prozesse ist, sondern vielmehr ein Modulator. Im Rahmen dieser Modulation greift PRG2 mutmaßlich auf mehreren Ebenen in LPA-induzierte Signalwege ein. Da die beschriebene Wachstumskegelwendung bei sehr niedrigen Konzentrationen (nM) (20), die Untersuchungen der Neuritenretraktion jedoch unter (pathologisch) hohen Konzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) durchgeführt wurden, ist vorstellbar, dass die Modulation

konzentrationsabhängig ist. Die Details der Modulation via Interaktion mit Proteinen und Lipiden ist bisher nur in Bruchteilen verstanden. Im Folgenden sollen vielversprechende Theorien zu einem Modell zusammengefasst werden.

### **Modulation verschiedener intrazellulärer Signalwege durch PRG2**

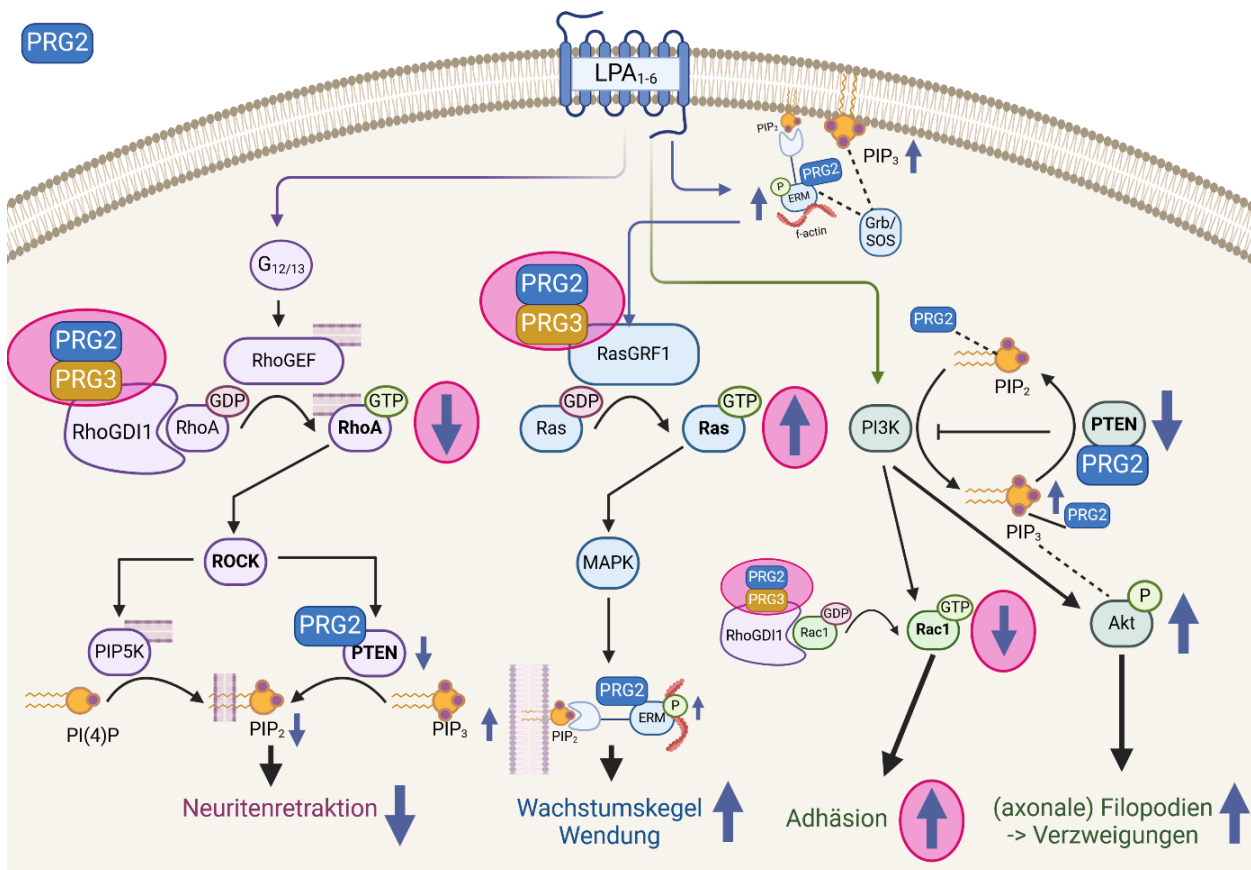
Es ist anzunehmen, dass PRG2 in mehrere durch LPA induzierte Signalwege eingreift und dabei diejenigen fördert, welche Filopodienformation, Adhäsion und Wachstumskegelwendung induzieren, und jene, welche Neuritenretraktion initiieren, hemmt (s. 3.3.3, **Abbildung 39**). Womöglich werden die einzelnen Signalwege abhängig von der LPA-Konzentrationen bei variierender LPA-Sensitivität der LPA-Rezeptoren in verschiedenem Ausmaß aktiviert. Unter Umständen wird der Neuritenretraktion induzierende RhoA-ROCK-Signalweg erst bei höheren Konzentrationen aktiviert als der die Wachstumskegelwendung induzierende Ras-MAPK-Signalweg. So ist bekannt, dass die LPA-Rezeptoren unterschiedlich sensitiv auf verschiedene Formen von LPA (51) und unterschiedlich auf LPA reagieren, je nachdem ob es an Albumin gebunden ist oder nicht (52).

Es kann vermutet werden, dass PRG2 analog zu PRG3 und -5 via Inhibition des RhoA-ROCK Signalweges (22–24) die LPA-induzierte Neuritenretraktion verringert. Insbesondere zwei Interaktionen mit dem RhoA-ROCK Signalweg sind als wahrscheinlich zu erachten. Zum einen ist beschrieben, dass PRG3 an RhoGDI1 bindet und dadurch die Aktivierung von RhoA hemmt/verzögert (24). Da beschrieben ist, dass PRG3 mit anderen PRGs einschließlich PRG2 Heteromultimere bildet (37), ist denkbar, dass PRG2 indirekt (im Rahmen des Multimers) oder auch ebenfalls direkt die Wirkung von RhoGDI1 verstärkt. Die Tatsache, dass die alleinige Überexpression von PRG2 die Neuritenretraktion reduziert (s.o.), spricht dafür, dass eine indirekte Wirkung auf RhoA über den Heteromultimer mit PRG3 zumindest nicht die einzige Wirkweise von PRG2 ist. Die zweite als wahrscheinlich anzusehene Interaktion mit dem RhoA-ROCK-Signalweg ist weiter abwärts des Signalweges im Bereich des intrazellulären Lipidmetabolismus anzusiedeln. Es ist beschrieben, dass PRG2 die Phosphatase PTEN hemmt (28). Durch Hemmung von PTEN erhöht sich der Anteil von  $\text{PIP}_3$  und es reduziert sich der Anteil von (Plasma-Membran-gebundenem)  $\text{PIP}_2$ . Eventuell besteht eine Analogie zu der  $\text{PIP}_2$ -Translokation, welche für PRG3 beschrieben wurde (22). Die Reduktion von  $\text{PIP}_2$  an der Plasmamembran steht der Wirkung eines der Haupteffektoren von ROCK, der PIP5K (s. 1.3.3, **Abbildung 6**), welche  $\text{PIP}_2$  bildet, entgegen.

Ursächlich für die Modulation der LPA-induzierten Wachstumskegelwendung hingegen ist, wie beschrieben, eine Interaktion von PRG2 mit dem ERM-Protein Radixin (20) – vermutlich im Rahmen des Ras-Signalweges. Über eine direkte Interaktion von PRG2 mit Radixin wird die Phosphorylierung erhöht und es kommt zur asymmetrischen Akkumulation mit Wachstumskegelwendung (20). Für PRG3 ist beschrieben, dass es den Ras-Signalweg mittels Interaktion mit RasGRF fördert (22). Für PRG2 ist ebenfalls eine (in)direkte Wirkung denkbar. Zudem hat auch die Inhibierung von PTEN Einfluss auf die Aktivierung des Ras-Signalweges. Denn für die Aktivierung von Ras ist die Kooperation verschiedener Proteine an der Plasmamembran notwendig, wobei  $\text{PIP}_3$ , welches infolge PTEN-Inhibierung vermehrt gebildet wird, als Ankermolekül essentiell ist (86,87).

Mittels PTEN-Inhibierung wird zudem der PI3K-Signalweg gefördert, wobei allerdings einer der abgeleiteten Signalwege, nämlich der Rac1-Signalweg, durch PRG3 erneut durch Interaktion mit RhoGDI (und somit womöglich auch (in)direkt durch PRG2) gehemmt wird (24). Gefördert wird durch eine PTEN-Inhibierung vermutlich auch der Akt-Signalweg (s. 1.3.3, **Abbildung 7**). Es ist bekannt, dass Akt das insbesondere axonal lokalisierte Enzym GSK-3 $\beta$  (219) hemmt, wodurch Neuritenretraktion (69) durch Interaktion mit den Microtubuli reduziert und axonale Regeneration gefördert werden könnte (93,220,221). Es wäre hochinteressant zu untersuchen, ob PRG2 (und andere PRGs) eine Inhibierung von GSK-3 $\beta$  bewirken, insbesondere auch deshalb, weil der alternative mTOR-Signalweg

weniger bedeutsam für die durch PRG(3/5) induzierten morphologischen Veränderungen zu sein scheint ((37) und unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe (experimentelle Leitung: Danara Vonk)). Die Förderung des PI3K-Signalweges wurde als ursächlich für die durch PRG2 induzierte Bildung von (axonalen) Filopodien (und deren Verzweigungen) erkannt (28) und potentiell auch für die in dieser Arbeit beschriebene Ausbildung von Neuriten in Neuroblastomzelllinien.



**Abbildung 39: Mögliche Interaktionen von PRG2 mit dem LPA-Metabolismus:** pink: bisher nicht experimentell bestätigt, Hypothese aufgrund von bisherigen Ergebnissen (s. Text). Referenzen s. Abbildungen in Abschnitt 1.3.3 sowie Text. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

#### Interaktion mit verschiedenen Akteuren innerhalb oder nahe der (Plasma-)Membran

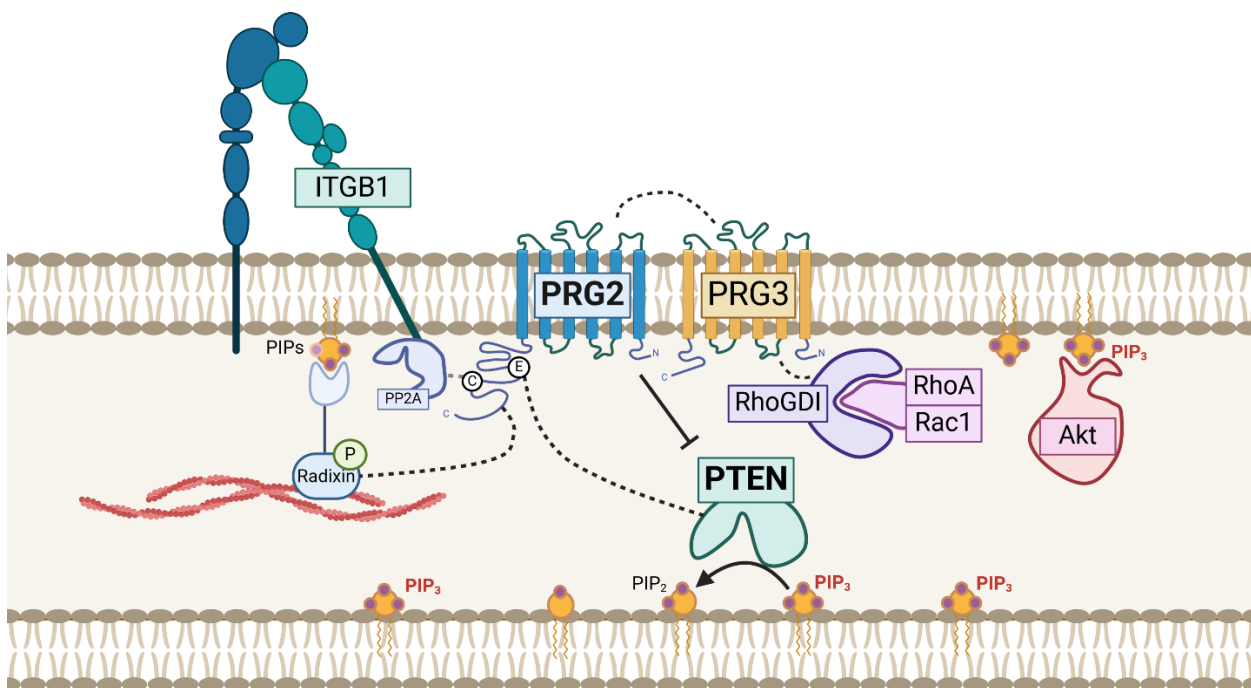
Das vermutlich membrangebundene PRG2 interagiert mutmaßlich mit verschiedenen Akteuren nahe der (Plasma-)Membran (und intrazellulären Membranen), wobei der C-Terminus für mehrere der Interaktionen eine wichtige Rolle zu spielen scheint (s. **Abbildung 40**, eigene Arbeit (s.o.) und (28,30)). Die Inhibition von PTEN ist vermutlich für PRG2 einzigartig unter den PRGs, da für die Interaktion die Glutamat-reiche Poly-E-Region des C-Terminus wichtig zu sein scheint (28), wobei nicht beschrieben ist, worauf die Interaktion molekular basiert.

Es ist vorstellbar, dass PRG2 über eine (in)direkte Interaktion mit Bestandteilen von Adhäsionskomplexen die Adhäsion insbesondere von Neuriten fördert und damit deren Stabilität (u.a. gegen LPA) erhöht. Da für PRG1 beschrieben ist, dass dieses Protein via eines Calmodulin-bindenden Abschnitts des C-Terminus mit PP2A und dadurch mit Integrinen interagiert (29,30) und PRG2 bei hoher struktureller Ähnlichkeit des C-Terminus vermutlich ebenfalls einen Calmodulin-bindenden Anteil im C-Terminus aufweist (25), ist hier eine ähnliche Form der Interaktion nicht unwahrscheinlich.

Denkbar erscheint zudem, dass PRG2 ebenso wie das strukturell hochgradig verwandte PRG1 (26,74) in der Lage ist, LPA in die Zelle zu transportieren. Dies könnte mittels Verwendung fluorophormarkierter LPA untersucht werden, wobei hier die Verwendung von primären Neuronen mit *Prgr1/2*-KO (in Analogie zu den durchgeführten Experimenten mit PRG1) einer Überexpression vorzuziehen wäre (s. 2.2.1.3).

Da für PRG2 beschrieben ist, dass es die axonale Verzweigung fördert, ist interessant, ob eine Interaktion mit LPA<sub>3</sub>-Gq-Signalwegen besteht. Denn dieser Rezeptor ist für die Induktion der Verzweigung neuronaler Fortsätze bekannt (63) und nicht in die Aktivierung von RhoA-ROCK-Signalwegen eingebunden (222). Unter (spezifischen) Bedingungen, welche eine LPA<sub>3</sub>-Aktivität erhöhen (bestimmte LPA-Formen, keine Bindung an Albumin (51,52)), könnten PRGs einschließlich PRG2 diese Signalwege zusätzlich fördern/modulieren. Interessanterweise wird LPA<sub>3</sub> auch in reproduktiven Organen wie dem Hoden (50,202) exprimiert, wobei dort auch verschiedener PRGs einschließlich PRG2 exprimiert werden (38).

Zudem ist von hohem Interesse, inwiefern die verschiedenen PRGs in Rahmen einer (Homo- und/oder) Heteromultimerisation zusammenwirken (37), einander ergänzen und möglicherweise auch gegenseitig steuern. Von besonderer Bedeutung ist vermutlich die Interaktion der beiden vornehmlich axonal lokalisierten Proteinen PRG2 und 3 (28,34).



**Abbildung 40: Mögliche Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen, in welche PRG2 involviert sein könnte:** Referenzen s. Abbildungen in Abschnitt 1.3.3 sowie Text. Gestrichelte Linien symbolisieren eine direkte Bindung. **ITGB1**: Integrin Beta1. **PIP**: Phosphatidylinositol. **PP2A**: Protein phosphatase 2A. **C**: Calmodulin-bindende Region. **E**: Glutamat-reiche Region. **PTEN**: Phosphatase and Tensin Homolog. **RhoGDI**: Rho Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor. Erstellt mit BioRender.com

### Ungelöste Fragen und scheinbare Widersprüche

Es stellen sich einige bisher unlösbare Fragen, welche aus scheinbaren Widersprüchen bisheriger Forschungsergebnisse resultieren. Davon sollen einige erwähnt werden.

U.a. ist irritierend, dass die ERM einerseits im Rahmen des RhoA-ROCK (durch PRG2 mutmaßlich gehemmt) phosphoryliert werden (81), andererseits die Phosphorylierung von Radixin (einem der ERM-Proteine,) durch PRG2 verstärkt wird (20). Im Gegensatz dazu ist für PRG3 beschrieben, dass es die Phosphorylierung von ERM-Proteinen

infolge LPA-Behandlung reduziert (24). Allerdings wurde hier zwischen den verschiedenen ERM-Proteinen nicht differenziert (vgl. ebd., Abbildung S4). ERM-Proteine benötigen nach Angaben der Literatur PIP<sub>2</sub> als Anker-molekül, ohne welches eine Aktivierung und Phosphorylierung nicht gelingt (78,101,102,223). Interessanterweise wurde dies für Ezrin und Moesin wiederholt beschrieben (vgl. ebd.), nicht aber für Radixin. Aufgrund der gleichzeitigen Förderung der Phosphorylierung von Radixin und PTEN-Inhibition durch PRG2 lässt sich spekulieren, dass Radixin möglicherweise eine Sonderrolle innerhalb der ERM-Gruppe einnimmt und nicht PIP<sub>2</sub>, sondern PIP<sub>3</sub> als Anker-molekül bindet.

Da bekannt ist, dass eine PTEN-Inhibition die Abwendung von axonalen Wachstumskegeln von Regionen mit einer höheren Konzentration an Myelin-assoziiertem Glykoprotein, einem Chemorepellent, stören kann (158), erscheint widersprüchlich, dass die LPA-induzierte Abwendung durch einen PTEN-Inhibitor wie PRG2 vermittelt werden kann (20). Inwiefern Phosphatidylinositolphosphate im Rahmen der LPA-induzierten Wendung/Retraktion eine Rolle spielen, ist noch nicht endgültig verstanden, die Informationen bezüglich der Rolle von PIP<sub>2</sub> sind teilweise widersprüchlich (22,76).



## 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse meines Forschungsprojektes festigen die Hypothese, dass PRG2 als Modulator von Signalwegen, welche u.a. durch LPA beeinflusst werden, fungiert. Neben PRG1,3 und -5 (10,22–24) scheint auch PRG2 in der Lage zu sein, die LPA-abhängige Neuritenretraktion in Neuro2a-Zellen zu reduzieren. Zudem deuten meine Ergebnisse darauf hin, dass PRG2 ein geringfügig anderes Lokalisationsmuster aufweist als das verwandte PRG3 und Auswirkungen auf die Bildung von Neuriten, jedoch nicht auf die Bildung von Protrusionen in Neuro2a hat.

Es verdichten sich damit die Hinweise dafür, dass PRG2 ein wichtiger Modulator intrinsischer und extrinsischer Faktoren ist, welche während der Entwicklung das Auswachsen und Vernetzen von Neuriten/Axonon ermöglichen und welche infolge Neurotraumata oder neurodegenerativer Erkrankungen eine Regeneration erschweren bis verhindern (vgl. (6)). PRG2 ist damit ein Kandidat im Forschungsfeld der Neuroregeneration. PRG2 ist (neben PRG3) als axonales Protein von hohem Interesse für die Forschung bezüglich der Förderung von axonaler Regeneration. Als (vermutlich einziger) PTEN-Inhibitor unter den PRGs greift PRG2 in essentielle zelluläre Prozesse ein, welche mutmaßlich zusätzlich durch die Interaktion mit weiteren Proteinen in Kooperation mit anderen PRGs moduliert werden. Damit werden intrinsische wachstum-inhibierende Faktoren und extrinsisch hemmende Faktoren wie LPA in ihrem Einfluss moduliert.

Zukünftig denkbar ist die Entwicklung von Medikamenten, welche entweder PRG2 selbst beeinflussen (aktivieren) oder die molekularen Mechanismen aufgreifen, mit welchen PRG2 Signalwege moduliert. Eine Beeinflussung von PRG2 könnte günstige Effekte von PTEN-Inhibitoren und ATX-Inhibitoren auf die Neuroregeneration kombinieren. Dies ist u.a. auch für die Anwendung in der Prä-/Perinatalmedizin interessant. ATX-Inhibitoren können zu diesem Zeitpunkt nicht bedenkenlos verwendet werden, da ein ATX-KO bei Mäusen zu schwersten embryonalen Entwicklungsstörungen führte (117,118). Auf indirektem Wege könnte via PRG2 möglicherweise Einfluss auf schädliche Effekte von hohen LPA-Konzentrationen im Gehirn z.B. infolge Hirnblutungen (146) genommen werden.

Bevor jedoch Strategien zur medikamentösen Beeinflussung von PRG2 entwickelt werden können, müssen offene Fragen der molekularen Wirkweise geklärt werden. Zudem ist der Einfluss von PRG2 auf andere neuronale und nichtneuronale Zelltypen zu untersuchen, um zum einen mögliche Nebenwirkungen, zum anderen weitere Anwendungsbereiche zu eruieren. U.a. könnte PRG2 auch als möglicher Modulator (LPA-vermittelter) immunologischer Phänomene z.B. im Rahmen der multiplen Sklerose (224) fungieren. Die Beeinflussung von Signalwegen, welche durch ein LPA-verwandtes Phospholipid namens Sphingosin-1-phosphat induziert werden, wird heute erfolgreich zur Therapie der Multiplen Sklerose (225,226) eingesetzt. Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Krebstherapie, denn LPA sind als Signalmoleküle im Rahmen von Prozessen bekannt, welche die malignen Eigenschaften von Tumoren fördern (227,228) und Veränderungen im Expressionsmuster von PRGs einschließlich PRG2 in malignen Tumoren sind beschrieben (43,44).

## 6 Zusammenfassung/Summary

### Deutsch:

**Hintergrund:** PRGs (Plasticity Related Genes) sind eine Klasse von Transmembranproteinen, welche an der Ausbildung, Differenzierung und Stabilisierung neuronaler Ausläufer während Entwicklung und Regeneration neuronaler Netzwerke beteiligt sind. Sie erfüllen ihre Funktion in der Interaktion mit Lipidphosphaten wie Lysophosphatidsäuren (LPA). Für PRG1,-3 und -5 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieser Proteine die Retraktion von Neuriten als Reaktion auf hohe LPA-Konzentrationen, wie sie u.a. infolge von Neurotraumata auftreten, reduzieren. Für PRG2 wurde eine Interaktion mit LPA während der Entwicklung des Nervensystems nachgewiesen, es fehlen jedoch Daten zu der Interaktion von PRG2 mit LPA im Rahmen von pathologischen Umständen mit abnorm hohen LPA-Konzentrationen.

**Methoden:** Genexpressionsanalysen von PRGs dienten als Grundlage für die Untersuchung der Folgen von PRG-Überexpression in Neuro2a als Modellorganismen für neuronale Zellen. Die Lokalisation der PRGs sowie die durch Überexpression induzierte Morphologie wurde mithilfe immunzytochemischer Verfahren in undifferenzierten und differenzierten Neuro2a untersucht. Mittels qRT-PCR wurde die Expression der LPA-Rezeptoren LPA<sub>1-6</sub> in Neuro2a ermittelt. Lebendzellmikroskopie diente der Untersuchung der Auswirkungen von PRG2-Überexpression im Vergleich zu einem membrangebundenen Kontrollplasmid und PRG3 auf die durch abnorm hohe LPA-Konzentrationen hervorgerufene Neuritenretraktion in Neuro2a in Echtzeit. Die Verwendung verschiedener PRG2-Konstrukte diente der Differenzierung von Interaktionen, welche (un)abhängig vom intrazellulären C-Terminus geschehen.

**Resultate:** Alle PRGs bis auf PRG3 sind in Neuro2a zu einem geringen Level exprimiert, sodass Überexpressionsstudien sinnvoll angewendet werden können. PRG2 ist in Neuro2a in der Plasmamembran lokalisiert, wobei eine C-terminale Trunkierung den Transport zur Plasmamembran zu stören scheint. In differenzierten Neuro2a sind PRG2 und -3 in den Neuriten lokalisiert und ihre Überexpression ist mit einer erhöhten Anzahl an Neuriten bei gleichbleibender Länge assoziiert. Jedoch unterscheidet sich die Lokalisation innerhalb der von den Neuriten ausgehenden Protrusionen. Während PRG3 entlang der gesamten Länge der Protrusionen zu finden ist und bei Überexpression deren mittlere Länge erhöht, ist PRG2 nur an deren Enden lokalisiert und hat keine Auswirkungen auf deren Länge oder Anzahl. Bei Expression aller LPA-Rezeptoren außer *Lpar3* in Neuro2a kommt es infolge einer Behandlung mit LPA 10  $\mu$ M zu einer Neuritenretraktion. Diese wird durch Überexpression von PRG3-eGFP sowie eGFP-PRG2 abgemildert. Der C-Terminus von PRG2 scheint sowohl für die Ausbildung der Neuriten als auch für deren Stabilisierung unter LPA-Behandlung von Bedeutung zu sein.

**Schlussfolgerung:** Die vorliegende Arbeit zeigt PRG2 als einen vielversprechenden Kandidaten im Rahmen der Modulation LPA-induzierter Signalwege. Die weitere Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen und ihrer Bedeutung für Entwicklung und Regeneration neuronaler Netzwerke ist von hohem Interesse.

**Englisch:**

**Background:** PRGs (Plasticity Related Genes) are transmembrane proteins, that contribute to the generation, differentiation and stabilization of neuronal protrusions during development and regeneration of neuronal networks. They fulfil their function via interaction with lipid phosphates such as lysophosphatidic acid (LPA). PRG1,3 and 5 were shown to limit neurite retraction of neuronal cells in response to high LPA concentrations, that are also present after neurotrauma in the injured brain. PRG2 was shown to interact with LPA during embryonal development, but there is no data available about the function of PRG2 within the scope of pathological circumstances with abnormal high LPA levels.

**Methods:** The analysis of mRNA expression of PRGs was performed as a basis for overexpression studies in Neuro2a, a neuroblastoma cell line, that was used as a model for neuronal cells. Immunocytochemistry was used to analyse protein localization and morphology in PRG overexpressing undifferentiated and differentiated Neuro2a cells in comparison to a membrane bound control plasmid. Via qRT PCR the mRNA expression levels of the LPA receptors LPA<sub>1-6</sub> were determined. The effect of PRG2 overexpression on neurite retraction in Neuro2a caused by abnorm high LPA concentrations was tracked in real-time in a livecellimaging approach in comparison to a membrane-bound control and PRG3. Various PRG2 constructs were use to find out which interactions were (in)dependend of the intracellular C-terminus.

**Results:** All PRGs apart from PRG3 are expressed at a minimal level in Neuro2a what makes overexpression studies a useful approach. PRG2 is localized in the plasma membrane of Neuro2a although a C-terminal trunkation seems to disturb protein transfer to the plasma membrane. After differentiation of Neuro2a PRG2 as well as PRG3 are localized in the neurites and overexpression of both PRGs increases the number of neurites without elevating their length. However, localization within the protrusions sprouting out of the neurites differs. PRG3 can be found at the protrusion shaft and tip, but PRG2 is only partially found at the protrusion tips and does not influence their length or number. In response to LPA 10  $\mu$ M neurite retraction in Neuro2a can be observed on the basis of mRNA expression of all LPA receptors despite of *Lpar3*. Overexpression of PRG3-eGFP and eGFP-PRG2 results in an attenuation of neurite retraction in response to LPA 10  $\mu$ M. The intracellular C-terminus of PRG2 seams to be important for initiation of neurites and their stabilization in a LPA rich environment.

**Conclusions:** This research project shows PRG2 to be a promising candidate for the modulation of LPA induced signalling cascades. Further investigations of the underlying mechanisms and their relevance during developmental and regeneration processes in the central nervous system are needed.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Anja Bräuer für die Bereitstellung des Themas, die Ermöglichung der Durchführung des Forschungsprojektes in ihrer Arbeitsgruppe sowie die geduldige, konstruktive und hilfreiche Unterstützung bei der Planung, Auswertung und kritischen Diskussion der Experimente herzlich bedanken.

Zudem gilt mein großer Dank Frau Dr. Nicola Brandt, welche mir bereitwillig immer wieder mit Rat und Tat zur Seite stand und mich unter anderem in die Lebendzellmikroskopie, das Herzstück meiner Arbeit, einführte.

Bei Herrn Prof. Dr. Torsten Plösch und Herrn Prof. Dr. Axel Heep möchte ich mich sehr herzlich für ihre erbauliche, zielführende und wertvolle Hilfe im Prozess bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Jennifer Sevecke-Rave sowie Beate Bous, welche sich die Zeit nahmen, mich in eine Großzahl der zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden einzuweisen.

Franziska Köper und Danara Vonk verdanke ich zahlreiche Möglichkeiten des Austauschs in Hinblick auf kleinere und größere Fragen des Laboralltags sowie die Einarbeitung in die Immunzytochemie und die konfokale Mikroskopie.

Herrn Dr. Jens Hausmann möchte ich für sein Mitdenken und die fachliche Unterstützung insbesondere bei der Strukturanalyse der PRG1-Konstrukte danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich zudem für die wertschätzende, warme und wohltuende Atmosphäre danken, durch welche das „Mensch-ärger-Dich-nicht“-Spiel des Laboralltags zur täglichen Freude wurde.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich herzlich für die Begleitung während der Zeit meines Forschungsprojektes, für die Aufmunterung beim Misslingen ebenso wie die geteilte Freude beim Gelingen von Experimenten.

## Literaturverzeichnis

1. Kihara Y, Maceyka M, Spiegel S, Chun J. Lysophospholipid receptor nomenclature review: IUPHAR Review 8. *Br J Pharmacol.* August 2014;171(15):3575–94.
2. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science.* Oktober 2018;362(6411):181–5.
3. Sutherland TC, Geoffroy CG. The Influence of Neuron-Extrinsic Factors and Aging on Injury Progression and Axonal Repair in the Central Nervous System. *Front Cell Dev Biol.* März 2020;8:190.
4. Akram R, Anwar H, Javed MS, Rasul A, Imran A, Malik SA, u. a. Axonal Regeneration: Underlying Molecular Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Biomedicines.* Dezember 2022;10(12):3186.
5. Fawcett JW, Verhaagen J. Intrinsic Determinants of Axon Regeneration. *Dev Neurobiol.* Oktober 2018;78(10):890–7.
6. Nieuwenhuis B, Eva R. Promoting axon regeneration in the central nervous system by increasing PI3-kinase signaling. *Neural Regen Res.* Juni 2022;17(6):1172.
7. Hara Y. Brain plasticity and rehabilitation in stroke patients. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi.* Dezember 2015;82(1):4–13.
8. Sandrow-Feinberg HR, Houlié JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. *Brain Res.* September 2015;1619:12–21.
9. Hilton BJ, Bradke F. Can injured adult CNS axons regenerate by recapitulating development? *Dev Camb Engl.* Oktober 2017;144(19):3417–29.
10. Bräuer AU, Savaskan NE, Kühn H, Prehn S, Ninnemann O, Nitsch R. A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. *Nat Neurosci.* Juni 2003;6(6):572–8.
11. McDermott MI, Sigal YJ, Sciorra VA, Morris AJ. Is PRG-1 a new lipid phosphatase? *Nat Neurosci.* August 2004;7(8):789; author reply 789–790.
12. Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem.* 2008;49:241–68.
13. Muller MP, Jiang T, Sun C, Lihan M, Pant S, Mahinthichaichan P, u. a. Characterization of Lipid-Protein Interactions and Lipid-Mediated Modulation of Membrane Protein Function through Molecular Simulation. *Chem Rev.* 8. Mai 2019;119(9):6086–161.
14. Sheetz MP, Sable JE, Döbereiner HG. Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2006;35:417–34.
15. Lewis TL, Courchet J, Polleux F. Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J Cell Biol.* 16. September 2013;202(6):837–48.
16. Vainchtein ID, Molofsky AV. Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci.* März 2020;43(3):144–54.
17. Geraldo LHM, Spohr TCL de S, Amaral RF do, Fonseca ACC da, Garcia C, Mendes F de A, u. a. Role of lysophosphatidic acid and its receptors in health and disease: novel therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther.* 1. Februar 2021;6(1):45.
18. Birgbauer E. Lysophosphatidic Acid Signalling in Nervous System Development and Function. *Neuromolecular Med.* März 2021;23(1):68–85.
19. Yung YC, Stoddard NC, Mirendil H, Chun J. Lysophosphatidic Acid signaling in the nervous system. *Neuron.* 18. Februar 2015;85(4):669–82.

20. Cheng J, Sahani S, Hausrat TJ, Yang JW, Ji H, Schmarowski N, u. a. Precise Somatotopic Thalamocortical Axon Guidance Depends on LPA-Mediated PRG-2/Radixin Signaling. *Neuron*. Oktober 2016;92(1):126–42.
21. Savaskan NE, Rocha L, Kotter MR, Baer A, Lubec G, van Meeteren LA, u. a. Autotaxin (NPP-2) in the brain: cell type-specific expression and regulation during development and after neurotrauma. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Januar 2007;64(2):230–43.
22. Broggini T, Schnell L, Ghoochani A, Mateos JM, Buchfelder M, Wiendieck K, u. a. Plasticity Related Gene 3 (PRG3) overcomes myelin-associated growth inhibition and promotes functional recovery after spinal cord injury. *Aging*. 15. Oktober 2016;8(10):2463–87.
23. Broggini T, Nitsch R, Savaskan NE. Plasticity-related gene 5 (PRG5) induces filopodia and neurite growth and impedes lysophosphatidic acid- and nogo-A-mediated axonal retraction. *Mol Biol Cell*. 15. Februar 2010;21(4):521–37.
24. Agbaegbu Iweka C, Hussein RK, Yu P, Katagiri Y, Geller HM. The lipid phosphatase-like protein PLPPR1 associates with RhoGDI1 to modulate RhoA activation in response to axon growth inhibitory molecules. *J Neurochem*. Mai 2021;157(3):494–507.
25. Fuchs J, Bareesel S, Kroon C, Polyzou A, Eickholt BJ, Leondaritis G. Plasma membrane phospholipid phosphatase-related proteins as pleiotropic regulators of neuron growth and excitability. *Front Mol Neurosci*. 15. September 2022;15:984655.
26. Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, u. a. Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell*. 18. September 2009;138(6):1222–35.
27. Bräuer AU, Nitsch R. Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. *Biochim Biophys Acta*. September 2008;1781(9):595–600.
28. Brosig A, Fuchs J, Ipek F, Kroon C, Schrötter S, Vadhvani M, u. a. The Axonal Membrane Protein PRG2 Inhibits PTEN and Directs Growth to Branches. *Cell Rep*. November 2019;29(7):2028–2040.e8.
29. Tokumitsu H, Hatano N, Tsuchiya M, Yurimoto S, Fujimoto T, Ohara N, u. a. Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein. *Biochem J*. 1. Oktober 2010;431(1):81–91.
30. Liu X, Huai J, Endle H, Schlüter L, Fan W, Li Y, u. a. PRG-1 Regulates Synaptic Plasticity via Intracellular PP2A/ $\beta$ 1-Integrin Signaling. *Dev Cell*. August 2016;38(3):275–90.
31. Tang X, Benesch MGK, Brindley DN. Lipid phosphate phosphatases and their roles in mammalian physiology and pathology. *J Lipid Res*. November 2015;56(11):2048–60.
32. Sigal YJ, McDERMOTT MI, Morris AJ. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J*. 15. April 2005;387(2):281–93.
33. Gross I, Tschigor T, Salman AL, Yang F, Luo J, Vonk D, u. a. Systematic expression analysis of plasticity-related genes in mouse brain development brings PRG4 into play. *Dev Dyn*. April 2022;251(4):714–28.
34. Velmans T, Bettefeld A, Geist B, Farrés AS, Strauss U, Bräuer AU. Plasticity-related gene 3 promotes neurite shaft protrusion. *BMC Neurosci*. 19. März 2013;14:36.
35. Brandt N, Willmer JP, Ayon-Olivas MS, Banicka V, Witt M, Wree A, u. a. PRG3 and PRG5 C-Termini: Important Players in Early Neuronal Differentiation. *Int J Mol Sci*. 27. Oktober 2022;23(21):13007.
36. Coiro P, Stoenica L, Strauss U, Bräuer AU. Plasticity-related Gene 5 Promotes Spine Formation in Murine Hippocampal Neurons. *J Biol Chem*. September 2014;289(36):24956–70.
37. Yu P, Agbaegbu C, Malide DA, Wu X, Katagiri Y, Hammer JA, u. a. Cooperative interactions of LPPR/PRG family members in membrane localization and alteration of cellular morphology. *J Cell Sci*. 1. Januar 2015;jcs.169789.

38. Tan K, Song HW, Thompson M, Munyoki S, Sukhwani M, Hsieh TC, u. a. Transcriptome profiling reveals signaling conditions dictating human spermatogonia fate in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 28. Juli 2020;117(30):17832–41.
39. Peeva GP, Angelova SK, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Irintchev A, Schütz U, u. a. Improved outcome of facial nerve repair in rats is associated with enhanced regenerative response of motoneurons and augmented neocortical plasticity. *Eur J Neurosci*. Oktober 2006;24(8):2152–62.
40. Fan Z, Bittermann-Rummel P, Yakubov E, Chen D, Broggini T, Sehm T, u. a. PRG3 induces Ras-dependent oncogenic cooperation in gliomas. *Oncotarget*. 3. Mai 2016;7(18):26692–708.
41. Bao Y, Wang L, Shi L, Yun F, Liu X, Chen Y, u. a. Transcriptome profiling revealed multiple genes and ECM-receptor interaction pathways that may be associated with breast cancer. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24:38.
42. Aaberg-Jessen C, Sørensen MD, Matos ALSA, Moreira JM, Brünner N, Knudsen A, u. a. Co-expression of TIMP-1 and its cell surface binding partner CD63 in glioblastomas. *BMC Cancer*. 9. März 2018;18(1):270.
43. Stange L, Lucia KE, Ghori A, Vajkoczy P, Czabanka M, Broggini T. LPPR5 Expression in Glioma Affects Growth, Vascular Architecture, and Sunitinib Resistance. *Int J Mol Sci*. 13. März 2022;23(6):3108.
44. Orentas RJ, Yang JJ, Wen X, Wei JS, Mackall CL, Khan J. Identification of cell surface proteins as potential immunotherapy targets in 12 pediatric cancers. *Front Oncol*. 2012;2:194.
45. Tanic N, Brkic G, Dimitrijevic B, Dedovic-Tanic N, Gefen N, Benharroch D, u. a. Identification of differentially expressed mRNA transcripts in drug-resistant versus parental human melanoma cell lines. *Anticancer Res*. 2006;26(3A):2137–42.
46. Casares D, Escribá PV, Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci*. 1. Mai 2019;20(9):2167.
47. Chan LC, Peters W, Xu Y, Chun J, Farese RV, Cases S. LPA<sub>3</sub> receptor mediates chemotaxis of immature murine dendritic cells to unsaturated lysophosphatidic acid (LPA). *J Leukoc Biol*. November 2007;82(5):1193–200.
48. Cerutis DR, Weston MD, Ogunleye AO, McVane TP, Miyamoto T. Lysophosphatidic acid (LPA) 18:1 transcriptional regulation of primary human gingival fibroblasts. *Genomics Data*. Dezember 2014;2:375–7.
49. Ma L, Nagai J, Chun J, Ueda H. An LPA species (18:1 LPA) plays key roles in the self-amplification of spinal LPA production in the peripheral neuropathic pain model. *Mol Pain*. 17. Juni 2013;9:29.
50. Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, u. a. Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*. 24. September 1999;274(39):27776–85.
51. Bandoh K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett*. 28. Juli 2000;478(1–2):159–65.
52. Hama K, Bandoh K, Kakehi Y, Aoki J, Arai H. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett*. 17. Juli 2002;523(1–3):187–92.
53. PubChem. LPA 18:0 [Internet]. [zitiert 5. April 2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=lpa%2018%3A0>
54. PubChem. LPA [Internet]. [zitiert 5. April 2023]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=lpa>
55. Boutin JA, Ferry G. Autotaxin. *Cell Mol Life Sci*. September 2009;66(18):3009–21.
56. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J*. 1. Mai 1993;291 ( Pt 3)(Pt 3):677–80.

57. Lin ME, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: Signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* April 2010;91(3–4):130–8.
58. Yung YC, Stoddard NC, Chun J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J Lipid Res.* Juli 2014;55(7):1192–214.
59. Koike S, Keino-Masu K, Ohto T, Masu M. The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech.* Februar 2006;11(2):133–42.
60. Brindley DN, Pilquil C. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res.* April 2009;50:S225–30.
61. Brindley DN, Bräuer AU. Lipid Mediators and Modulators of Neural Function: Lysophosphatidate and Lysolipids. In: Tettamanti G, Gianfrancesco G, Herausgeber. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* [Internet]. 3. Aufl. New York: Springer; 2009 [zitiert 18. April 2023]. S. 290–310. Verfügbar unter: [https://www.researchgate.net/publication/226866601\\_Lipid\\_Mediators\\_and\\_Modulators\\_of\\_Neural\\_Function\\_Lysophosphatidate\\_and\\_Lysolipids](https://www.researchgate.net/publication/226866601_Lipid_Mediators_and_Modulators_of_Neural_Function_Lysophosphatidate_and_Lysolipids)
62. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, u. a. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7. Januar 2003;100(1):131–6.
63. Furuta D, Yamane M, Tsujiuchi T, Moriyama R, Fukushima N. Lysophosphatidic acid induces neurite branch formation through LPA3. *Mol Cell Neurosci.* Mai 2012;50(1):21–34.
64. Mir SS, Bhat HF, Bhat ZF. Dynamic actin remodeling in response to lysophosphatidic acid. *J Biomol Struct Dyn.* 21. November 2020;38(17):5253–65.
65. Jang Y, Lee MH, Lee J, Jung J, Lee SH, Yang DJ, u. a. TRPM2 mediates the lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in the developing brain. *Pflugers Arch.* Oktober 2014;466(10):1987–98.
66. Yamane M, Furuta D, Fukushima N. Lysophosphatidic acid influences initial neuronal polarity establishment. *Neurosci Lett.* 16. August 2010;480(2):154–7.
67. De Sampaio e Spohr TCL, Dezone RS, Rehen SK, Gomes FCA. Astrocytes treated by lysophosphatidic acid induce axonal outgrowth of cortical progenitors through extracellular matrix protein and epidermal growth factor signaling pathway: LPA-treated astrocytes in neuritogenesis. *J Neurochem.* Oktober 2011;119(1):113–23.
68. Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Contos JJA, Rehen SK, Kingsbury MA, u. a. Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. *Mol Cell Neurosci.* Juni 2002;20(2):271–82.
69. Sun Y, Kim NH, Yang H, Kim SH, Huh SO. Lysophosphatidic acid induces neurite retraction in differentiated neuroblastoma cells via GSK-3 $\beta$  activation. *Mol Cells.* Mai 2011;31(5):483–9.
70. Birgbauer E, Chun J. Lysophospholipid receptors LPA1-3 are not required for the inhibitory effects of LPA on mouse retinal growth cones. *Eye Brain.* 2010;2:1–13.
71. Birgbauer E, Chun J. Lysophospholipid receptors LPA1-3 are not required for the inhibitory effects of LPA on mouse retinal growth cones. *Eye Brain.* 2010;2:1–13.
72. Humtsoe JO. Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP. *EMBO J.* 1. April 2003;22(7):1539–54.
73. Savaskan NE, Bräuer AU, Nitsch R. Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. *Eur J Neurosci.* Januar 2004;19(1):212–20.
74. Vogt J, Yang J, Mobascher A, Cheng J, Li Y, Liu X, u. a. Molecular cause and functional impact of altered synaptic lipid signaling due to a *prg-1* gene SNP. *EMBO Mol Med.* Januar 2016;8(1):25–38.



75. Duffy P, Schmandke A, Schmandke A, Sigworth J, Narumiya S, Cafferty WBJ, u. a. Rho-associated kinase II (ROCKII) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2. Dezember 2009;29(48):15266–76.
76. Seasholtz TM, Radeff-Huang J, Sagi SA, Matteo R, Weems JM, Cohen AS, u. a. Rho-mediated cytoskeletal rearrangement in response to LPA is functionally antagonized by Rac1 and PIP2. *J Neurochem*. Oktober 2004;91(2):501–12.
77. Siehler S. Regulation of RhoGEF proteins by G<sub>12/13</sub>-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. September 2009;158(1):41–9.
78. Corinna Kramer. Verknüpfung zwischen Plasmamembran und Zytoskelett: Charakterisierung der Organisation von Ezrin und F-Aktin an artifiziellen Lipidmembranen. 2016.
79. Mintz CD, Carcea I, McNickle DG, Dickson TC, Ge Y, Salton SRJ, u. a. ERM proteins regulate growth cone responses to Sema3A. *J Comp Neurol*. 1. Oktober 2008;510(4):351–66.
80. Weernink PAO, Meletiadis K, Hommeltenberg S, Hinz M, Ishihara H, Schmidt M, u. a. Activation of Type I Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem*. Februar 2004;279(9):7840–9.
81. Shaw RJ, Henry M, Solomon F, Jacks T. RhoA-dependent phosphorylation and relocalization of ERM proteins into apical membrane/actin protrusions in fibroblasts. *Mol Biol Cell*. Februar 1998;9(2):403–19.
82. Chatah NE, Abrams CS. G-protein-coupled receptor activation induces the membrane translocation and activation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase I alpha by a Rac- and Rho-dependent pathway. *J Biol Chem*. 7. September 2001;276(36):34059–65.
83. Meili R, Sasaki AT, Firtel RA. Rho Rocks PTEN. *Nat Cell Biol*. April 2005;7(4):334–5.
84. Tilve S, Iweka CA, Bao J, Hawken N, Mencio CP, Geller HM. Phospholipid phosphatase related 1 (PLPPR1) increases cell adhesion through modulation of Rac1 activity. *Exp Cell Res*. April 2020;389(2):111911.
85. Campbell DS, Holt CE. Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron*. 27. März 2003;37(6):939–52.
86. Verma S, Vaughan T, Bunting KD. Gab Adapter Proteins as Therapeutic Targets for Hematologic Disease. *Adv Hematol*. 2012;2012:1–10.
87. Kranenburg O, Moolenaar WH. Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*. 26. März 2001;20(13):1540–6.
88. Sperka T, Geissler KJ, Merkel U, Scholl I, Rubio I, Herrlich P, u. a. Activation of Ras requires the ERM-dependent link of actin to the plasma membrane. *PloS One*. 2011;6(11):e27511.
89. Ketschek A, Gallo G. Nerve growth factor induces axonal filopodia through localized microdomains of phosphoinositide 3-kinase activity that drive the formation of cytoskeletal precursors to filopodia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 8. September 2010;30(36):12185–97.
90. Sigal YJ, Quintero OA, Cheney RE, Morris AJ. Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein. *J Cell Sci*. 15. Januar 2007;120(2):340–52.
91. Bryant JP, Levy A, Heiss J, Banasavadi-Siddegowda YK. Review of PP2A Tumor Biology and Antitumor Effects of PP2A Inhibitor LB100 in the Nervous System. *Cancers*. 21. Juni 2021;13(12):3087.
92. Liu K, Lu Y, Lee JK, Samara R, Willenberg R, Sears-Kraxberger I, u. a. PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nat Neurosci*. September 2010;13(9):1075–81.
93. Gobrecht P, Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D. Sustained GSK3 activity markedly facilitates nerve regeneration. *Nat Commun*. 31. Juli 2014;5:4561.

94. Nijhara R, van Hennik PB, Gignac ML, Kruhlak MJ, Hordijk PL, Delon J, u. a. Rac1 Mediates Collapse of Microvilli on Chemokine-Activated T Lymphocytes. *J Immunol.* 15. Oktober 2004;173(8):4985–93.
95. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JFM. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets.* Mai 2008;8(3):187–98.
96. Aoki M, Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2017;407:153–89.
97. Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS, Schreiber SL. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12–rapamycin-associated protein. *Proc Natl Acad Sci.* 13. April 1999;96(8):4438–42.
98. Mandal K. Review of PIP2 in Cellular Signaling, Functions and Diseases. *Int J Mol Sci.* 6. November 2020;21(21):8342.
99. Halstead JR, Savaskan NE, van den Bout I, Van Horck F, Hajdo-Milasinovic A, Snell M, u. a. Rac controls PIP5K localisation and PtdIns(4,5) P<sub>2</sub> synthesis, which modulates vinculin localisation and neurite dynamics. *J Cell Sci.* 15. Oktober 2010;123(20):3535–46.
100. Fuchs J, Eickholt BJ, Leondaritis G. Harnessing PTEN's Growth Potential in Neuronal Development and Disease. *Neurosci Insights.* 2020;15:2633105520959056.
101. Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, u. a. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol.* 1. März 2004;164(5):653–9.
102. Janke M, Herrig A, Austermann J, Gerke V, Steinem C, Janshoff A. Actin binding of ezrin is activated by specific recognition of PIP2-functionalized lipid bilayers. *Biochemistry.* 25. März 2008;47(12):3762–9.
103. Bays JL, DeMali KA. Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci.* August 2017;74(16):2999–3009.
104. Liu X, Xie Z, Li S, He J, Cao S, Xiao Z. PRG-1 relieves pain and depressive-like behaviors in rats of bone cancer pain by regulation of dendritic spine in hippocampus. *Int J Biol Sci.* 2021;17(14):4005–20.
105. Nakashima A, Tanimura-Ito K, Oshiro N, Eguchi S, Miyamoto T, Momonami A, u. a. A positive role of mammalian Tip41-like protein, TIPRL, in the amino-acid dependent mTORC1-signaling pathway through interaction with PP2A. *FEBS Lett.* 17. September 2013;587(18):2924–9.
106. Mitra A, Menezes ME, Pannell LK, Mulekar MS, Honkanen RE, Shevde LA, u. a. DNAJB6 chaperones PP2A mediated dephosphorylation of GSK3 $\beta$  to downregulate  $\beta$ -catenin transcription target, osteopontin. *Oncogene.* 11. Oktober 2012;31(41):4472–83.
107. Zang D, Zhang C, Li C, Fan Y, Li Z, Hou K, u. a. LPPR4 promotes peritoneal metastasis via Sp1/integrin  $\alpha$ /FAK signaling in gastric cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(3):1026–44.
108. Engler A, Zhang R, Taylor V. Notch and Neurogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1066:223–34.
109. Bennison SA, Blazejewski SM, Smith TH, Toyo-oka K. Protein kinases: master regulators of neuritogenesis and therapeutic targets for axon regeneration. *Cell Mol Life Sci.* April 2020;77(8):1511–30.
110. Südhof TC. The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol.* 5. Juli 2021;220(7):e202103052.
111. Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM. Neuronal migration. *Mech Dev.* Juli 2001;105(1–2):47–56.
112. Rahimi-Balaei M, Bergen H, Kong J, Marzban H. Neuronal Migration During Development of the Cerebellum. *Front Cell Neurosci.* 17. Dezember 2018;12:484.
113. Simons M, Nave KA. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Januar 2016;8(1):a020479.

114. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 12. November 2019;8(11):1424.
115. Chan WY, Lorke DE, Tiu SC, Yew DT. Proliferation and apoptosis in the developing human neocortex. *Anat Rec*. 1. August 2002;267(4):261–76.
116. Frade JM, Ovejero-Benito MC. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle*. 4. März 2015;14(5):712–20.
117. Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, u. a. Autotaxin Stabilizes Blood Vessels and Is Required for Embryonic Vasculature by Producing Lysophosphatidic Acid. *J Biol Chem*. September 2006;281(35):25822–30.
118. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradère JP, u. a. Autotaxin, a Secreted Lysophospholipase D, Is Essential for Blood Vessel Formation during Development. *Mol Cell Biol*. Juli 2006;26(13):5015–22.
119. Fukushima N. Neural Effects of Lysophosphatidic Acid (LPA) Signaling. In: Chun J, Hla T, Spiegel S, Moolenaar WH, Herausgeber. *Lysophospholipid Receptors Signaling and Biochemistry* [Internet]. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2013 [zitiert 4. April 2023]. S. 399–418. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9781118531426.ch18>
120. Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJA, Higgins CM, Chun J. Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci*. Dezember 2003;6(12):1292–9.
121. Estivill-Torrús G, Llebreg-Zayas P, Matas-Rico E, Santín L, Pedraza C, De Diego I, u. a. Absence of LPA1 Signaling Results in Defective Cortical Development. *Cereb Cortex*. April 2008;18(4):938–50.
122. Kurabayashi N, Tanaka A, Nguyen MD, Sanada K. The LPA-LPA4 axis is required for establishment of bipolar morphology and radial migration of newborn cortical neurons. *Development*. 1. September 2018;145(17):dev162529.
123. Seymour RM, Berry M. Scanning and transmission electron microscope studies of interkinetic nuclear migration in the cerebral vesicles of the rat. *J Comp Neurol*. 1. März 1975;160(1):105–25.
124. Spear PC, Erickson CA. Interkinetic nuclear migration: A mysterious process in search of a function. *Dev Growth Differ*. April 2012;54(3):306–16.
125. Fukushima N, Weiner JA, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Dev Biol*. 1. Dezember 2000;228(1):6–18.
126. Thalman C, Horta G, Qiao L, Endle H, Tegeder I, Cheng H, u. a. Synaptic phospholipids as a new target for cortical hyperexcitability and E/I balance in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. August 2018;23(8):1699–710.
127. Estivill-Torrus, Guillermo, Javier Santín L, Pedraza, Carmen, Castilla-Ortega E, de Fonseca FR. Role of Lysophosphatidic Acid (LPA) in Behavioral Processes: Implications for Psychiatric Disorders (Chapter 21). In: Chun J, Hla T, Spiegel S, Moolenaar WH, Herausgeber. *LYSOPHOSPHOLIPID RECEPTORS Signaling and Biochemistry*. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2013. S. 451–74.
128. Tüscher O, Muthuraman M, Horstmann JP, Horta G, Radyushkin K, Baumgart J, u. a. Altered cortical synaptic lipid signaling leads to intermediate phenotypes of mental disorders. *Mol Psychiatry* [Internet]. 28. Mai 2024 [zitiert 31. Juli 2024]; Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41380-024-02598-2>
129. Knierim E, Vogt J, Kintscher M, Ponomarenko A, Baumgart J, Beed P, u. a. Mutations in plasticity-related-gene-1 (PRG-1) protein contribute to hippocampal seizure susceptibility and modify epileptic phenotype. *Cereb Cortex*. 28. März 2023;bhad051.
130. Yamada M, Shida Y, Takahashi K, Tanioka T, Nakano Y, Tobe T, u. a. Prg1 is regulated by the basic helix-loop-helix transcription factor Math2. *J Neurochem*. September 2008;106(6):2375–84.
131. Fink KL, López-Giráldez F, Kim IJ, Strittmatter SM, Cafferty WBJ. Identification of Intrinsic Axon Growth Modulators for Intact CNS Neurons after Injury. *Cell Rep*. März 2017;18(11):2687–701.

132. Gross I, Brandt N, Vonk D, Köper F, Wöhlbrand L, Rabus R, u. a. Plasticity-Related Gene 5 Is Expressed in a Late Phase of Neurodifferentiation After Neuronal Cell-Fate Determination. *Front Cell Neurosci.* 15. April 2022;16:797588.
133. Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ. Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature.* 13. September 1990;347(6289):179–81.
134. Endle H, Horta G, Stutz B, Muthuraman M, Tegeder I, Schreiber Y, u. a. AgRP neurons control feeding behaviour at cortical synapses via peripherally derived lysophospholipids. *Nat Metab.* 27. Juni 2022;4(6):683–92.
135. Griffin JM, Bradke F. Therapeutic repair for spinal cord injury: combinatory approaches to address a multifaceted problem. *EMBO Mol Med.* 6. März 2020;12(3):e11505.
136. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* Februar 2004;5(2):146–56.
137. Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annu Rev Psychol.* 3. Januar 2015;66:53–81.
138. Liu BP, Cafferty WBJ, Budel SO, Strittmatter SM. Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 29. September 2006;361(1473):1593–610.
139. McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* November 1991;11(11):3398–411.
140. Cavarsan CF, Malheiros J, Hamani C, Najm I, Covolan L. Is Mossy Fiber Sprouting a Potential Therapeutic Target for Epilepsy? *Front Neurol.* 2018;9:1023.
141. Smith NM, Giacci MK, Gough A, Bailey C, McGonigle T, Black AMB, u. a. Inflammation and blood-brain barrier breach remote from the primary injury following neurotrauma. *J Neuroinflammation.* 7. Juli 2018;15(1):201.
142. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 2011;71(2):281–99.
143. Katsifa A, Kaffe E, Nikolaidou-Katsaridou N, Economides AN, Newbigging S, McKerlie C, u. a. The Bulk of Autotaxin Activity Is Dispensable for Adult Mouse Life. Yue J, Herausgeber. *PLOS ONE.* 16. November 2015;10(11):e0143083.
144. Tigyi G, Hong L, Yakubu M, Parfenova H, Shibata M, Leffler CW. Lysophosphatidic acid alters cerebrovascular reactivity in piglets. *Am J Physiol.* Mai 1995;268(5 Pt 2):H2048–2055.
145. McDonald WS, Jones EE, Wojciak JM, Drake RR, Sabbadini RA, Harris NG. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mapping of Lysophosphatidic Acid Changes after Traumatic Brain Injury and the Relationship to Cellular Pathology. *Am J Pathol.* August 2018;188(8):1779–93.
146. Yung YC, Mutoh T, Lin ME, Noguchi K, Rivera RR, Choi JW, u. a. Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Sci Transl Med.* 7. September 2011;3(99):99ra87.
147. Frugier T, Crombie D, Conquest A, Tjhong F, Taylor C, Kulkarni T, u. a. Modulation of LPA Receptor Expression in the Human Brain Following Neurotrauma. *Cell Mol Neurobiol.* Mai 2011;31(4):569–77.
148. van Meeteren LA, Ruurs P, Christodoulou E, Goding JW, Takakusa H, Kikuchi K, u. a. Inhibition of autotaxin by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem.* 3. Juni 2005;280(22):21155–61.
149. Snow DM, Lemmon V, Carrino DA, Caplan AI, Silver J. Sulfated proteoglycans in astroglial barriers inhibit neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol.* Juli 1990;109(1):111–30.
150. McKerracher L, Rosen KM. MAG, myelin and overcoming growth inhibition in the CNS. *Front Mol Neurosci.* 2015;8:51.

151. Santos-Nogueira E, Lopez-Serrano C, Hernandez J, Lago N, Astudillo AM, Balsinde J, u. a. Activation of Lysophosphatidic Acid Receptor Type 1 Contributes to Pathophysiology of Spinal Cord Injury. *J Neurosci*. 15. Juli 2015;35(28):10224–35.
152. Zeng X, Luo Z, Wu J, Zhou J, Shan Y, Zhu Y, u. a. Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Lysophosphatidic Acid Mediates Inflammation by Decreasing the Expression of Liver X Receptor. *J Mol Neurosci*. September 2020;70(9):1376–84.
153. Bitar L, Uphaus T, Thalman C, Muthuraman M, Gyr L, Ji H, u. a. Inhibition of the enzyme autotaxin reduces cortical excitability and ameliorates the outcome in stroke. *Sci Transl Med*. 20. April 2022;14(641):eabk0135.
154. Herr DR, Chew WS, Satish RL, Ong WY. Pleiotropic Roles of Autotaxin in the Nervous System Present Opportunities for the Development of Novel Therapeutics for Neurological Diseases. *Mol Neurobiol*. Januar 2020;57(1):372–92.
155. Herr DR, Ong JHJ, Ong WY. Potential Therapeutic Applications for Inhibitors of Autotaxin, a Bioactive Lipid-Producing Lysophospholipase D, in Disorders Affecting the Nervous System. *ACS Chem Neurosci*. 21. März 2018;9(3):398–400.
156. Ni H, Feng X, Xiao Z jun, Tao L yang, Jin M fang. Dynamic pattern of gene expression of ZnT-4, caspase-3, LC3, and PRG-3 in rat cerebral cortex following flurothyl-induced recurrent neonatal seizures. *Biol Trace Elem Res*. Dezember 2011;143(3):1607–15.
157. Ni H, Jiang Y wu, Xiao Z jun, Tao L yang, Jin M fang, Wu X ru. Dynamic pattern of gene expression of ZnT-1, ZnT-3 and PRG-1 in rat brain following flurothyl-induced recurrent neonatal seizures. *Toxicol Lett*. Mai 2010;194(3):86–93.
158. Henle SJ, Carlstrom LP, Cheever TR, Henley JR. Differential Role of PTEN Phosphatase in Chemotactic Growth Cone Guidance. *J Biol Chem*. Juli 2013;288(29):20837–42.
159. Parham J. Investigations Into PRG-2 and its Involvement in Developing Gallus Gallus Retinal Neurons [Internet]. niversity The Graduate School; 2022 [zitiert 2. April 2023]. Verfügbar unter: [https://digitalcommons.winthrop.edu/graduatetheses/?utm\\_source=digitalcommons.winthrop.edu%2Fgraduatetheses%2F144&utm\\_medium=PDF&utm\\_campaign=PDFCoverPages](https://digitalcommons.winthrop.edu/graduatetheses/?utm_source=digitalcommons.winthrop.edu%2Fgraduatetheses%2F144&utm_medium=PDF&utm_campaign=PDFCoverPages)
160. Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1. August 2002;22(15):6570–7.
161. Siegel CS, Fink KL, Strittmatter SM, Cafferty WBJ. Plasticity of intact rubral projections mediates spontaneous recovery of function after corticospinal tract injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 28. Januar 2015;35(4):1443–57.
162. Sun Y, Ma L, Jin M, Zheng Y, Wang D, Ni H. Effects of Melatonin on Neurobehavior and Cognition in a Cerebral Palsy Model of plppr5<sup>-/-</sup> Mice. *Front Endocrinol*. 2021;12:598788.
163. Sun Y, Ma L, Jin M, Zheng Y, Wang D, Ni H. Corrigendum: Effects of Melatonin on Neurobehavior and Cognition in a Cerebral Palsy Model of plppr5<sup>-/-</sup> Mice. *Front Endocrinol*. 2022;13:879685.
164. Wang D, Jin MF, Li L, Liu Y, Sun Y, Ni H. PRG5 Knockout Precipitates Late-Onset Hypersusceptibility to Pilocarpine-Induced Juvenile Seizures by Exacerbating Hippocampal Zinc Signaling-Mediated Mitochondrial Damage. *Front Neurosci*. 2021;15:715555.
165. Hashimoto T, Yamada M, Iwai T, Saitoh A, Hashimoto E, Ukai W, u. a. Plasticity-related gene 1 is important for survival of neurons derived from rat neural stem cells: Prg1 Is Essential for Neuronal Survival. *J Neurosci Res*. November 2013;91(11):1402–7.
166. McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble MEM. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. April 2011;67(Pt 4):386–94.
167. Uhlen lab, Karolinska Institutet. Calcium imaging buffers [Internet]. 2006 [zitiert 18. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.uhlenlab.org/downloads.html>

168. Suckau O, Gross I, Schrötter S, Yang F, Luo J, Wree A, u. a. LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>4</sub>, and LPA<sub>6</sub> receptor expression during mouse brain development. *Dev Dyn*. Mai 2019;248(5):375–95.
169. Bhattarai S, Sharma S, Subedi U, Ara H, Shum A, Milena M, u. a. The ATX-LPA Axis Regulates Vascular Permeability during Cerebral Ischemic-Reperfusion. *Int J Mol Sci*. 8. April 2022;23(8):4138.
170. Gordon J, Amini S, White MK. General Overview of Neuronal Cell Culture. In: Amini S, White MK, Herausgeber. *Neuronal Cell Culture* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [zitiert 22. Dezember 2022]. S. 1–8. (Methods in Molecular Biology; Bd. 1078). Verfügbar unter: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5_1)
171. Tsubota S, Kadomatsu K. Origin and initiation mechanisms of neuroblastoma. *Cell Tissue Res*. Mai 2018;372(2):211–21.
172. Yanaka N, Nogusa Y, Fujioka Y, Yamashita Y, Kato N. Involvement of membrane protein GDE2 in retinoic acid-induced neurite formation in Neuro2A cells. *FEBS Lett*. 20. Februar 2007;581(4):712–8.
173. Riboni L, Prinetti A, Bassi R, Caminiti A, Tettamanti G. A mediator role of ceramide in the regulation of neuroblastoma Neuro2a cell differentiation. *J Biol Chem*. 10. November 1995;270(45):26868–75.
174. Hanzlíková M, Ruponen M, Galli E, Raasmaja A, Aseyev V, Tenhu H, u. a. Mechanisms of polyethylenimine-mediated DNA delivery: free carrier helps to overcome the barrier of cell-surface glycosaminoglycans. *J Gene Med*. Juli 2011;13(7–8):402–9.
175. Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*. 2013;529:227–40.
176. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, u. a. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. August 1995;92(16):7297–301.
177. Sonawane ND, Szoka FC, Verkman AS. Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*. 7. November 2003;278(45):44826–31.
178. Biontix. METAFACTENE® PRO - DNA & RNA Transfektionsreagenz [Internet]. 2016 [zitiert 6. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.biontix.com/metafectene-pro.html>
179. Parker AL, Newman C, Briggs S, Seymour L, Sheridan PJ. Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 3. September 2003;5(22):1–15.
180. Legendre JY, Szoka FC. Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm Res*. Oktober 1992;9(10):1235–42.
181. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, u. a. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem*. 28. Januar 1994;269(4):2550–61.
182. Zelphati O, Szoka FC. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15. Oktober 1996;93(21):11493–8.
183. Biontix. METAFACTENE®PRO Das hocheffiziente Transfektionsreagenz für Säugerzellen. [Internet]. 2016 [zitiert 15. März 2023]. Verfügbar unter: <https://www.biontix.com/products/metafectene-pro.html/>
184. Sartorius PNo: 8000 0526 B. Analysis Guidelines for the Incucyte® Neurotrack Analysis Software Module. 2020.
185. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, u. a. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*. 13. Dezember 2002;277(50):48737–44.
186. Tigyi G, Miledi R. Lysophosphatides bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*. 25. Oktober 1992;267(30):21360–7.

187. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *J Vis Exp JoVE*. 2007;(6):253.
188. Macherey-Nagel. User manual: Plasmid DNA purification Nucleobond®. [Internet]. 2021. Verfügbar unter: [www.mn-net.com](http://www.mn-net.com)
189. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. April 1987;162(1):156–9.
190. ThermoScientific. T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers -260/280 and 260/230 Ratios [Internet]. [zitiert 18. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.uvm.edu/~vgn/microarray/documents/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
191. Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods San Diego Calif*. April 2010;50(4):S1-5.
192. Schild TA. 7700 SDS Workshop - Einführung in die Real-Time TaqMan<sup>®</sup> PCR-Technologie Vers. 2.1 [Internet]. Applied Biosystems GmbH; Datum nicht angegeben [zitiert 18. April 2023]. Verfügbar unter: [https://www.uniklinik-freiburg.de/fileadmin/mediapool/07\\_kliniken/med\\_innere1/downloads/core\\_facility/pdfs/sdsman.pdf](https://www.uniklinik-freiburg.de/fileadmin/mediapool/07_kliniken/med_innere1/downloads/core_facility/pdfs/sdsman.pdf)
193. Universität Zürich. Methodenberatung: Datenanalyse mit SPSS [Internet]. 2022 [zitiert 15. März 2023]. Verfügbar unter: [https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse\\_spss.html](https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss.html)
194. ATCC. Neuro-2a - CCL-131 [Internet]. 2022 [zitiert 18. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/ccl-131>
195. He Z, Wilson A, Rich F, Kenwright D, Stevens A, Low YS, u. a. Chromosomal instability and its effect on cell lines. *Cancer Rep Hoboken NJ*. Juni 2023;6(6):e1822.
196. Hynds RE, Vladimirov E, Janes SM. The secret lives of cancer cell lines. *Dis Model Mech*. 16. November 2018;11(11):dmm037366.
197. ThermoFisher Scientific. Gibco Cell Culture Basics. [zitiert 14. März 2023]. Cell Morphology. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-morphology.html>
198. Cell Lines Service (CLS). Maus Zelllinien - Neuro-2a [Internet]. 2023 [zitiert 9. April 2023]. Verfügbar unter: <https://cls.shop/de/Neuro-2a/400394>
199. ATCC. 293T - CRL-3216 [Internet]. 2022 [zitiert 18. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/crl-3216>
200. Synthego. Synthego. 2023 [zitiert 18. April 2023]. HEK293 Cells: Background, Applications, Protocols, and More. Verfügbar unter: <https://www.synthego.com/Hek293#:~:text=HEK293%20cell%20morphology%20is%20epithelial.%20However%2C%20the%20exact,affected%20the%20cell%20phenotype%20and%20gene%20expression%20considerably.>
201. The UniProt Consortium, Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Ahmad S, u. a. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res*. 6. Januar 2023;51(D1):D523–31.
202. Contos JJ, Chun J. The mouse lp(A3)/Edg7 lysophosphatidic acid receptor gene: genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Gene*. 18. April 2001;267(2):243–53.
203. Shigeta M, Shibukawa Y, Ihara H, Miyoshi E, Taniguchi N, Gu J.  $\beta$ 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III potentiates  $\beta$ 1 integrin-mediated neurite outgrowth induced by serum deprivation in Neuro2a cells. *Glycobiology*. 1. Juni 2006;16(6):564–71.
204. Wu G, Fang Y, Lu ZH, Ledeen RW. Induction of axon-like and dendrite-like processes in neuroblastoma cells. *J Neurocytol*. Januar 1998;27(1):1–14.

205. Namsi A, Nury T, Hamdouni H, Yammine A, Vejux A, Vervandier-Fasseur D, u. a. Induction of Neuronal Differentiation of Murine N2a Cells by Two Polyphenols Present in the Mediterranean Diet Mimicking Neurotrophins Activities: Resveratrol and Apigenin. *Dis Basel Switz*. 22. Juli 2018;6(3):67.
206. You Q, Gong Q, Han YQ, Pi R, Du YJ, Dong SZ. Role of miR-124 in the regulation of retinoic acid-induced Neuro-2A cell differentiation. *Neural Regen Res*. Juni 2020;15(6):1133–9.
207. Cell Lines Service (CLS). CLS Cell Lines Service GmbH. 2023 [zitiert 12. April 2023]. Maus Zelllinien - P19. Verfügbar unter: <https://cls.shop/de/P19/400416>
208. ATCC. PC-12 - CRL-1721 [Internet]. 2022 [zitiert 18. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.atcc.org/products/crl-1721>
209. Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 11. Juli 2008;371(4):707–12.
210. Tabata K ichi, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N. The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 23. November 2007;363(3):861–6.
211. Gotoh M, Sano-Maeda K, Murofushi H, Murakami-Murofushi K. Protection of neuroblastoma Neuro2A cells from hypoxia-induced apoptosis by cyclic phosphatidic acid (cPA). *PloS One*. 2012;7(12):e51093.
212. Islam MS. Calcium Signaling: From Basic to Bedside. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1131:1–6.
213. de Baaij JHF, Hoenderop JGJ, Bindels RJM. Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiol Rev*. Januar 2015;95(1):1–46.
214. Gopal S, Mulhaupt HAB, Couchman JR. Calcium in Cell-Extracellular Matrix Interactions. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1131:1079–102.
215. Sheng L, Leshchyns'ka I, Sytnyk V. Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. *Cell Commun Signal CCS*. 13. Dezember 2013;11:94.
216. Kemler R, Ozawa M, Ringwald M. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. Oktober 1989;1(5):892–7.
217. Lankford KL, Letourneau PC. Evidence that calcium may control neurite outgrowth by regulating the stability of actin filaments. *J Cell Biol*. September 1989;109(3):1229–43.
218. Cooper J. CO2 concentration and pH control in the cell culture laboratory [Internet]. UK Health Security Agency; 2019 [zitiert 13. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.culturecollections.org.uk/news/ecacc-news/co2-concentration-and-ph-control-in-the-cell-culture-laboratory.aspx>
219. Wiggin GR, Fawcett JP, Pawson T. Polarity proteins in axon specification and synaptogenesis. *Dev Cell*. Juni 2005;8(6):803–16.
220. Leibinger M, Hilla AM, Andreadaki A, Fischer D. GSK3-CRMP2 signaling mediates axonal regeneration induced by Pten knockout. *Commun Biol*. 2019;2:318.
221. Liz MA, Mar FM, Santos TE, Pimentel HI, Marques AM, Morgado MM, u. a. Neuronal deletion of GSK3 $\beta$  increases microtubule speed in the growth cone and enhances axon regeneration via CRMP-2 and independently of MAP1B and CLASP2. *BMC Biol*. 12. Juni 2014;12:47.
222. Solís KH, Romero-Ávila MT, Guzmán-Silva A, García-Sáinz JA. The LPA3 Receptor: Regulation and Activation of Signaling Pathways. *Int J Mol Sci*. 23. Juni 2021;22(13):6704.
223. Ben-Aissa K, Patino-Lopez G, Belkina NV, Maniti O, Rosales T, Hao JJ, u. a. Activation of moesin, a protein that links actin cytoskeleton to the plasma membrane, occurs by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding sequentially to two sites and releasing an autoinhibitory linker. *J Biol Chem*. 11. Mai 2012;287(20):16311–23.



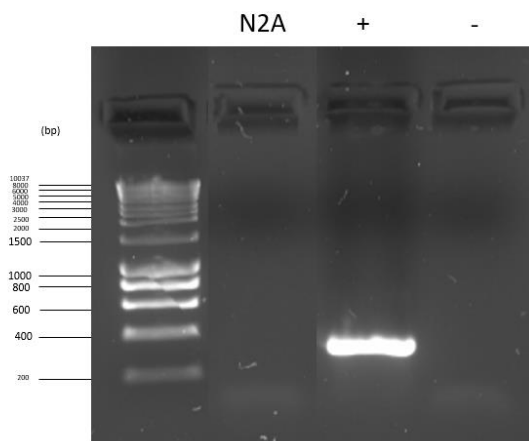
- 224. Zahednasab H, Balood M, Harirchian MH, Mesbah-Namin SA, Rahimian N, Siroos B. Increased autotaxin activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 15. August 2014;273(1–2):120–3.
- 225. La Mantia L, Tramacere I, Firwana B, Pacchetti I, Palumbo R, Filippini G. Fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 19. April 2016;4:CD009371.
- 226. Tong J, Zou Q, Chen Y, Liao X, Chen R, Ma L, u. a. Efficacy and acceptability of the S1P receptor in the treatment of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol.* Mai 2021;42(5):1687–95.
- 227. Balijepalli P, Sitton CC, Meier KE. Lysophosphatidic Acid Signaling in Cancer Cells: What Makes LPA So Special? *Cells.* 11. August 2021;10(8):2059.
- 228. Wang J, Sun Y, Qu J, Yan Y, Yang Y, Cai H. Roles of LPA receptor signaling in breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* Oktober 2016;16(10):1103–11.
- 229. Clontech Laboratories. pECFP-Mem Vector Information PT3379-5 Catalog #6918-1 [Internet]. 2000 [zitiert 15. März 2023]. Verfügbar unter: <http://www.youbio.cn/sites/default/files/product/documents/vector/pECFP-Mem.pdf>

## Anhang

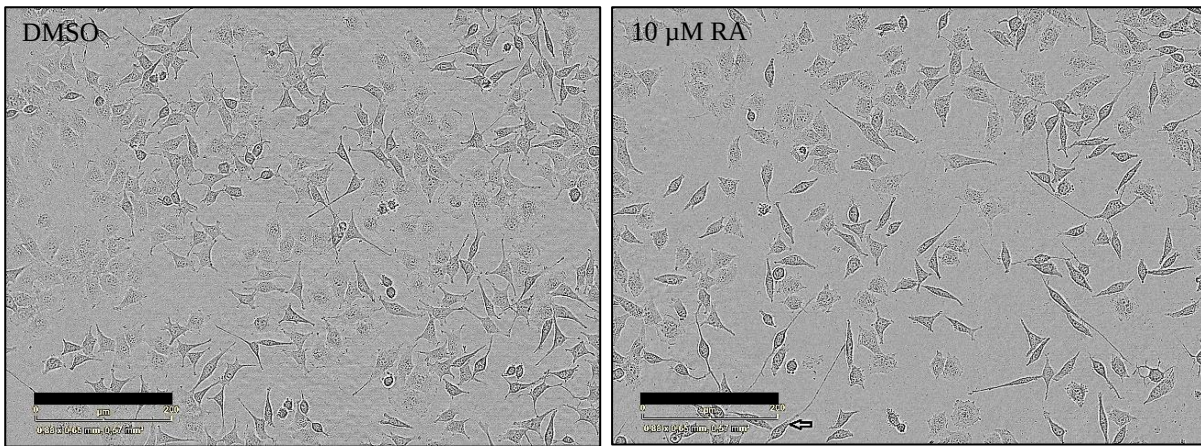
### Ergänzende Abbildungen für Einleitung und Methodenteil

**Tabelle 37: Nomenklatur der PRGs** (Plasticity Related Genes) als Phospholipid Phosphatase-Related Proteins (type 1-5) (PLP(P)R(P)s), Lipid phosphate phosphatase-related proteins (type 1-5) (LPPR(P)), UniProt IDs entsprechen jeweils den kontrollierten Einträgen (Swissprot) (201), **h**: human, **r**: Ratte, **m**: Maus

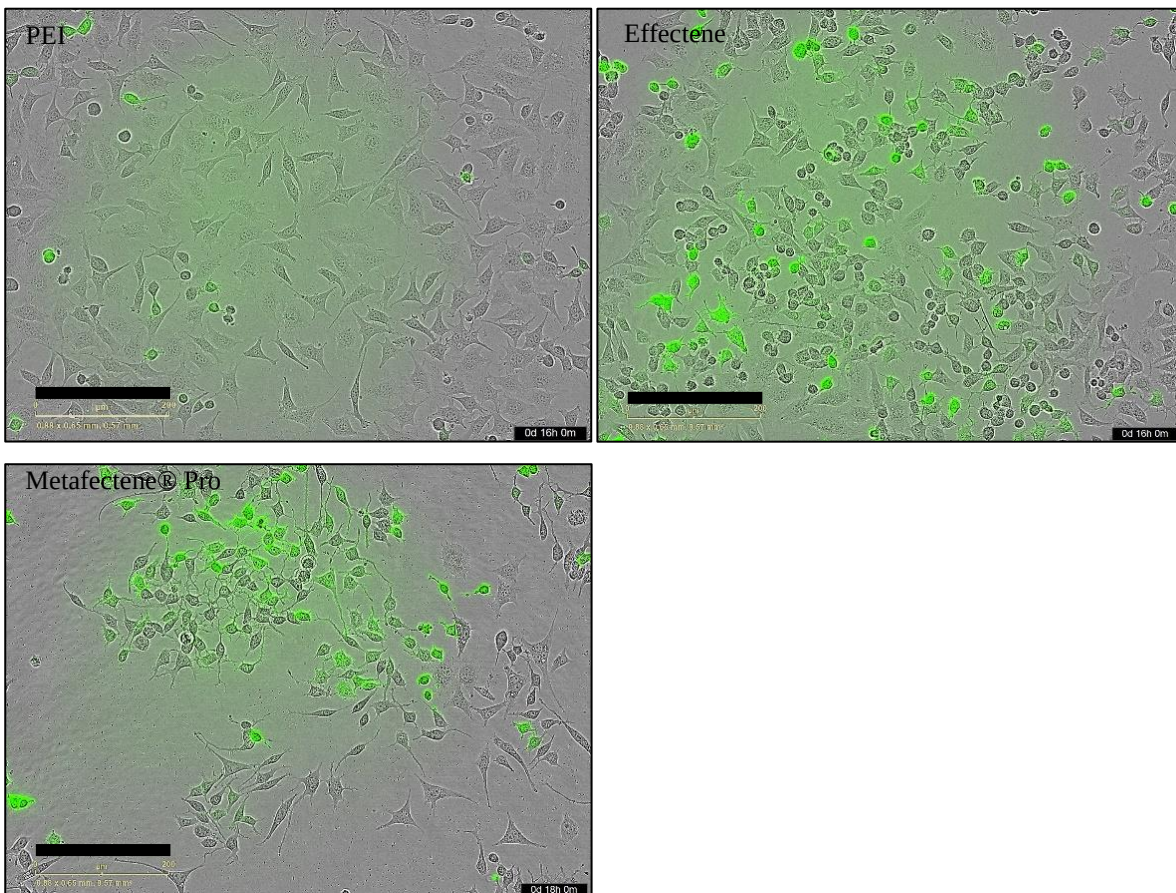
| Gen Name                           | Protein Name          |         |         |         |         |         |
|------------------------------------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Prg                                | PRG                   | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       |
| UniProt ID                         |                       | Q7Z2D5  | Q6T4P5  | Q8TBJ4  | Q96GM1  | Q32ZL2  |
|                                    |                       | (hPRG1) | (hPRG2) | (hPRG3) | (hPRG4) | (hPRG5) |
|                                    |                       | Q7TMB7  | Q7TMB0  | Q6WAY2  | Q6W5G4  | B3VQM3  |
|                                    |                       | (rPRG1) | (rPRG2) | (rPRG3) | (rPRG4) | (rPRG5) |
|                                    |                       | Q7TME0  | Q7TPB0  | Q8BFZ2  | Q8VCY8  | Q8BJ52  |
|                                    |                       | (mPRG1) | (mPRG2) | (mPRG3) | (mPRG4) | (mPRG5) |
| PLPPR/LPPR (h)<br>Plppr/Lppr (r/m) | PLPPRP/LPPRP<br>/PLPR | 4       | 3       | 1       | 2       | 5       |



**Abbildung 41: Beispiel Gelelektrophorese nach Mykoplasmen PCR** (genutzt ab 09.2022, Gel vom 10.10.2022): Neuro2a negativ.  
**Bp**: Basenpaare. **N2A**: Neuro2a. **+**: Positivkontrolle. **-**: Negativkontrolle.

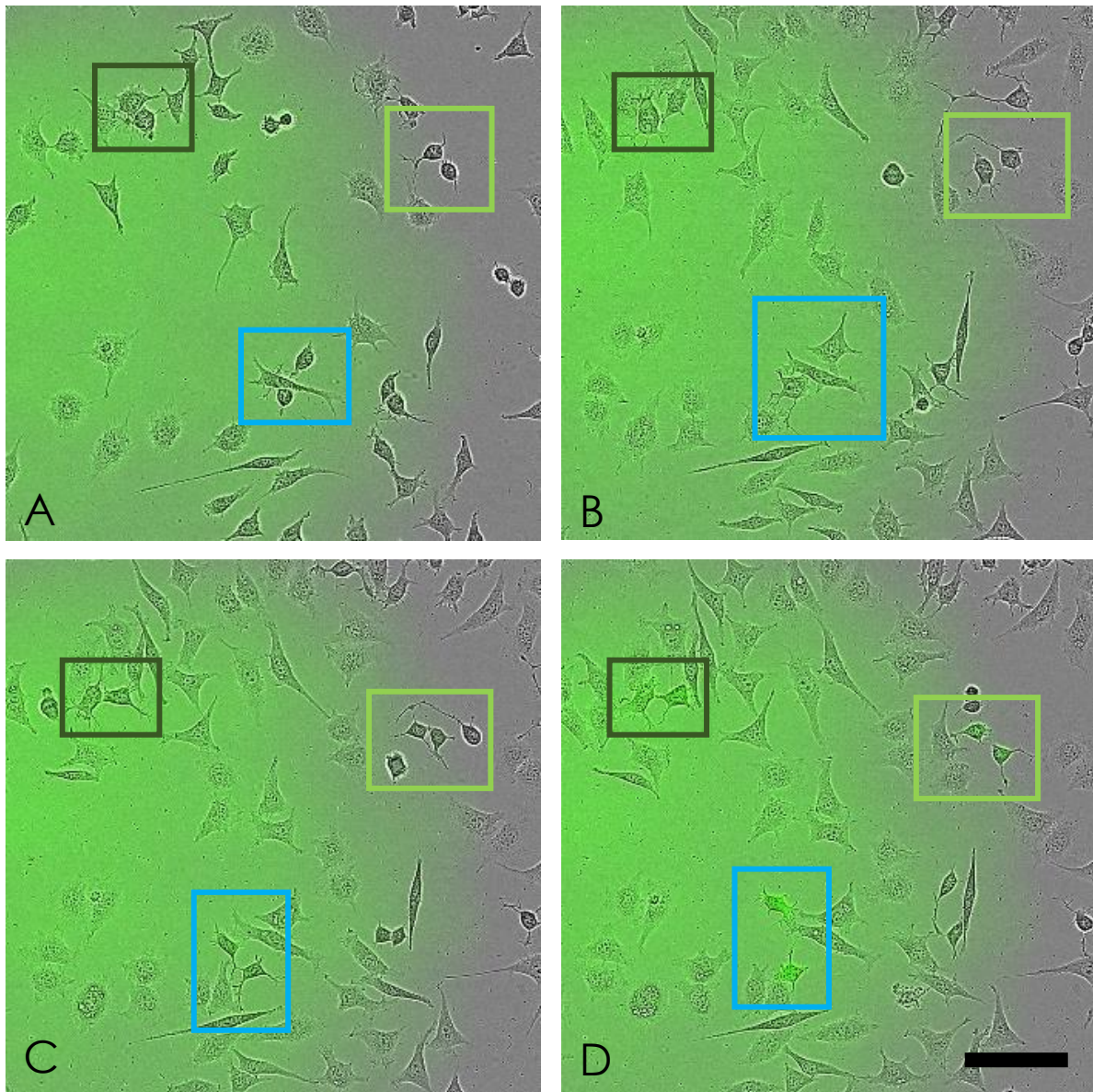


**Abbildung 42: Differenzierung von Neuro2a\_1-Zellen mittels Retinsäure:** Fotos 23h seit Behandlung mit DMSO 1 µl (Kontrolle) unter Kultivierung in Medium ohne FBS (links) bzw. mit RA 10 µM (in DMSO) unter Kultivierung in Medium ohne FBS (rechts). **Pfeil:** differenzierter Neuro2a-Zelle. Beachte die deutlich reduzierte Zellzahl im Vergleich. Kontrast, Helligkeit und Schärfe wurden nachträglich (in Word) adjustiert. **RA:** Retinsäure. **DMSO:** Dimethylsulfoxid (Lösungsmittel für RA). **FBS:** fetales bovines Serum. Die Abbildungen sind Aufnahmen der Lebendzellmikroskopie mittels des Incucyte-Systems (s.u.). Messbalken entsprechen 200µm.

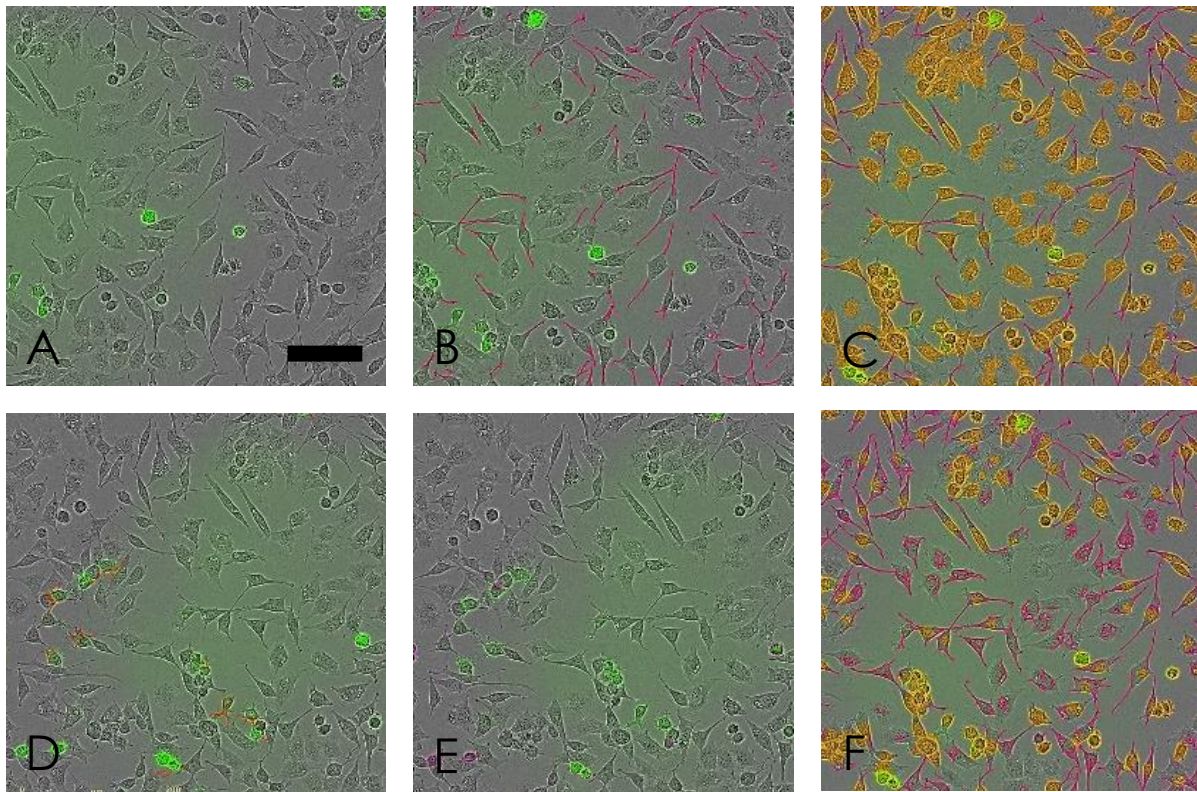


**Abbildung 43: Transfektionseffizienz in Neuro2a\_1 bei Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien:** Es werden die Ergebnisse unter den jeweils bereits optimierten Bedingungen gezeigt. **1)** PEI Transfektion von CFPMem in Neuro2a: sehr schlechte Transfektionseffizienz von ca. 10%. Transfizierte Zellen sind mehrheitlich abgerundet. **2)** Effectene Transfektion von CFPMem in Neuro2a: deutlich bessere Transfektionseffizienz im Vergleich zu PEI **3)** Metafectene® Pro: beste Transfektionseffizienz. Es sei zudem darauf hingewiesen, dass es sich bei allen Abbildungen um Neuro2a\_1 handelt, welche eine Veränderung der Zellmorphologie mit Zunahme der runden und tendenziell differenzierten Zellen aufwiesen (s. Kapitel 3.1.1). Die Abbildungen sind Aufnahmen der Lebendzellmikroskopie mittels des Incucyte-Systems (s.u.). **PEI:** Polyethylenimin. Messbalken entsprechen 200 µm.

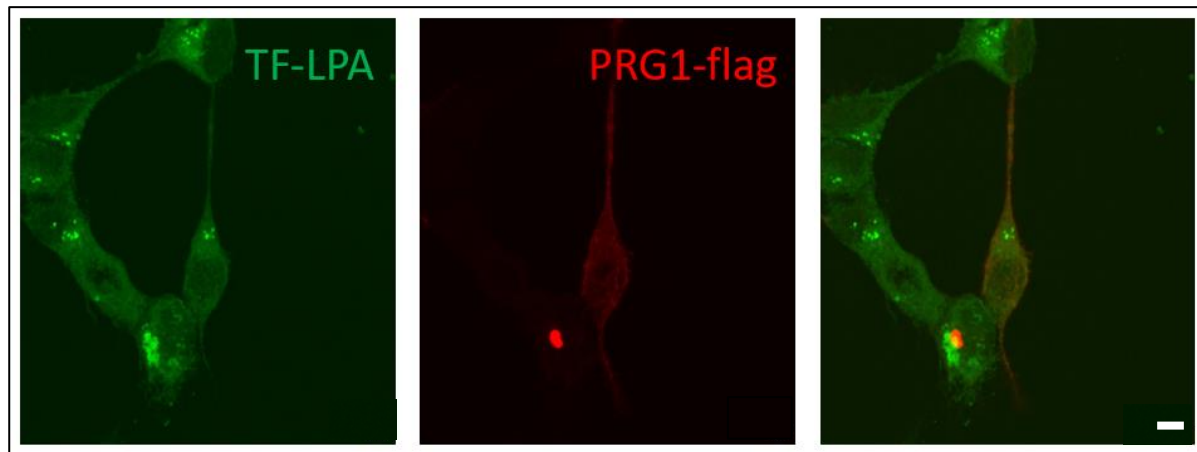




**Abbildung 44: Beobachtung: Beinahe alle transfizierten Zellen teilen sich kurz vor der Transfektion.** Aufnahmen 0 h (A), 5 h (B), 9 h (C) und 11 h (D) nach Hinzugabe der Transfektionslösung (Metafectene® Pro). Die Abbildungen sind Aufnahmen der Lebendzellmikroskopie mittels des Incucyte-Systems (s.u.). Messbalken entsprechen 200µm.

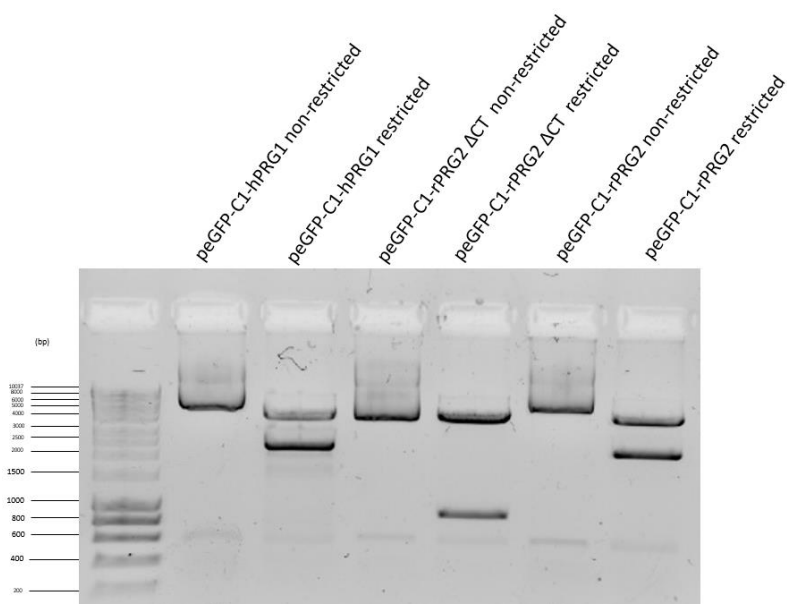


**Abbildung 45: Neurotrack Analyse im Incucyte System:** Bei allen, hier gezeigten Beispielbildern handelt es sich um Analysen von Aufnahmen, welche über einen bestimmten Zeitraum nach Transfektion durchgeführt wurden und entsprechend des Manuals für Neuritenanalysen optimiert wurden. Es zeigt sich, dass die Software insbesondere für transfizierte Zellen (**D,E**) und über Zeit bei variierenden Lichtverhältnissen/Fokus (**F**) keine verlässliche Diskriminierung von Neuriten und Zellsomata und deren Länge/Größe ermöglicht. **A:** keine Analyse-Marker, **B:** Maske für Phase-Neuriten, **C:** Maske für Phase-Zellkörper (orange) und Phase-Neuriten (pink), **D:** Maske für grüne (GFP enthaltene) Neuriten (rot), **E:** Maske für grüne Zellkörper mit fehlender Erkennung der meisten transfizierten Zellen **F:** Beispiel für fälschliche Erkennung von Zellmembranen als Neuriten (in pink Neuriten (Phase), in orange Zellkörper (Phase)). Messbalken entsprechen 100µm

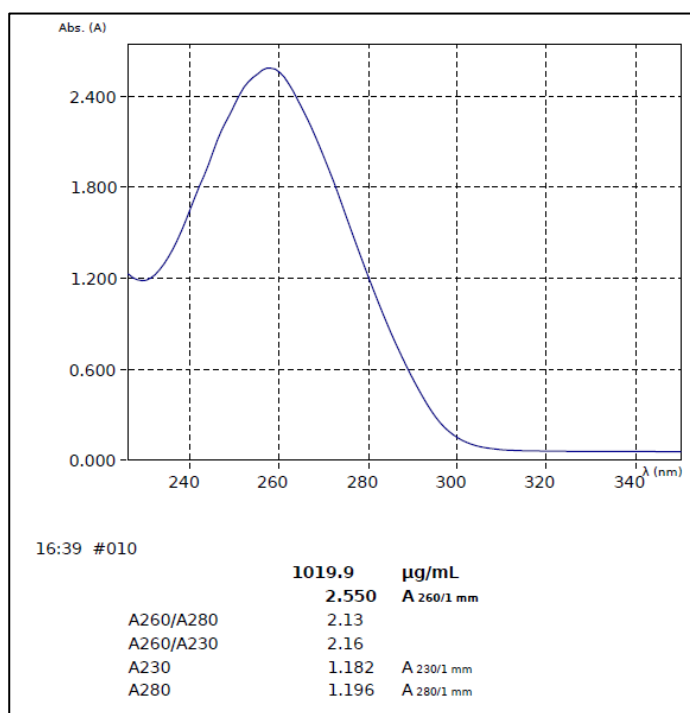


**Abbildung 46: Kein Unterschied der TF-LPA Fluoreszenzintensität zwischen PRG1-flag und untransfizierten HEK293T-Zellen.** Messbalken entspricht 5µm





**Abbildung 47: Beispielbild eines Restriktionverdaus:** Restriktion der Plasmide peGFP-C1-hPRG1 (Enzyme: Bgl II, BamHI; Banden bei 4,7 und 2,3kb), peGFP-C1-rPRG2- $\Delta$ CT (Enzyme: Hind III, Bam HI; Banden bei 4,7 kB und 85 0bp) und peGFP-C1-rPRG2 (Enzyme: Hind III, Bam HI; Banden bei 4,7 kB und 2,1 kB)



**Abbildung 48: Beispiel einer RNA-Konzentrationsmessung mittels Biospektrometer infolge RNA-Isolation**

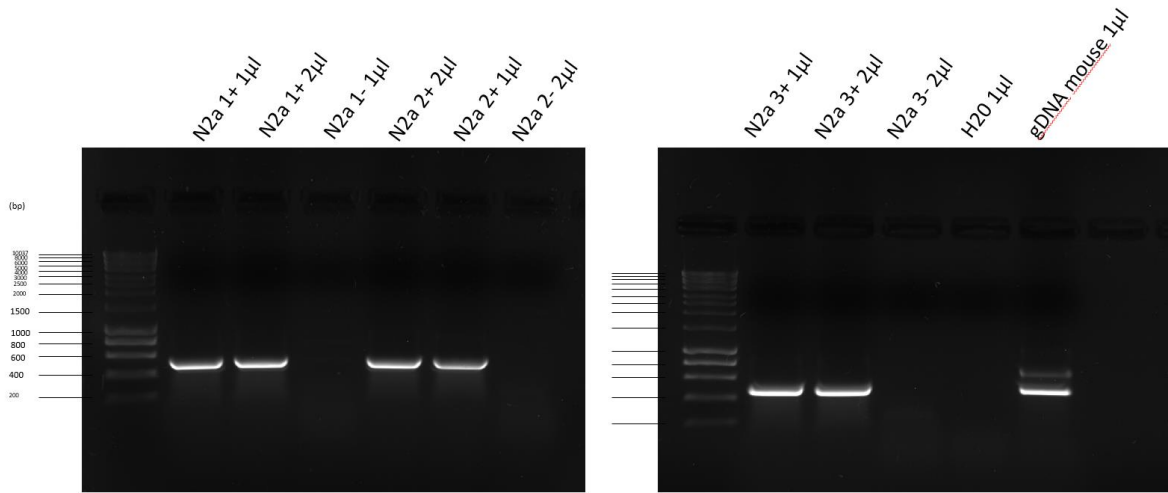


Abbildung 49: Beispielbild cDNA Qualitätskontrolle: Bei klarer Bande bei 1 µl cDNA-Volumen reicht dieses Volumen für qRT-PCR aus. Die Qualität der cDNA gilt hiermit für sichergestellt. Es handelt sich um cDNA-Proben von Neuro2a-Zellen.

Sequenzierungsergebnisse und Alignments

PRG1 s. oben (3.2.4.1)

PRG2:

|                   |                   |                                                   |                                            |                                                |     |
|-------------------|-------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------------|-----|
| rPRG2             | MI                | AKKEKNKTPKDSMTLLPCFYFVELPIVASSVVS                 | LYFLELTDLFQPAKVG                           | FQCHDRSLS                                      | 60  |
| peGFP-C1-rPRG2    | MI                | AKKEKNKTPKDSMTLLPCFYFVELPIVASSVVS                 | LYFLELTDLFQPAKVG                           | FQCHDRSLS                                      | 60  |
| peGFP-N1-rPRG2    | MI                | AKKEKNKTPKDSMTLLPCFYFVELPIVASSVVS                 | LYFLELTDLFQPAKVG                           | FQCHDRSLS                                      | 60  |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | MI                | AKKEKNKTPKDSMTLLPCFYFVELPIVASSVVS                 | LYFLELTDLFQPAKVG                           | FQCHDRSLS                                      | 60  |
| rPRG2             | MPYVETNEELIPL     | LMLLSLAF                                          | AAPAASIMV                                  | GEGMVYCLQSRLWGRGPGGVEGSINAGGCN                 | 120 |
| peGFP-C1-rPRG2    | MPYVETNEELIPL     | LMLLSLAF                                          | AAPAASIMV                                  | GEGMVYCLQSRLWGRGPGGVEGSINAGGCN                 | 120 |
| peGFP-N1-rPRG2    | MPYVETNEELIPL     | LMLLSLAF                                          | AAPAASIMV                                  | GEGMVYCLQSRLWGRGPGGVEGSINAGGCN                 | 120 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | MPYVETNEELIPL     | LMLLSLAF                                          | AAPAASIMV                                  | GEGMVYCLQSRLWGRGPGGVEGSINAGGCN                 | 120 |
| rPRG2             | FNSFLRRTVR        | FVG                                               | VHVFGLCATALVTDVIQLATGYHTPF                 | FLTVCKPNYTLTGTSCEANPY                          | 180 |
| peGFP-C1-rPRG2    | FNSFLRRTVR        | FVG                                               | VHVFGLCATALVTDVIQLATGYHTPF                 | FLTVCKPNYTLTGTSCEANPY                          | 180 |
| peGFP-N1-rPRG2    | FNSFLRRTVR        | FVG                                               | VHVFGLCATALVTDVIQLATGYHTPF                 | FLTVCKPNYTLTGTSCEANPY                          | 180 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | FNSFLRRTVR        | FVG                                               | VHVFGLCATALVTDVIQLATGYHTPF                 | FLTVCKPNYTLTGTSCEANPY                          | 180 |
| rPRG2             | ITQDICS           | GHDT                                              | HA                                         | ILSARKTFPSQHATLSAFAAVVSMYFNSVISDATKLLKPILVFAFA | 240 |
| peGFP-C1-rPRG2    | ITQDICS           | GHDT                                              | HA                                         | ILSARKTFPSQHATLSAFAAVVSMYFNSVISDATKLLKPILVFAFA | 240 |
| peGFP-N1-rPRG2    | ITQDICS           | GHDT                                              | HA                                         | ILSARKTFPSQHATLSAFAAVVSMYFNSVISDATKLLKPILVFAFA | 240 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | ITQDICS           | GHDT                                              | HA                                         | ILSARKTFPSQHATLSAFAAVVSMYFNSVISDATKLLKPILVFAFA | 240 |
| rPRG2             | IAAGVCGLTQITQYRSH | PVDVYAGFLIGAGIAAYLACHAVGNFQAPPAEKVPTPAPAKDA       |                                            |                                                | 300 |
| peGFP-C1-rPRG2    | IAAGVCGLTQITQYRSH | PVDVYAGFLIGAGIAAYLACHAVGNFQAPPAEKVPTPAPAKDA       |                                            |                                                | 300 |
| peGFP-N1-rPRG2    | IAAGVCGLTQITQYRSH | PVDVYAGFLIGAGIAAYLACHAVGNFQAPPAEKVPTPAPAKDA       |                                            |                                                | 300 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | IAAGVCGLTQITQYRSH | PVDVYAGFLIGAGIAAYLACHAVGNF                        | -----                                      |                                                | 283 |
| rPRG2             | LRVLTQ            | RGHESMYQQNKS                                      | VSTDELGPPGRLEGVPRPVAREKTSLGSLKRASVDVDLLAPR |                                                | 360 |
| peGFP-C1-rPRG2    | LRVLTQ            | RGHESMYQQNKS                                      | VSTDELGPPGRLEGVPRPVAREKTSLGSLKRASVDVDLLAPR |                                                | 360 |
| peGFP-N1-rPRG2    | LRVLTQ            | RGHESMYQQNKS                                      | VSTDELGPPGRLEGVPRPVAREKTSLGSLKRASVDVDLLAPR |                                                | 360 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | -----             |                                                   |                                            |                                                | 283 |
| rPRG2             | SPMGKEGMVTF       | SNTLPRVSTPSLDDPSRRHMTIHVPLDASRSRQLISEWKQKSLEGRGLG |                                            |                                                | 420 |

|                   |                                                                     |     |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| peGFP-C1-rPRG2    | SPMGKEGMVTFSTNLTPLRVSTPSLDDPSRRHMTIHVPLDASRSRQLISEWKQKSLEGRGLG      | 420 |
| peGFP-N1-rPRG2    | SPMGKEGMVTFSTNLTPLRVSTPSLDDPSRRHMTIHVPLDASRSRQLISEWKQKSLEGRGLG      | 420 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | -----                                                               | 283 |
| <b>rPRG2</b>      | <b>LPDEASPAHLRAPAEQVAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEGVPVPSLYPTVQARPGLGPRV</b> | 480 |
| peGFP-C1-rPRG2    | LPDEASPAHLRAPAEQVAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEGVPVPSLYPTVQARPGLGPRV        | 480 |
| peGFP-N1-rPRG2    | LPDEASPAHLRAPAEQVAEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEGVPVPSLYPTVQARPGLGPRV        | 480 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | -----                                                               | 283 |
| <b>rPRG2</b>      | <b>ILPPRPGPQPLIHIPPEEVQAGAGLSPKSSASVRAKWLSMVEKGGGPVAVAPPQPRVANP</b> | 540 |
| peGFP-C1-rPRG2    | ILPPRPGPQPLIHIPPEEVQAGAGLSPKSSASVRAKWLSMVEKGGGPVAVAPPQPRVANP        | 540 |
| peGFP-N1-rPRG2    | ILPPRPGPQPLIHIPPEEVQAGAGLSPKSSASVRAKWLSMVEKGGGPVAVAPPQPRVANP        | 540 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | -----                                                               | 283 |
| <b>rPRG2</b>      | <b>PRLQVIAMSKAAGGPKAETASSSSASSDSSQYRSPSDRDSASIVTIDAHAPHHPVVHLS</b>  | 600 |
| peGFP-C1-rPRG2    | PRLQVIAMSKAAGGPKAETASSSSASSDSSQYRSPSDRDSASIVTIDAHAPHHPVVHLS         | 600 |
| peGFP-N1-rPRG2    | PRLQVIAMSKAAGGPKAETASSSSASSDSSQYRSPSDRDSASIVTIDAHAPHHPVVHLS         | 600 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | -----                                                               | 283 |
| <b>rPRG2</b>      | <b>AGSTPWEWKAKVVEGEGGYELGDLARGFRSSCKQPGIGPGSPVSDVDQEEPRFGAVATVN</b> | 660 |
| peGFP-C1-rPRG2    | AGSTPWEWKAKVVEGEGGYELGDLARGFRSSCKQPGIGPGSPVSDVDQEEPRFGAVATVN        | 660 |
| peGFP-N1-rPRG2    | AGSTPWEWKAKVVEGEGGYELGDLARGFRSSCKQPGIGPGSPVSDVDQEEPRFGAVATVN        | 660 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | -----                                                               | 283 |
| <b>rPRG2</b>      | <b>LATGEGLPPPGASEGALGAGSRESTLRRQVGALGEREVEAEAESYRRMQARRYQD</b>      | 716 |
| peGFP-C1-rPRG2    | LATGEGLPPPGASEGALGAGSRESTLRRQVGALGEREVEAEAESYRRMQARRYQD             | 716 |
| peGFP-N1-rPRG2    | LATGEGLPPPGASEGALGAGSRESTLRRQVGALGEREVEAEAESYRRMQARRYQD             | 716 |
| peGFP-C1-rPRG2-ΔC | -----                                                               | 283 |

**Abbildung 50: Alignment der Aminosäuresequenzen der verwendeten Konstrukte rPRG2-eGFP, eGFP-rPRG2, eGFP-rPRG2-ΔC mit Referenzsequenz:** Es wurden keine Mutationen nachgewiesen. Verwendete Plasmide: peGFP-N1-rPrg2, peGFP-C1-rPrg2 und peGFP-C1-rPrg2-ΔC). Referenzsequenz von Uniprot: UniProt ID: Q7TMB0. Alignment wurde mittels UniProt durchgeführt. Die DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide wurden mittels Expsy in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und eine gemeinsame Sequenz mittels Alignment der Sequenzen von Forward und Reverse Primer ermittelt. Fett gedruckt sind die Transmembrandomänen (s. UniProt). Abbildung selbstkreiert basierend auf dem Alignment von UniProt.

**PRG3:** Im Vergleich mit der Referenzsequenz (von Uniprot kontrollierter Eintrag (reviewed entry (Swissprot)) zeigte sich an einer Stelle ein Unterschied in der Aminosäuresequenz (s. **Abbildung 51**). Wird jedoch die Aminosäuresequenz an dieser Stelle mit anderen Referenzsequenzen verglichen (s. **Abbildung 52**) zeigt sich, dass es sich vermutlich nicht um eine Mutation handelt, sondern um einen falschen UniProt-Eintrag in der einen Referenzsequenz.

|              |                                                                     |     |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>rPRG3</b> | <b>MAVENNTQRSYSIIPCFIFVELVIMAGTVLLAYFECTDTFQVHIQGGFCQDGDLMKPYP</b>  | 60  |
| rPRG3-eGFP   | MAVENNTQRSYSIIPCFIFVELVIMAGTVLLAYFECTDTFQVHIQGGFCQDGDLMKPYP         | 60  |
| <b>rPRG3</b> | <b>GTEESFISPLVLYCVLAATPTAIFIIGEISMYFIKSTRESLIAEEKMILTDCCYLSPL</b>   | 120 |
| rPRG3-eGFP   | GTEESFISPLVLYCVLAATPTAIFIIGEISMYFIKSTRESLIAEEKMILTDCCYLSPL          | 120 |
| <b>rPRG3</b> | <b>LRRIVRFIGVFAFGLFATDIFVNAGQVVTGHLTPYFLTVCQPNYTSTDCRAHHQFINNGN</b> | 180 |
| rPRG3-eGFP   | LRRIVRFIGVFAFGLFATDIFVNAGQVVTGHLTPYFLTVCQPNYTSTDCRAHHQFINNGN        | 180 |
| <b>rPRG3</b> | <b>ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLGDLCTAF</b> | 240 |



|              |                                                                     |            |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| rPRG3-eGFP   | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>LCTAF</b> | 240        |
| <b>rPRG3</b> | <b>LTGLNRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFKGTQGSASKPKPEDPRGVPLM</b> | <b>300</b> |
| rPRG3-eGFP   | LTGLNRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFKGTQGSASKPKPEDPRGVPLM        | 300        |
| <b>rPRG3</b> | <b>AFPRIESPLETTLAQNHASMTTEVT</b>                                    | <b>325</b> |
| rPRG3-eGFP   | AFPRIESPLETTLAQNHASMTTEVT                                           | 325        |

**Abbildung 51: Alignment der Aminosäuresequenzen des verwendeten rPRG3 Konstruktes (Plasmid: peGFP-N1-rPRG3) zu rPRG3 Referenzsequenz (UniProt):** **Blau:** Referenzsequenz (UniProt ID: Q6WAY2), **rot:** Mutation im Plasmid (Asparaginsäure zu Threonin). Alignment wurde mittels UniProt durchgeführt. Die DNA-Sequenz des verwendeten Plasmids wurde mittels Exsasy in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und eine gemeinsame Sequenz mittels Alignment der Sequenzen von Forward und Reverse Primer ermittelt. Fett gedruckt sind die Transmembrandomänen (s. UniProt). Abbildung selbstkreiert basierend auf dem Alignment von UniProt.

|                       |                                                                       |     |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| mPRG3 (Q8BFZ2)        | MAVENNTQRSYSII <b>PCFIFVELVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP | 60  |
| rPRG3 (A0A0G2K0B1)    | MAVENNTQRSYSII <b>PCFIFVELVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP | 60  |
| rPRG3 (F1LR11)        | MAVENNTQRSYSII <b>PCFIFVELVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP | 60  |
| <b>rPRG3-eGFP</b>     | MAVENNTQRSYSII <b>PCFIFVELVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP | 60  |
| <b>rPRG3 (Q6WAY2)</b> | MAVENNTQRSYSII <b>PCFIFVELVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP | 60  |
| hPRG1 (A0A0J9YYG5)    | ----- <b>MLYFQLVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP            | 44  |
| hPRG1 (M9MML5)        | MAVGNNQRSYSII <b>PCFIFVELVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP  | 60  |
| hPRG3 (Q8TBJ4)        | MAVGNNQRSYSII <b>PCFIFVELVIMAGTVLLAY</b> YFECTDTFQVHIQGFCCQDGDLMKPYP  | 60  |
| mPRG3 (Q8BFZ2)        | GTEES <b>FISPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLIAEEKMILTGDCCYLSPL  | 120 |
| rPRG3 (A0A0G2K0B1)    | GTEES <b>FISPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLIAEEKMILTGDCCYLSPL  | 120 |
| rPRG3 (F1LR11)        | GTEES <b>FISPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLIAEEKMILTGDCCYLSPL  | 120 |
| <b>rPRG3-eGFP</b>     | GTEES <b>FISPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLIAEEKMILTGDCCYLSPL  | 120 |
| <b>rPRG3 (Q6WAY2)</b> | GTEES <b>FISPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLIAEEKMILTGDCCYLSPL  | 120 |
| hPRG1 (A0A0J9YYG5)    | GTEES <b>FITPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLIAEKTILTGECCYNPL    | 104 |
| hPRG1 (M9MML5)        | GTEES <b>FITPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLI-----              | 103 |
| hPRG3 (Q8TBJ4)        | GTEES <b>FITPLVLYCVLAATPTAIIF</b> IGEISMYFIKSTRESLIAEKTILTGECCYNPL    | 120 |
| mPRG3 (Q8BFZ2)        | LRRIIRF <b>IGVFAFGLFATDIFVNAGQV</b> VTGHLTPYFLTVCQPNYTSTDCRAHQFINNGN  | 180 |
| rPRG3 (A0A0G2K0B1)    | LRRIIRF <b>IGVFAFGLFATDIFVNAGQV</b> VTGHLTPYFLTVCQPNYTSTDCRAHQFINNGN  | 180 |
| rPRG3 (F1LR11)        | LRRIIRF <b>IGVFAFGLFATDIFVNAGQV</b> VTGHLTPYFLTVCQPNYTSTDCRAHQFINNGN  | 180 |
| <b>rPRG3-eGFP</b>     | LRRIIRF <b>IGVFAFGLFATDIFVNAGQV</b> VTGHLTPYFLTVCQPNYTSTDCRAHQFINNGN  | 180 |
| <b>rPRG3 (Q6WAY2)</b> | LRRIIRF <b>IGVFAFGLFATDIFVNAGQV</b> VTGHLTPYFLTVCQPNYTSTDCRAHQFINNGN  | 180 |
| hPRG1 (A0A0J9YYG5)    | LRRIIRF <b>TGVFAFGLFATDIFVNAGQV</b> VTGHLTPYFLTVCQPNYTSADCQAHHQFINNGN | 164 |
| hPRG1 (M9MML5)        | -----                                                                 | 103 |
| hPRG3 (Q8TBJ4)        | LRRIIRF <b>TGVFAFGLFATDIFVNAGQV</b> VTGHLTPYFLTVCQPNYTSADCQAHHQFINNGN | 180 |
| mPRG3 (Q8BFZ2)        | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>TLCTAF</b>  | 240 |
| rPRG3 (A0A0G2K0B1)    | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>TLCTAF</b>  | 240 |
| rPRG3 (F1LR11)        | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>TLCTAF</b>  | 240 |
| <b>rPRG3-eGFP</b>     | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>TLCTAF</b>  | 240 |
| <b>rPRG3 (Q6WAY2)</b> | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>TLCTAF</b>  | 240 |
| hPRG1 (A0A0J9YYG5)    | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>TLCTAF</b>  | 224 |
| hPRG1 (M9MML5)        | -----                                                                 | 103 |
| hPRG3 (Q8TBJ4)        | ICTGDLEVIEKARRSFPSKHAALSIYSALYATMYITSTIKTKSSRLAKPVLCLG <b>TLCTAF</b>  | 240 |
| mPRG3 (Q8BFZ2)        | <b>LTGLNRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFRTQGS</b> PSKPKPEDPRGVPLM   | 300 |
| rPRG3 (A0A0G2K0B1)    | <b>LTGLNRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFRTQGS</b> ASKPKPEDPRGVPLM   | 300 |
| rPRG3 (F1LR11)        | <b>LTGLNRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFRTQGS</b> ASKPKPKPEDPRGVPLM | 300 |

|                       |                                                                      |     |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>rPRG3-eGFP</b>     | <b>LTGL</b> NRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFKGTQGSASKPKPEDPRGVPLM | 300 |
| <b>rPRG3 (Q6WAY2)</b> | <b>LTGL</b> NRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFKGTQGSASKPKPEDPRGVPLM | 300 |
| hPRG1 (A0A0J9YYG5)    | <b>LTGL</b> -----                                                    | 228 |
| hPRG1 (M9MML5)        | -----                                                                | 103 |
| hPRG3 (Q8TBJ4)        | <b>LTGL</b> NRVSEYRNHCSDVIAGFILGTAVALFLGMCVVHNFKGTQGSASKPKPEDPRGVPLM | 300 |
| mPRG3 (Q8BFZ2)        | AFPRIESPLETLSAQNHSASMT EVT                                           | 325 |
| rPRG3 (A0A0G2K0B1)    | AFPRIESPLETLSAQTF-----                                               | 318 |
| rPRG3 (F1LR11)        | AFPRIESPLETLSAQNHSASMT EVT                                           | 325 |
| <b>rPRG3-eGFP</b>     | AFPRIESPLETLSAQNHSASMT EVT                                           | 325 |
| <b>rPRG3 (Q6WAY2)</b> | AFPRIESPLETLSAQNHSASMT EVT                                           | 325 |
| hPRG1 (A0A0J9YYG5)    | -----                                                                | 228 |
| hPRG1 (M9MML5)        | -----                                                                | 103 |
| hPRG3 (Q8TBJ4)        | AFPRIESPLETLSAQNHSASMT EVT                                           | 325 |

**Abbildung 52: Alignment der Aminosäuresequenzen mehrerer PRG3-Sequenzen von UniProt mit der Sequenz des von mir verwendeten rPRG3-Konstruktes (Plasmid: peGFP-N1-rPRG3):** Es liegen mehrere Vergleichssequenzen vor, von welchen die Sequenz Q6WAY2 als einzige an Stelle 235 **Asparaginsäure** anstatt **Threonin** beinhaltet, was somit mutmaßlich eine fehlerhafte Angabe ist. Die DNA-Sequenz des verwendeten Plasmids wurde mittels Expsy in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und eine gemeinsame Sequenz mittels Alignment der Sequenzen von Forward und Reverse Primer ermittelt. **Fett gedruckt** sind die Transmembrandomänen (s. UniProt). Abbildung selbstkreiert basierend auf dem Alignment von UniProt.

#### PRG4: kein Nachweis einer Mutation

|              |                                                                       |     |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>mPRG4</b> | <b>MAGGRPHLKRFSIIPCFFVSVLLGIVVLLAYRLEFTDTFPVHTQGFFCYDSAYAKPY</b>      | 60  |
| mPRG4-eGFP   | MAGGRPHLKRFSIIPCFFVSVLLGIVVLLAYRLEFTDTFPVHTQGFFCYDSAYAKPY             | 60  |
| <b>mPRG4</b> | <b>PGPEAASRAPPALIYALVTAGPTLTILLGELARAFFPAPSSSPVSGESTIVSGACCRFS</b>    | 120 |
| mPRG4-eGFP   | PGPEAASRAPPALIYALVTAGPTLTILLGELARAFFPAPSSSPVSGESTIVSGACCRFS           | 120 |
| <b>mPRG4</b> | <b>PPLRRLVRFGLVYSFGLFTTTIFANAGQVVTGNPTPHFLSVCRPNY TALGCPPSPDRPG</b>   | 180 |
| mPRG4-eGFP   | PPLRRLVRFGLVYSFGLFTTTIFANAGQVVTGNPTPHFLSVCRPNY TALGCPPSPDRPG          | 180 |
| <b>mPRG4</b> | <b>PDRFVTDQSACAGSPSLVAAARRAFPCCKDAALCAYAVTYTAMYVTLVFRVKGSRVLVKPSL</b> | 240 |
| mPRG4-eGFP   | PDRFVTDQSACAGSPSLVAAARRAFPCCKDAALCAYAVTYTAMYVTLVFRVKGSRVLVKPSL        | 240 |
| <b>mPRG4</b> | <b>CLALLCPAFLVGVRVAEYRNHWS DVLGAGFLTGAATFLVTCVVHNFQSRPHSGRRLSP</b>    | 300 |
| mPRG4-eGFP   | CLALLCPAFLVGVRVAEYRNHWS DVLGAGFLTGAATFLVTCVVHNFQSRPHSGRRLSP           | 300 |
| <b>mPRG4</b> | <b>WEDLSQAPTMDSPLEKNRPAGRIHRHGS PHPSRRTVPAVAT</b>                     | 343 |
| mPRG4-eGFP   | WEDLSQAPTMDSPLEKNRPAGRIHRHGS PHPSRRTVPAVAT                            | 343 |

**Abbildung 53: Alignment der Aminosäuresequenzen des verwendeten mPRG4 Konstruktes (Plasmid: peGFP-N1-mPRG4) zu mPRG4 Referenzsequenz:** **Blau:** Referenzsequenz (UniProt ID: Q8VCY8). Alignment wurde mittels UniProt durchgeführt. Die DNA-Sequenz des verwendeten Plasmids wurde mittels Expsy in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und eine gemeinsame Sequenz mittels Alignment der Sequenzen von Forward und Reverse Primer ermittelt. **Fett gedruckt** sind die Transmembrandomänen (s. UniProt). Abbildung selbstkreiert basierend auf dem Alignment von UniProt.

#### PRG5: kein Nachweis einer Mutation

|              |                                                                     |     |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>rPRG5</b> | <b>MPLLPAALISSMLYFQMVIMAGTVMLAYFEYTDFTVNVQGGFFCHDSAYRKPYGPGEDS</b>  | 60  |
| rPRG5-eGFP   | MPLLPAALISSMLYFQMVIMAGTVMLAYFEYTDFTVNVQGGFFCHDSAYRKPYGPGEDS         | 60  |
| <b>rPRG5</b> | <b>SAVPPVLLYSLAAGVPVLVIIVGETAVFCLQLATRD FENQEKILTGDCCYINPLVRRTV</b> | 120 |

|              |                                                                                       |            |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| rPRG5-eGFP   | SAVPP <b>VLLYS</b> <b>LAAGVPVLVIIVGETAVFCL</b> QLATRDFENQEKTILTGDCCYINPLVRRTV         | 120        |
| <b>rPRG5</b> | <b>RFLGIYAFGLFATDIFVNAGQVV</b> TGNLAPHFLALCKPNYTALGCQQYTQFISGEEACTGN                  | <b>180</b> |
| rPRG5-eGFP   | R <b>FLGIYAFGLFATDIFVNAGQVV</b> TGNLAPHFLALCKPNYTALGCQQYTQFISGEEACTGN                 | 180        |
| <b>rPRG5</b> | <b>PDLIMRARKTFPSKEAALS</b> <b>VYAAMYL</b> <b>TMYITNTI</b> KAKGTRLAKPVLCLGLMCLAFLTGLN  | <b>240</b> |
| rPRG5-eGFP   | PDLIMRARKTFPSKE <b>AALS</b> <b>VYAAMYL</b> <b>TMYITNTI</b> KAKGTRLAKPVLCLGLMCLAFLTGLN | 240        |
| <b>rPRG5</b> | <b>RVAEYRNHWS</b> <b>DVIAGFLVGISIAVFLVVCVVNNF</b> KGRQPENGHLHRDENVARMPMTNIPRV         | <b>300</b> |
| rPRG5-eGFP   | RVAEYRNHWS <b>DVIAGFLVGISIAVFLVVCVVNNF</b> KGRQPENGHLHRDENVARMPMTNIPRV                | 300        |
| <b>rPRG5</b> | <b>ESPLEKNHITAF</b> AEVT                                                              | <b>316</b> |
| rPRG5-eGFP   | ESPLEKNHITAFAEVT                                                                      | 316        |

**Abbildung 54: Alignment der Aminosäuresequenzen des verwendeten rPRG5 Konstruktes (Plasmid: peGFP-N1-rPRG5) zu rPRG5 Referenzsequenz:** **Blau:** Referenzsequenz (UniProt ID: B3VQM3). Alignment wurde mittels UniProt durchgeführt. Die DNA-Sequenz des verwendeten Plasmids wurde mittels ExPASy in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und eine gemeinsame Sequenz mittels Alignment der Sequenzen von Forward und Reverse Primer ermittelt. **Fett gedruckt** sind die Transmembrandomänen (s. UniProt). Abbildung selbstkreiert basierend auf dem Alignment von UniProt.

## Plasmidkarten

Bei den verwendeten Plasmiden handelt es sich um Konstrukte, welche in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Bräuer bereits zu Vorzeiten meines Projektes kloniert wurden. Digitale Plasmidkarten standen nicht zur Verfügung. Mithilfe der Sequenzierungsergebnisse und bei bekannten Vektoren (pEGFP-N1/C1) wurden für einige der Plasmide innerhalb des Projektes mittels der Programme SnapGene Viewer und SerialCloner digitale Plasmidkarten erstellt, wobei diese nur eine Annäherung an die Wirklichkeit darstellen. Hierbei wurde digital eine Klonierung des PRG-Gens in den Vektor vorgenommen.

**CFPMem:** Plasmidkarte verfügbar unter (229)

### peGFP-N1-hPrg1

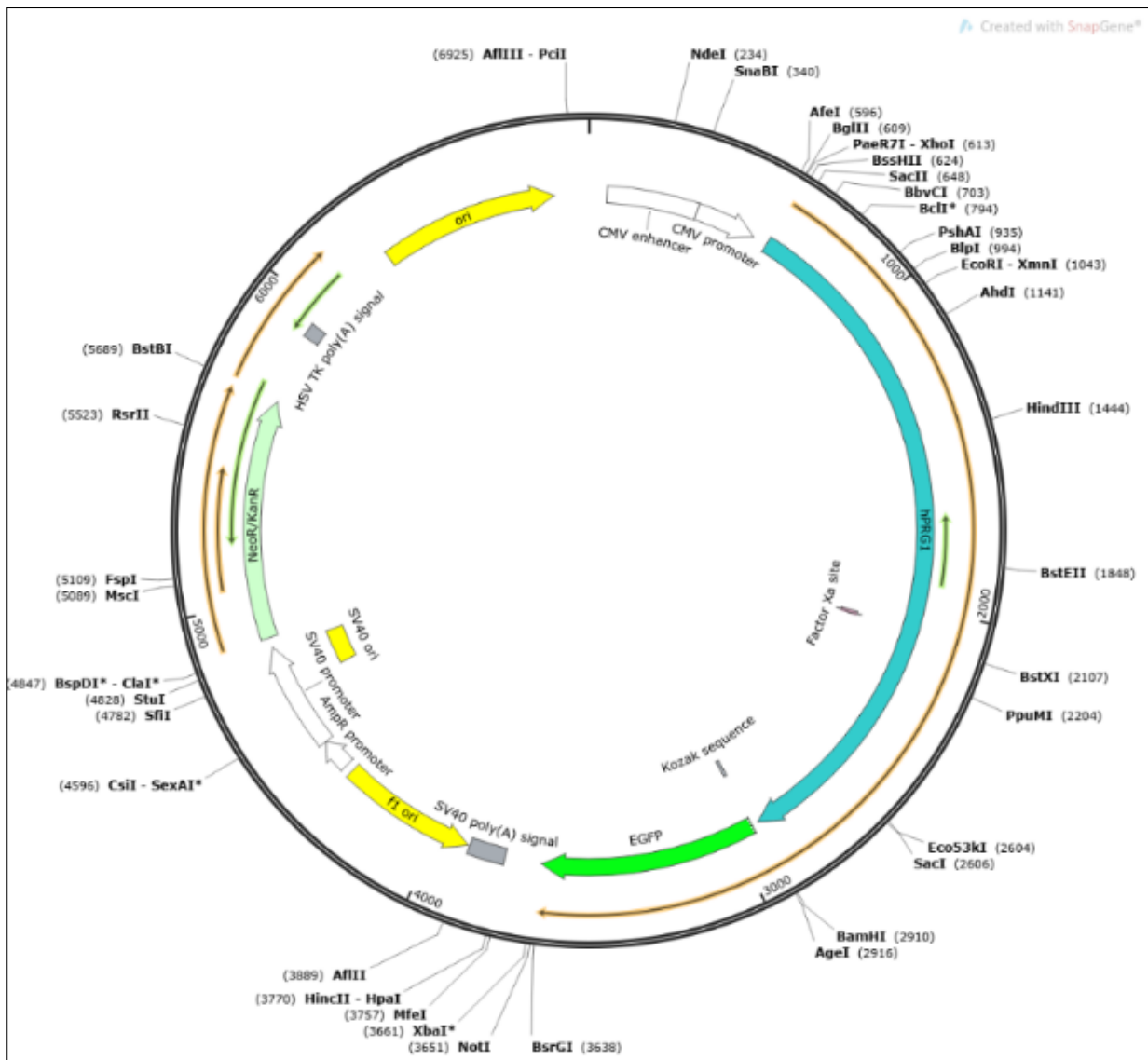


Abbildung 55: digitale Plasmidkarte peGFP-N1-hPrg1 13/79 (SnapGene Viewer)

peGFP-N1-rPrg2

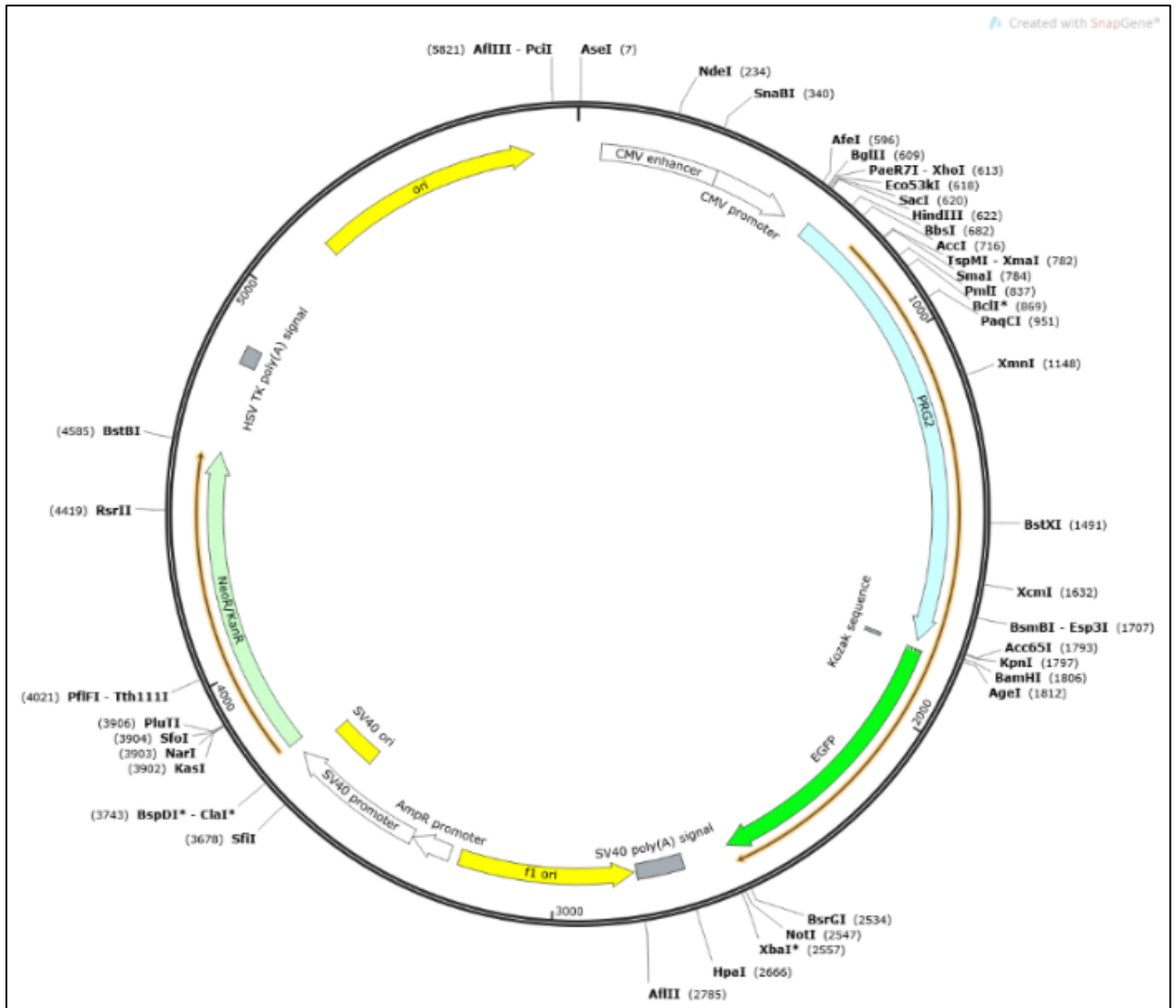


Abbildung 56: digitale Plasmidkarte peGFP-N1-rPrg2 39/69 (SnapGene Viewer)

peGFP-N1-rPrg3

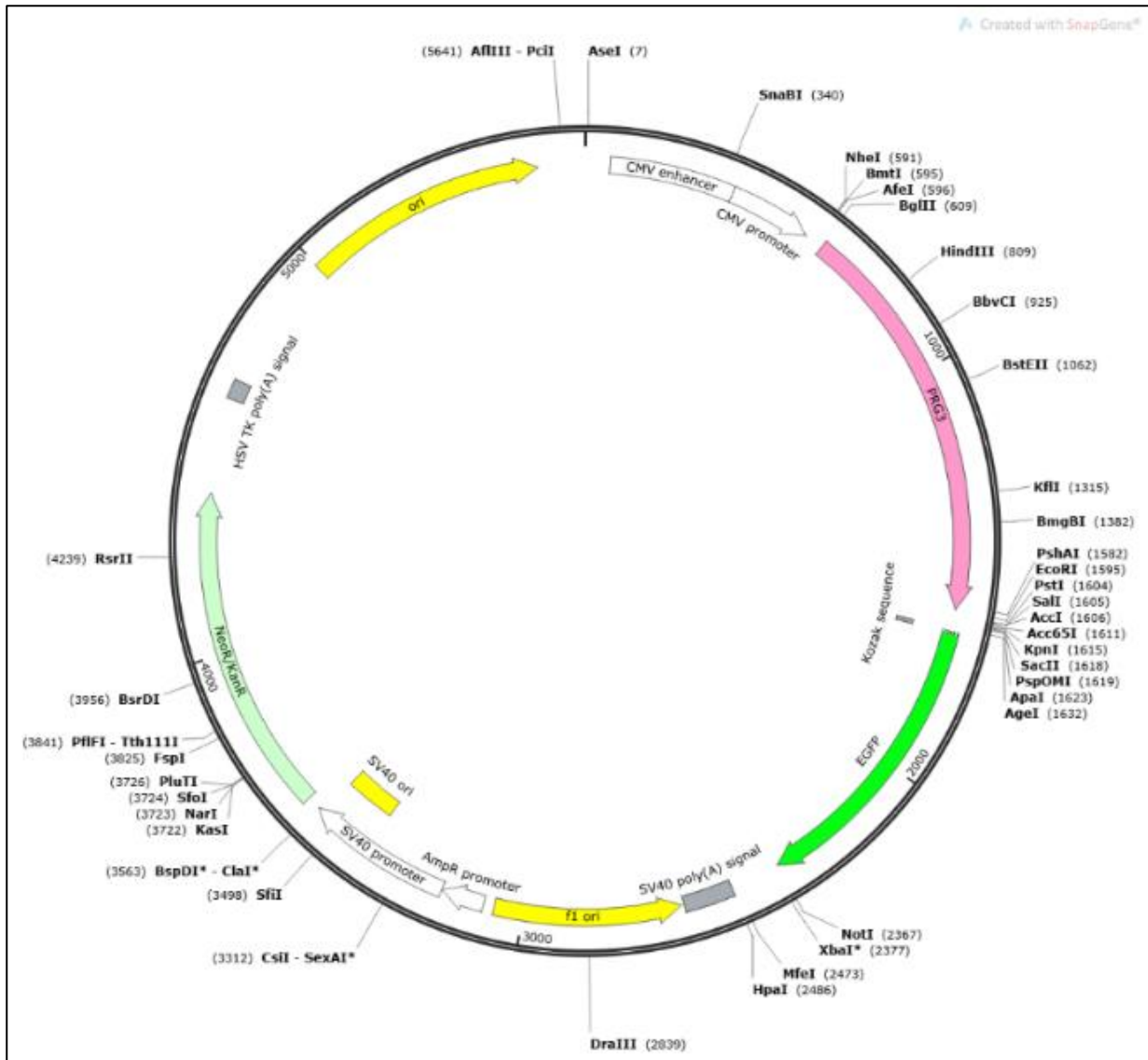


Abbildung 57: digitale Plasmidkarte peGFP-N1-rPrg3 35/65 (SnapGene Viewer)

peGFP-N1-mPrg4

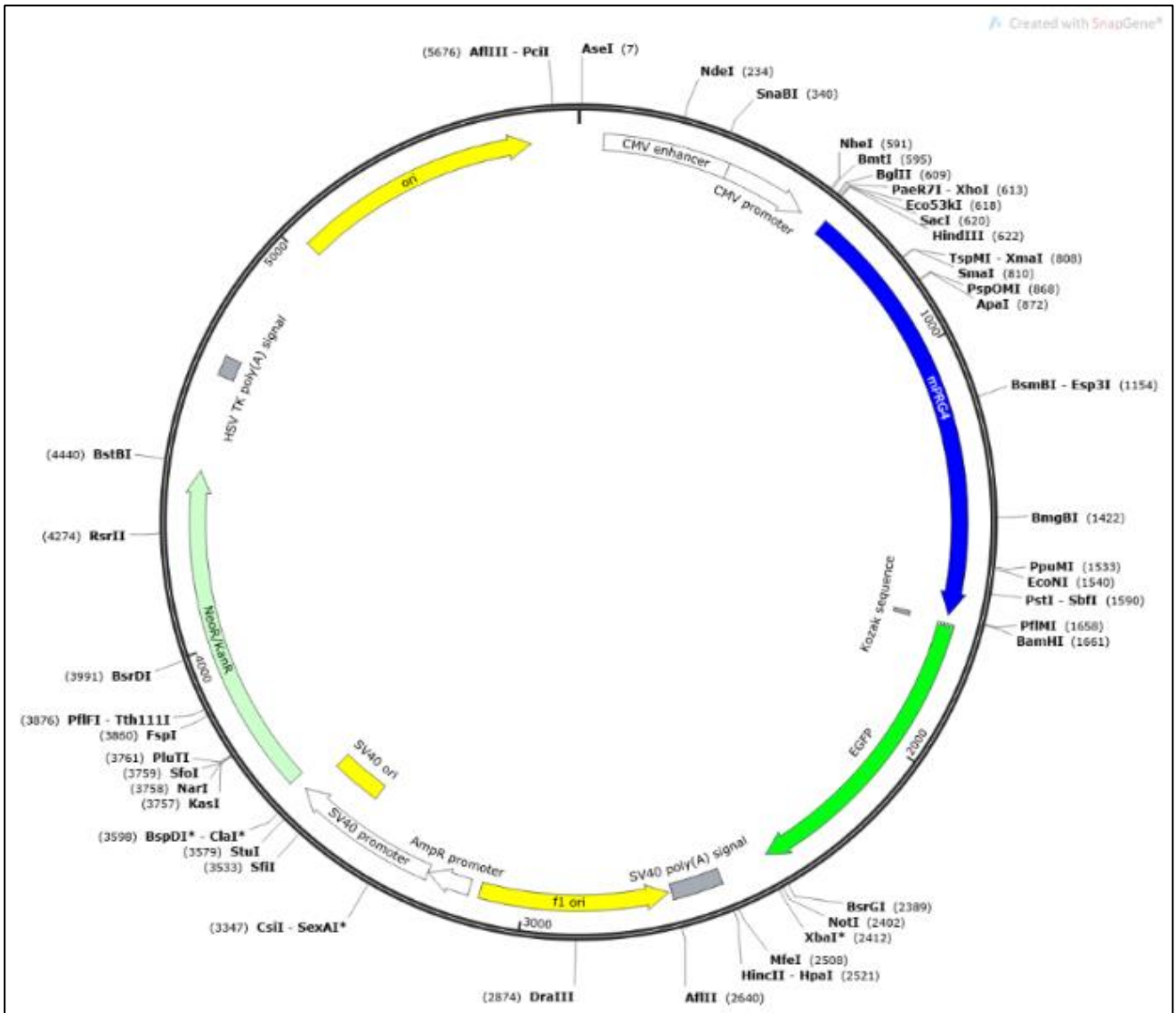


Abbildung 58: digitale Plasmidkarte peGFP-N1-mPrg4 5/143 (SnapGene Viewer)



peGFP-N1-rPrg5

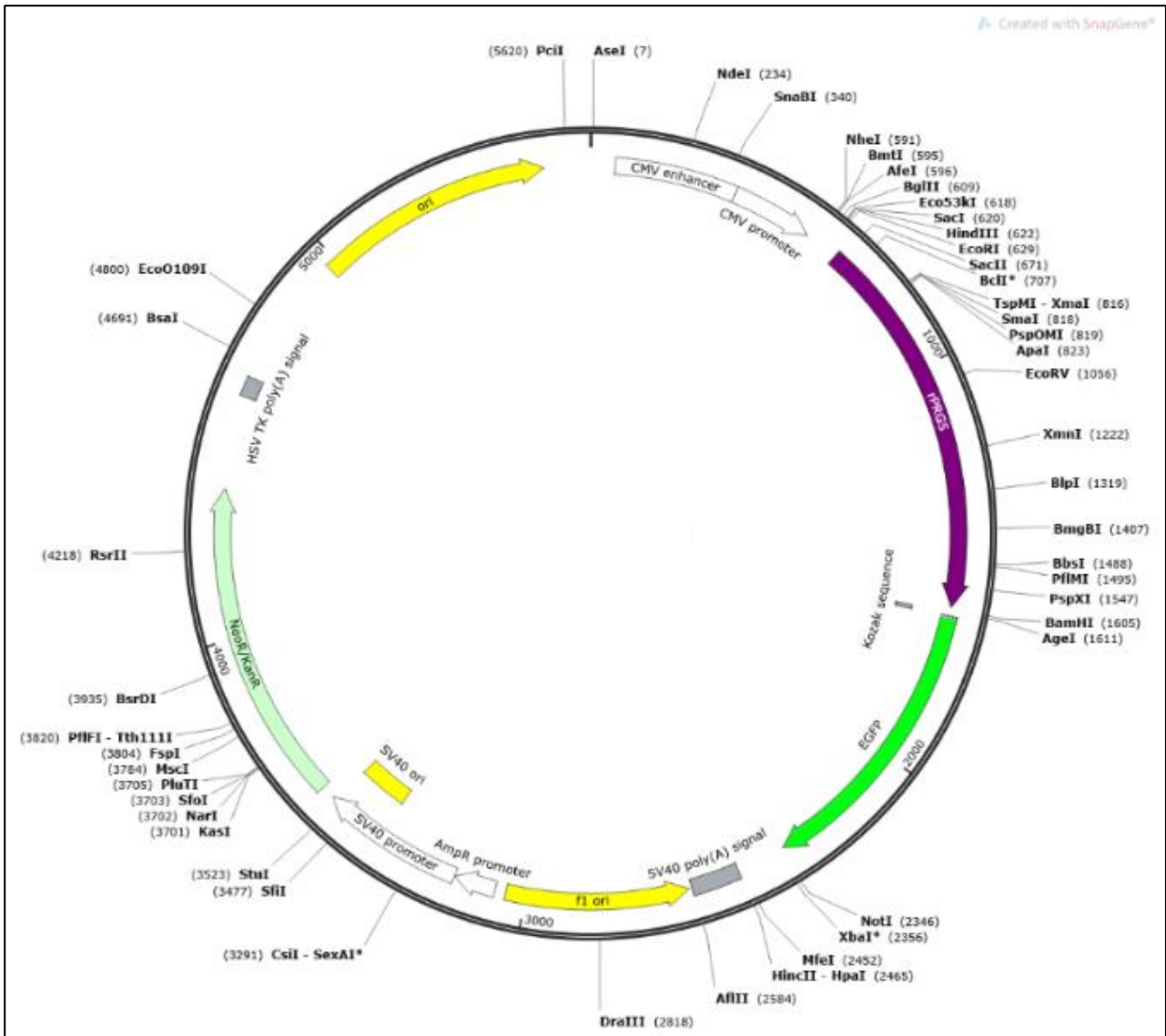


Abbildung 59: digitale Plasmidkarte peGFP-N1-rPrg5 37/146 (SnapGene Viewer)

**Material zur Erstellung der Plasmidkarten**

*Tabelle 38: Restriktionsenzyme, genutzt für das digitale Klonieren von PRGs in die jeweiligen Vektoren (um digitale Plasmidkarten zu erstellen) (Karten s.o.). Es handelt sich bei den Plasmidkarten nur um eine Annäherung der Realität, da das Plasmid nicht in Gänze sequenziert wurde und die tatsächlich verwendeten Restriktionsenzyme bei allen Plasmiden bekannt waren.*

| <b>peGFP-N1-hPrg1 (79)</b>                                                                                                                                                             |                          |                 |                              |                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|---------------------------|
| <b>Primer Name</b>                                                                                                                                                                     | <b>Restriktionsenzym</b> | <b>nonsense</b> | <b>Restriktionsabschnitt</b> | <b>Homologe Sequenz</b>   |
| hPRG1-eGFP-for_Xho1                                                                                                                                                                    | Xho I                    | tattc           | ctcgag                       | ATGCAGCGCGCTGGCTCCAG      |
| hPRG1-eGFP-rev_BamHI                                                                                                                                                                   | BamHI                    | tattc           | ggatccat                     | ATCCTTATAAGCCCGTGTGG<br>G |
| <b>peGFP-N1-rPrg2 (69)</b>                                                                                                                                                             |                          |                 |                              |                           |
| <b>Primer Name</b>                                                                                                                                                                     | <b>Restriktionsenzym</b> | <b>Zusatz</b>   | <b>Restriktionsabschnitt</b> | <b>Homologe Sequenz</b>   |
| rPRG2-eGFP-for_HindIII                                                                                                                                                                 | HindIII                  | tattc           | AAGCTT                       | ggccctccggggaggttaga      |
| rPRG2-eGFP-rev_BamHI                                                                                                                                                                   | BamHI                    | tattc           | ggatccat                     | GTCCTGGTACCTCCTGGCCT      |
| <b>peGFP-N1-rPrg3 (65)</b>                                                                                                                                                             |                          |                 |                              |                           |
| <b>Primer Name</b>                                                                                                                                                                     | <b>Restriktionsenzym</b> | <b>nonsense</b> | <b>Restriktionsabschnitt</b> | <b>Homologe Sequenz</b>   |
| rPRG3-eGFP-for_Blg2                                                                                                                                                                    | Blg2                     | tattc           | AGATCT                       | ATGGCTGTAGAGAACAACAC      |
| rPRG3-eGFP-rev_EcoR1                                                                                                                                                                   | EcoR1                    | tattc           | GAATTCat                     | GGTGA CTTCGGTCATGGAGG     |
| <b>peGFP-N1-mPrg4 (143)</b>                                                                                                                                                            |                          |                 |                              |                           |
| <b>Primer Name</b>                                                                                                                                                                     | <b>Restriktionsenzym</b> | <b>nonsense</b> | <b>Restriktionsabschnitt</b> | <b>Homologe Sequenz</b>   |
| mPRG4-eGFP-HindIII                                                                                                                                                                     | Hind III                 | tattc           | AAGCTT                       | atggctggaggagacctca       |
| mPRG4-eGFP-BamHI                                                                                                                                                                       | BamHI                    | tattc           | GGATCCat                     | caggtggccacggcgggcac      |
| <b>peGFP-N1-rPrg5 (143)</b> → Plasmidkarte erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Danara Vonk, PhD Studentin ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Bräuer |                          |                 |                              |                           |

## Deskriptive Statistiken zu Abbildungen

## Zu Abbildung 16

Tabelle 39: deskriptive Statistik zu Abbildung 16: Werte relativ zu GAPDH. Für weitere Informationen s. ebd.

|             | Neuro2a               |                       | Neocortex P5 |                    |
|-------------|-----------------------|-----------------------|--------------|--------------------|
|             | Mittelwert            | Standardabweichung    | Mittelwert   | Standardabweichung |
| <b>PRG1</b> | 0,00026762            | 0,000138617887550633  |              |                    |
| <b>PRG2</b> | 0,00136258566666667   | 0,0002913443402751    |              |                    |
| <b>PRG3</b> | 4,67490333333333e-006 | 2,44548548518149e-006 | 0,004217     | 0,003652           |
| <b>PRG4</b> | 0,00724060966666667   | 0,0026929917235501    |              |                    |
| <b>PRG5</b> | 0,00393122666666667   | 0,00178456362468429   |              |                    |

Tabelle 40: deskriptive Statistik zu Abbildung 16: Werte relativ zu Aktin. Für weitere Informationen s. ebd.

|             | Neuro2a             |                       | Neocortex P5 |                    |
|-------------|---------------------|-----------------------|--------------|--------------------|
|             | Mittelwert          | Standardabweichung    | Mittelwert   | Standardabweichung |
| <b>PRG1</b> | 0,0000777082        | 0,0000469982684459757 |              |                    |
| <b>PRG2</b> | 0,00039306366666667 | 0,0001426043157914    |              |                    |
| <b>PRG3</b> | 1,186297e-006       | 3,15132151179469e-007 | 0,004217     | 0,003652           |
| <b>PRG4</b> | 0,00210211233333333 | 0,00108993145782583   |              |                    |
| <b>PRG5</b> | 0,00116951833333333 | 0,000627085465771878  |              |                    |

## Zu Abbildung 27

Tabelle 41: deskriptive Statistik zu Abbildung 27. Für weitere Informationen s. ebd.

| CFPMem vs     | A             | B             | C       | D             | E             | F      | G             | H             | I       |
|---------------|---------------|---------------|---------|---------------|---------------|--------|---------------|---------------|---------|
| rPRG2-eGFP    | 0,1335        | 0,6354        | >0,9999 | 0,1791        | 0,3966        | 0,8974 | 0,0982        | 0,8696        | >0,9999 |
| eGFP-rPRG2    | <b>0,0005</b> | <b>0,0141</b> | >0,9999 | 0,3957        | >0,9999       | 0,6295 | >0,9999       | 0,8344        | >0,9999 |
| eGFP-rPRG2-ΔC | 0,3373        | >0,9999       | >0,9999 | <b>0,0124</b> | >0,9999       | 0,8974 | <i>0,0815</i> | 0,4321        | 0,2067  |
| rPRG3-eGFP    | <b>0,0022</b> | 0,3219        | >0,9999 | >0,9999       | <b>0,0430</b> | 0,6295 | 0,2756        | <b>0,0456</b> | 0,3310  |

Tabelle 42: deskriptive Statistik zu Abbildung 27: Für weitere Informationen s. ebd.

|   | CFPMem |       | rPRG2-eGFP |       | eGFP-rPRG2 |       | eGFP-rPRG2-ΔC |       | rPRG3-eGFP |       |
|---|--------|-------|------------|-------|------------|-------|---------------|-------|------------|-------|
|   | Median | IQR   | Median     | IQR   | Median     | IQR   | Median        | IQR   | Median     | IQR   |
| A | 3,5    | 2     | 5          | 3     | 6          | 3     | 4             | 3     | 6          | 3     |
| B | 66,68  | 57,64 | 92,21      | 47,95 | 106,6      | 62,36 | 78,66         | 67,29 | 86,68      | 67,51 |
| C | 18,45  | 18,08 | 19,08      | 12,13 | 18,17      | 16,39 | 20,05         | 13,56 | 15,79      | 11,91 |
| D | 1,83   | 1,26  | 1,46       | 0,86  | 1,547      | 0,77  | 1,36          | 0,73  | 1,53       | 1,14  |
| E | 1,94   | 1,12  | 2,19       | 0,93  | 1,85       | 0,7   | 1,80          | 1,08  | 2,50       | 1,7   |

|   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| F | 0,19 | 0,15 | 0,21 | 0,14 | 0,15 | 0,11 | 0,18 | 0,14 | 0,25 | 0,2  |
| G | 1,23 | 0,95 | 0,85 | 0,55 | 0,95 | 0,55 | 0,76 | 0,86 | 0,84 | 0,56 |
| H | 0,51 | 0,53 | 0,52 | 0,59 | 0,44 | 0,36 | 0,29 | 0,51 | 0,68 | 0,46 |
| I | 0,05 | ,21  | 0,08 | 0,16 | 0,02 | 0,15 | 0    | 0,10 | 0,21 | 0,45 |

### Zu Abbildung 28

**Tabelle 43: deskriptive Statistik zu Abbildung 28:** Expression relativ zu den Referenzgenen Aktin und GAPDH. Für weitere Informationen s. Abbildung 28.

|              | Neuro2a (rel zu Aktin) |                       | Neuro2a (rel zu GAPDH) |                       |
|--------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
|              | Mittelwert             | Standardabweichung    | Mittelwert             | Standardabweichung    |
| <b>Lpar1</b> | 0,0059093143333333     | 0,00113144781923884   | 0,0155230353333333     | 0,00945113509124197   |
| <b>Lpar2</b> | 0,00559580366666667    | 0,00303598879356633   | 0,0209287746666667     | 0,0149076497713098    |
| <b>Lpar3</b> | 0                      | 0                     | 0                      | 0                     |
| <b>Lpar4</b> | 1,67951666666667e-004  | 5,36500831810477e-005 | 0,000588033333333333   | 1,52961427978864e-004 |
| <b>Lpar5</b> | 2,75331e-004           | 1,59363084156903e-004 | 0,00127505166666667    | 0,00118937591259969   |
| <b>Lpar6</b> | 0,0058689369           | 0,00514949077664716   | 0,0187224149           | 0,0163492437903833    |

**Tabelle 44: deskriptive Statistik zu Abbildung 28:** Expression relativ zu Referenzgen Aktin. Für weitere Informationen s. Abbildung 28.

|              | Hoden 12 Monate        |                        | Hoden P20             |                      | Hoden P30    |                       |
|--------------|------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|--------------|-----------------------|
|              | Mittelwert             | Standardabweichung     | Mittelwert            | Standardabweichung   | Mittelwert   | Standardabweichung    |
| <b>Lpar3</b> | 0,00000500001213333333 | 0,00000866024353008017 | 0,0000542240666666667 | 0,000021981182433239 | 0,0000515693 | 0,0000352680301064576 |

**Tabelle 45: deskriptive Statistik zu Abbildung 28:** Expression relativ zu Referenzgen GAPDH. Für weitere Informationen s. ebd.

|              | Hoden 12 Monate        |                        | Hoden P20   |                       | Hoden P30            |                      |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
|              | Mittelwert             | Standardabweichung     | Mittelwert  | Standardabweichung    | Mittelwert           | Standardabweichung   |
| <b>Lpar3</b> | 0,00000500001213333333 | 0,00000866024353008017 | 0,000092385 | 0,0000544159891116573 | 0,000269640933333333 | 0,000218912068665511 |

### Zu Abbildung 30

**Tabelle 46: deskriptive Werte zu Abbildung 30.** Für weitere Informationen s. ebd.

| <b>A</b>                                              | Mittelwert | Standardabweichung |
|-------------------------------------------------------|------------|--------------------|
| Krebs-Ringer's Lösung komplett                        | 19,2       | 17,89              |
| Kontrolllösung 1: FAFBSA 1% Puffer in Ringer komplett | 25,28      | 15,91              |
| Kontrolllösung 2: FAFBSA 1% Puffer in DMEM            | 69,85      | 5,883              |

|                                                         |       |       |
|---------------------------------------------------------|-------|-------|
| Kontrolllösung 3: FAFBSA 1% Puffer in Ringer ohne Salze | 99,02 | 1,697 |
| LPA (in Kontrolllösung 1)                               | 68,18 | 17,41 |

Tabelle 47: P-Werte zu Abbildung 30. Für weitere Informationen s. ebd.

| Lösung 1 vs                    | Lösung 2                  |    | p-Wert  |
|--------------------------------|---------------------------|----|---------|
| Krebs-Ringer's Lösung komplett | Kontrolllösung 1          | ns | >0,9999 |
| Krebs-Ringer's Lösung komplett | Kontrolllösung 2          | ns | 0,1183  |
| Krebs-Ringer's Lösung komplett | Kontrolllösung 3          | ** | 0,0058  |
| Krebs-Ringer's Lösung komplett | LPA (in Kontrolllösung 1) | *  | 0,0383  |
| Kontrolllösung 1               | Kontrolllösung 2          | ns | 0,4570  |
| Kontrolllösung 1               | Kontrolllösung 3          | ns | 0,0507  |
| Kontrolllösung 1.              | LPA (in Kontrolllösung 1) | ns | 0,3097  |
| Kontrolllösung 2               | Kontrolllösung 3          | ns | >0,9999 |
| Kontrolllösung 2               | LPA (in Kontrolllösung 1) | ns | >0,9999 |
| Kontrolllösung 3               | LPA (in Kontrolllösung 1) | ns | >0,9999 |

**Zu Abbildung 32**

Tabelle 48: deskriptive Werte zu Abbildung 32. Für weitere Informationen s. ebd.

|                    | Zeit (min) | Mittelwert | Standardabweichung |
|--------------------|------------|------------|--------------------|
| Kontrollbehandlung | 0          | 84,89      | 42,27              |
|                    | 5          | 78,30      | 57,69              |
|                    | 10         | 74,80      | 50,91              |
|                    | 15         | 74,61      | 51,22              |
|                    | 20         | 72,66      | 50,83              |
| LPA 10 $\mu$ M     | 0          | 72,66      | 50,83              |
|                    | 5          | 46,48      | 33,72              |
|                    | 10         | 37,83      | 30,23              |
|                    | 15         | 32,93      | 28,81              |
|                    | 20         | 29,55      | 27,24              |

**Zu Abbildung 35**

Tabelle 49: deskriptive Statistik zu Abbildung 35. Für weitere Informationen s. ebd.

|                       | Zeit (min) | Mittelwert | Standardabweichung |
|-----------------------|------------|------------|--------------------|
| Kontrollbehandlung 10 | 0          | 43,00      | 24,74              |
|                       | 5          | 39,64      | 25,03              |
|                       | 10         | 35,66      | 24,20              |
|                       | 15         | 34,92      | 21,07              |
|                       | 20         | 36,50      | 20,80              |

|                      |    |       |       |
|----------------------|----|-------|-------|
| LPA 10 $\mu$ M       | 0  | 36,50 | 20,80 |
|                      | 5  | 20,62 | 19,91 |
|                      | 10 | 9,54  | 11,70 |
|                      | 15 | 6,10  | 9,28  |
|                      | 20 | 5,35  | 8,33  |
| Kontrollbehandlung 5 | 0  | 34,48 | 19,94 |
|                      | 5  | 32,58 | 18,63 |
|                      | 10 | 30,96 | 17,07 |
|                      | 15 | 30,71 | 17,57 |
|                      | 20 | 31,85 | 17,97 |
| LPA 5 $\mu$ M        | 0  | 31,85 | 17,97 |
|                      | 5  | 23,61 | 14,99 |
|                      | 10 | 21,51 | 14,50 |
|                      | 15 | 19,38 | 14,58 |
|                      | 20 | 19,06 | 15,36 |

**Zu Abbildung 36***Tabelle 50: Deskriptive Werte zu Abbildung 36 (absolute Werte in  $\mu$ m). Für weitere Informationen s. ebd.*

| Zeit LPA 10 $\mu$ M Behandlung (min) |                    | 0     | 5     | 10    | 15    | 20    |
|--------------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CFPMem (1, 220)                      | Mittelwert         | 36,50 | 20,62 | 9,54  | 6,10  | 5,35  |
|                                      | Standardabweichung | 20,80 | 19,91 | 11,70 | 9,28  | 8,33  |
|                                      | N                  | 23    | 23    | 23    | 23    | 23    |
| rPRG2-eGFP (2, 69)                   | Mittelwert         | 26,75 | 21,28 | 14,57 | 12,46 | 11,11 |
|                                      | Standardabweichung | 13,26 | 14,27 | 16,72 | 15,68 | 15,68 |
|                                      | N                  | 15    | 15    | 15    | 15    | 15    |
| eGFP-rPRG2 (3, 182)                  | Mittelwert         | 46,45 | 31,08 | 26,66 | 21,26 | 19,55 |
|                                      | Standardabweichung | 24,89 | 23,13 | 19,91 | 17,86 | 18,10 |
|                                      | N                  | 17    | 17    | 17    | 17    | 17    |
| eGFP-rPRG2 DeltaC (4, 140)           | Mittelwert         | 24,60 | 16,31 | 11,79 | 9,52  | 8,33  |
|                                      | Standardabweichung | 16,12 | 15,06 | 12,29 | 11,08 | 10,76 |
|                                      | N                  | 16    | 16    | 16    | 16    | 16    |
| rPRG3-eGFP (5, 65)                   | Mittelwert         | 34,50 | 25,23 | 21,55 | 18,88 | 17,76 |
|                                      | Standardabweichung | 21,12 | 21,34 | 21,25 | 21,81 | 21,39 |
|                                      | N                  | 26    | 26    | 26    | 26    | 26    |

**Tabelle 51: Deskriptive Werte zu Abbildung 36 (relative Werte in %).** Für weitere Informationen s. ebd.

| <b>Zeit LPA 10 <math>\mu</math>M Behandlung (min)</b> |                    | <b>0</b> | <b>5</b> | <b>10</b> | <b>15</b> | <b>20</b> |
|-------------------------------------------------------|--------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| CFPMem (1, 220)                                       | Mittelwert         | 100      | 47,84435 | 23,76304  | 14,7813   | 13,00913  |
|                                                       | Standardabweichung | 0        | 30,94645 | 23,34816  | 18,34445  | 16,83047  |
|                                                       | N                  | 23       | 23       | 23        | 23        | 23        |
| rPRG2-eGFP (2, 69)                                    | Mittelwert         | 100      | 78,53267 | 46,84867  | 38,896    | 33,27133  |
|                                                       | Standardabweichung | 0        | 27,95758 | 40,08407  | 37,74094  | 37,7704   |
|                                                       | N                  | 15       | 15       | 15        | 15        | 15        |
| eGFP-rPRG2 (3, 182)                                   | Mittelwert         | 100      | 60,00706 | 53,73294  | 41,98118  | 38,16471  |
|                                                       | Standardabweichung | 0        | 26,20836 | 26,23787  | 24,64734  | 27,90399  |
|                                                       | N                  | 17       | 17       | 17        | 17        | 17        |
| eGFP-rPRG2 DeltaC (4, 140)                            | Mittelwert         | 100      | 60,14375 | 40,93813  | 32,41938  | 29,46563  |
|                                                       | Standardabweichung | 0        | 34,25212 | 33,95854  | 32,25058  | 34,41797  |
|                                                       | N                  | 16       | 16       | 16        | 16        | 16        |
| rPRG3-eGFP (5, 65)                                    | Mittelwert         | 100      | 70,03885 | 58,42692  | 47,63538  | 43,69808  |
|                                                       | Standardabweichung | 0        | 29,79808 | 30,44163  | 32,40384  | 34,23732  |
|                                                       | N                  | 26       | 26       | 26        | 26        | 26        |

**Tabelle 52: Signifikanzniveaus zugehörig zu Abbildung 36.** Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Korrektur für das multiple Testen (SPSS) verwendet (*p*-Werte: ns - *p* > 0.05, \* - *p* < 0.05, \*\* - *p* < 0.01, \*\*\* - *p* < 0.001).

| <b>10 <math>\mu</math>M absolute Werte (<math>\mu</math>M)</b> | <b>CFPMem vs.</b> |                   |                                        |                   |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------------|-------------------|
| <b>Dauer LPA Behandlung</b>                                    | <b>rPRG2-eGFP</b> | <b>eGFP-rPRG2</b> | <b>eGFP-rPRG2-<math>\Delta</math>C</b> | <b>rPRG3-eGFP</b> |
| <b>0 min</b>                                                   | 1,000             | 1,000             | 0,614                                  | 1,000             |
| <b>5 min</b>                                                   | 1,000             | 0,804             | 1,000                                  | 1,000             |
| <b>10 min</b>                                                  | 1,000             | 0,011*            | 1,000                                  | 0,066             |
| <b>15 min</b>                                                  | 1,000             | 0,009**           | 1,000                                  | 0,028*            |
| <b>20 min</b>                                                  | 1,000             | 0,014*            | 1,000                                  | 0,032*            |
| <b>10 <math>\mu</math>M relative Werte (%)</b>                 | <b>CFPMem vs.</b> |                   |                                        |                   |
| <b>Dauer LPA Behandlung</b>                                    | <b>rPRG2-eGFP</b> | <b>eGFP-rPRG2</b> | <b>eGFP-rPRG2-<math>\Delta</math>C</b> | <b>rPRG3-eGFP</b> |
| <b>0 min</b>                                                   | 1,000             | 1,000             | 1,000                                  | 1,000             |
| <b>5 min</b>                                                   | 0,027**           | 1,000             | 1,000                                  | 0,170             |
| <b>10 min</b>                                                  | 0,418             | 0,036*            | 1,000                                  | 0,002**           |
| <b>15 min</b>                                                  | 0,269             | 0,017*            | 0,600                                  | 0,002**           |
| <b>20 min</b>                                                  | 1,000             | 0,037*            | 1,000                                  | 0,005**           |

**Zu Abbildung 38:****Tabelle 53: Deskriptive Werte zu Abbildung 38 (absolute Werte in  $\mu\text{m}$ ). Für weitere Informationen s. ebd.**

| <b>Zeit LPA 5 <math>\mu\text{M}</math> Behandlung (min)</b> |                    | <b>0</b> | <b>5</b> | <b>10</b> | <b>15</b> | <b>20</b> |
|-------------------------------------------------------------|--------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| CFPMem (1, 220)                                             | Mittelwert         | 31,85    | 23,61263 | 21,50921  | 19,37789  | 19,06     |
|                                                             | Standardabweichung | 17,97419 | 14,98913 | 14,49878  | 14,58359  | 15,3622   |
|                                                             | N                  | 38       | 38       | 38        | 38        | 38        |
| rPRG2-eGFP (2, 69)                                          | Mittelwert         | 22,0965  | 14,5125  | 11,2755   | 10,5475   | 9,971     |
|                                                             | Standardabweichung | 12,2677  | 12,17831 | 9,723052  | 10,00104  | 9,973246  |
|                                                             | N                  | 20       | 20       | 20        | 20        | 20        |
| eGFP-rPRG2 (3, 182)                                         | Mittelwert         | 24,23923 | 17,32577 | 14,04462  | 12,23654  | 11,32577  |
|                                                             | Standardabweichung | 16,8885  | 15,38026 | 14,64337  | 13,96549  | 13,49004  |
|                                                             | N                  | 26       | 26       | 26        | 26        | 26        |
| eGFP-rPRG2 DeltaC (4, 140)                                  | Mittelwert         | 21,37111 | 13,18167 | 10,83611  | 9,813333  | 8,508333  |
|                                                             | Standardabweichung | 12,92351 | 12,27348 | 11,31643  | 11,20603  | 9,703425  |
|                                                             | N                  | 18       | 18       | 18        | 18        | 18        |
| rPRG3-eGFP (5, 65)                                          | Mittelwert         | 18,35382 | 15,23735 | 12,66727  | 10,92667  | 10,38242  |
|                                                             | Standardabweichung | 11,26674 | 10,48421 | 10,65761  | 10,01154  | 9,758549  |
|                                                             | N                  | 33       | 33       | 33        | 33        | 33        |

**Tabelle 54: Deskriptive Werte zu Abbildung 38 (relative Werte in %). Für weitere Informationen s. ebd.**

| <b>Zeit LPA 5 <math>\mu\text{M}</math> Behandlung (min)</b> |                    | <b>0</b> | <b>5</b> | <b>10</b> | <b>15</b> | <b>20</b> |
|-------------------------------------------------------------|--------------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| CFPMem (1, 220)                                             | Mittelwert         | 100      | 74,17921 | 67,12974  | 60,34974  | 58,38895  |
|                                                             | Standardabweichung | 0        | 20,92389 | 23,2281   | 25,0458   | 27,22716  |
|                                                             | N                  | 38       | 38       | 38        | 38        | 38        |
| rPRG2-eGFP (2, 69)                                          | Mittelwert         | 100      | 54,5605  | 44,0235   | 41,32     | 39,41     |
|                                                             | Standardabweichung | 0        | 32,55141 | 27,38043  | 29,68072  | 29,61053  |
|                                                             | N                  | 20       | 20       | 20        | 20        | 20        |
| eGFP-rPRG2 (3, 182)                                         | Mittelwert         | 100      | 75,79654 | 61,53692  | 55,17     | 54,99346  |
|                                                             | Standardabweichung | 0        | 55,92666 | 54,47779  | 55,14153  | 66,41047  |
|                                                             | N                  | 26       | 26       | 26        | 26        | 26        |
| eGFP-rPRG2 DeltaC (4, 140)                                  | Mittelwert         | 100      | 58,99889 | 48,64889  | 41,01444  | 36,38667  |
|                                                             | Standardabweichung | 0        | 28,67074 | 29,13676  | 33,58199  | 30,54675  |
|                                                             | N                  | 18       | 18       | 18        | 18        | 18        |
| rPRG3-eGFP (5, 65)                                          | Mittelwert         | 100      | 83,81029 | 57,82182  | 47,83485  | 45,29273  |
|                                                             | Standardabweichung | 0        | 35,01428 | 35,11287  | 36,59832  | 35,84292  |
|                                                             | N                  | 33       | 33       | 33        | 33        | 33        |



**Tabelle 55: Signifikanzniveaus zugehörig zu Abbildung 38.** Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Bonferroni-Korrektur für das multiple Testen (SPSS) verwendet (p-Werte: ns -  $p > 0.05$ , \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \*\*\* -  $p < 0.001$ ).

| 5 $\mu$ M absolute Werte | CFPMem -   |            |                        |            |
|--------------------------|------------|------------|------------------------|------------|
| Dauer LPA<br>Behandlung  | rPRG2-eGFP | eGFP-rPRG2 | eGFP-rPRG2- $\Delta$ C | rPRG3-eGFP |
| 0 min                    | 0,677      | 0,525      | 0,413                  | 0,005**    |
| 5 min                    | 0,161      | 0,490      | 0,045*                 | 0,211      |
| 10 min                   | 0,084      | 0,154      | 0,026*                 | 0,084      |
| 15 min                   | 0,177      | 0,168      | 0,054                  | 0,089      |
| 20 min                   | 0,174      | 0,116      | 0,032                  | 0,076      |
| 5 $\mu$ M relative Werte | CFPMem -   |            |                        |            |
| Dauer LPA<br>Behandlung  | rPRG2-eGFP | eGFP-rPRG2 | eGFP-rPRG2- $\Delta$ C | rPRG3-eGFP |
| 0 min                    | 1,000      | 1,000      | 1,000                  | 1,000      |
| 5 min                    | 0,363      | 0,551      | 0,069                  | 1,000      |
| 10 min                   | 0,065      | 1,000      | 0,306                  | 1,000      |
| 15 min                   | 0,392      | 1,000      | 0,350                  | 1,000      |
| 20 min                   | 0,394      | 1,000      | 0,265                  | 1,000      |

## Erklärungen

Ich erkläre eidesstattlich, dass

... die Dissertation von mir selbstständig und ohne fremde unzulässige Hilfe erbracht wurde. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken als solche kenntlich gemacht. Das Forschungsthema wurde in Grundzügen von meiner Erstbetreuerin, Frau Prof. Dr. Bräuer, festgelegt. Die Verfeinerung der Forschungsfrage, Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente wurde vollständig von mir persönlich erbracht. Alle an Teilschritten beteiligten Personen werden namentlich in dieser Arbeit genannt.

... der Inhalt dieser Dissertation nicht Thema einer weiteren Forschungsarbeit meiner Person war.

... keine klinischen Versuche am Menschen erfolgt sind und keine personenbezogenen Daten verwendet wurden.

... die Regelungen zur guten wissenschaftlichen Praxis an der Carl von Ossietzky Universität befolgt wurden.

... im Zusammenhang mit der Promotion keine Vermittlungs- und Beratungsdienste (Promotionsberatung) in Anspruch genommen wurden.

46.09.2024, Oldenburg

D. Seufje

**Votum informativum der Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Anja Bräuer**

Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften  
 An die/den Vorsitzende/n des Promotionsausschusses Dr. med. und MD-Ph.D.  
 Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

26111 Oldenburg

**Votum informativum**

Gemäß §7(1) der Promotionsordnung wird der Dissertation ein Votum informativum durch den/die Erstbetreuer\*in beigelegt, in dem der Eigenanteil der Doktorandin oder des Doktoranden sowie die Rolle weiterer beitragender Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler an der Dissertation präzisiert werden. Wir bitten hierfür dieses Formular dem digital zur Verfügung zu stellen, mit der Bitte es nach Ausfüllen und Unterschrift direkt zuzusenden. Das Votum Informativum wird den Gutachtern für die Begutachtung zur Verfügung gestellt.

|                                                                 |                                                                                                                                                  |                                                   |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Name der/s Promovierenden:</b>                               | Dora Maria Schwetje                                                                                                                              | <b>Ort und Datum:</b><br>Oldenburg,<br>12.08.2024 |
| <b>Titel des Promotionsvorhabens:</b>                           | Der Einfluss von Plasticity Related Gene 2 auf die Bildung und Stabilisierung von Zellausläufern in Neuro2a                                      |                                                   |
| <b>Erstbetreuer/in:</b>                                         | Prof. Dr. Anja U. Bräuer                                                                                                                         |                                                   |
| <b>Institution</b><br>an der die/der Erstbetreuer/in tätig ist: | Abteilung Anatomie, Fakultät VI Medizin und Gesundheitswissenschaften<br>Carl von Ossietzky Universität Oldenburg<br>Department für Humanmedizin |                                                   |

**Ausführliche Darstellung der Eigenleistung des Doktoranden in der vorliegenden Promotion (ggfs. in separate Anlage erläutern):**

Frau Schwetje hat in ihrer Promotionsarbeit eine umfangreiche experimentelle Laborarbeit durchgeführt. Nach kurzer Einarbeitung durch Mitglieder meines Teams hat sie folgende Methoden selbstständig durchgeführt; immunzytologische Färbungen, quantitative RT-PCR, Herstellung von Plasmid-DNA, Kultivierung, Passage und Transfektionen von Zellen mit verschiedenen Zelllinien, mikroskopische Analysen (Durchlicht-, Fluoreszenz- und konfokale Mikroskopie), Lebendzellanalysen, statistische Auswertungen. Sie hat dabei Protokolle selbst entwickelt und die experimentelle Planung selbstständig durchgeführt. Dafür hat sie ihre Lösungen, Puffer und Medien selbst berechnet und angesetzt. Die Auswertung der Experimente, inklusive der statistischen Analysen wurden von Frau Schwetje eigenständig bearbeitet. Hierfür hat sie verschiedene Auswertungsprogramm selbstständig genutzt. Regelmäßig hat Frau Schwetje, auch selbstkritisch, ihre Resultate im Team diskutiert. Eigene Idee eingebracht und umgesetzt. Frau Schwetje hat sich gleich zu Beginn der Promotionsarbeit, aber auch regelmäßig während der Zeit in die Fachliteratur eingelese. Sie hat dadurch einen sehr guten Überblick in die Forschungsthematik erhalten. Sie hat sich während der Promotionszeit als eine sehr zuverlässige Studierende erwiesen, die das Projekt wesentlich vorangebracht hat. In ihrer Promotionszeit hat sie mit sehr großem Engagement und Eigenverantwortlichkeit gearbeitet und maßgeblich zum erfolgreichen Gelingen des

\* Zutreffendes bitte ankreuzen /Please indicate which one applies

000125

---

## Zustimmungsbescheid gemäß Gentechnikgesetz



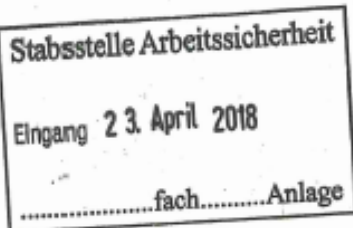
Staatl. Gewerbeaufsichtsamt Hannover  
Am Listholze 74 • 30177 Hannover

Carl von Ossietzky Universität  
Präsidium  
z. Hd. Herrn Hentschke  
Ammerländer Heerstr. 114-118  
26129 Oldenburg



**Staatliches Gewerbeaufsichtsamt  
Hannover**

Behörde für Arbeits-, Umwelt- und  
Verbraucherschutz



Bearbeiten/in  
Frau Dr. Helmbrecht-Kallies

E-Mail

Ihr Zeichen, Ihre Nachricht vom  
13.03.2018

Mein Zeichen (Bei Antwort angeben)  
OL 906000217-15  
Az. 40654/301/018

Telefon  
0511 9096-217

Datum  
13.04.2018

**Ihre Anmeldung gem. § 12 i. V. m. § 8 Abs. 2 Gentechnikgesetz (GenTG)<sup>1</sup> zur Errichtung  
und Betrieb einer gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe 2**

**Projektleiter:** Frau Prof. Dr. Bräuer  
**Stellvertr. Projektleiter:** Frau. Dr. Brandt  
**BBS:** Herr Dr. Scholten

### Zustimmungsbescheid

#### **I. Entscheidung**

Ihrem Antrag vom 13.03.2018, hier eingegangen am 19.03.2018, stimme ich gemäß § 8 Abs. 2 Satz 1 zu.

Die Zustimmung umfasst die Anmeldung des Betriebs der unter I.1. geschriebenen gentechnischen Anlage, in der die unter I. 2. aufgeführten gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt werden sollen.

Die unter IV. bezeichneten Nebenbestimmungen und die unter V. genannten Hinweise sind zu beachten.

#### **Kosten**

Dieser Vorgang ist gemäß § 24 Abs. 1 GenTG gebührenfrei.

<sup>1</sup> Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz - GenTG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBl. I S. 2068) zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 17. Juni 2013 (BGBl. I S. 2421)

**Sprechzeiten**  
Mo-Do: 8.00 - 16.00 Uhr  
Freitag: 8.00 - 14.30 Uhr  
oder nach Vereinbarung

**Telefon** 0511 9096-0  
**Fax** 0511 9096-199  
**E-Mail** poststelle@gaa-h.niedersachsen.de  
**Internet** www.gewerbeaufsicht.niedersachsen.de

**Bankverbindung**  
Norddeutsche Landesbank  
IBAN: DE62 2505 0000 0106 0252 16  
SWIFT-BIC: NOLADE2H

## Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Hannover

### I.1. Gentechnische Anlage

|            |                                                                                                         |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Betreiber: | Carl von Ossietzky Universität Oldenburg<br>Ammerländer Heerstraße 114-118<br>26129 Oldenburg           |
| Institut:  | Fakultät für Medizin und Gesundheitswissenschaften<br>Department für Humanmedizin<br>Abteilung Anatomie |
| Standort:  | Gebäude W34<br>Küpkersweg 76<br>26129 Oldenburg                                                         |
| Räume:     | 0-011, 0-013, 0-012, 0-001, 0-002, 0-003, 0-005 und 603                                                 |

### I.2. Gentechnische Arbeit

Virusproduktion, -konzentrierung und -applikation für funktionelle Untersuchungen der Rolle der Phospholipid-modifizierenden Proteine

Transformation von Plasmiden in *E. coli* zur Vermehrung

Transfektion von HAP1, HAP1-PRG5KO, HEK293, N1E115 Zellen und primäre Hirnzellkulturen zur funktionellen Charakterisierung der PRG1-5 und morphologischen Analyse

### Sicherheitseinstufung

Gemäß § 7 Abs. 3 i.V.m. Anhang I GenTSV<sup>2</sup> sind die gentechnischen Arbeiten den **Sicherheitsstufen 1 und 2** zuzuordnen.

Mit den gentechnischen Arbeiten kann gemäß § 12 Abs. 5 GenTG mit Wirksamwerden dieses Bescheides begonnen werden.

Die unter IV. bezeichneten Nebenbestimmungen und die unter V. genannten Hinweise sind zu beachten.

Die Belange anderer Rechtsgebiete bleiben unberührt, insbesondere Entscheidungen nach anderen öffentlich-rechtlichen Vorschriften.

---

<sup>2</sup> Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung - GenTSV) vom 14. März 1995 (BGBl. I S. 297) zuletzt geändert durch Artikel 4 der Verordnung vom 18. Dezember 2008 (BGBl. I S. 2768)

## Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Hannover

**II. Antragsunterlagen**

Dieser Entscheidung liegen folgende Antragsunterlagen zugrunde:

|                                                     |          |
|-----------------------------------------------------|----------|
| Anschreiben vom 13.03.2018                          | 1 Seite  |
| Inhaltsverzeichnis                                  | 2 Seiten |
| Formblätter:                                        |          |
| ▪ Formblatt A                                       | 3 Seiten |
| ▪ Formblatt AL                                      | 4 Seiten |
| ▪ Formblatt GA                                      | 2 Seiten |
| ▪ Formblatt GE                                      | 3 Seiten |
| ▪ Formblatt GO                                      |          |
| Adenovassoziierter Virus                            | 3 Seiten |
| Lentivirus                                          | 3 Seiten |
| Mauszellen und Gewebe                               | 3 Seiten |
| ▪ Formblatt GS                                      | 2 Seiten |
| ▪ Formblatt GV                                      |          |
| AAV                                                 | 2 Seiten |
| Lentivirus                                          | 2 Seiten |
| p3xFlag-CMV-7.1, pCGH, pCLEG, pEGFP-N1, pFLAG-CMV-1 | 2 Seiten |
| ▪ Formblatt S Prof. Dr. Anja Bräuer                 | 3 Seiten |
| Curriculum Vitae                                    | 6 Seiten |
| Kopie der Diplomurkunde                             | 1 Seite  |
| Kopie der Promotionsurkunde                         | 2 Seite  |
| Teilnahmebescheidung §15-Kurs                       | 1 Seite  |
| Arbeitszeugnis                                      | 1 Seite  |
| ▪ Formblatt S Dr. Nicola Brandt                     | 1 Seite  |
| Curriculum Vitae                                    | 3 Seiten |
| Kopie der Promotionsurkunde                         | 1 Seite  |
| Kopie der Diplomurkunde                             | 1 Seite  |
| Teilnahmebescheidung §15-Kurs                       | 1 Seite  |
| Arbeitszeugnis                                      | 1 Seite  |
| ▪ Formblatt M                                       | 1 Seite  |
| ▪ Betriebsanweisung S2-Gentechniklabor              | 2 Seiten |
| ▪ Lageplan                                          | 1 Seite  |
| ▪ Hygieneplan                                       | 1 Seite  |
| ▪ Anlagen                                           |          |
| ▪ Allgemeine Stellungnahmen der ZKBS                |          |
| Az. 6790-10-41                                      | 7 Seiten |
| Az. 6790-10-73                                      | 2 Seiten |
| ▪ Informationen zu                                  |          |
| Sporentests mit Bioindikatoren                      | 3 Seiten |
| 293 H Zelllinie                                     | 1 Seite  |
| HAP1 Zelllinie                                      | 1 Seite  |
| LPPR5 Zelllinie                                     | 2 Seiten |
| N1E-115 Zelllinie                                   | 2 Seiten |
| Plasmiden                                           | 6 Seiten |
| XL10-Gold                                           | 1 Seite  |
| Sicherheitswerkbank                                 | 1 Seite  |
| ▪ Literatur                                         |          |
| Coiro et al. (2014) JBC 289, 24956-24970            |          |
| Bräuer et al. (2003) Nature Neuroscience 6, 572-578 |          |
| Brindley & Bräuer ((2009) Neural Lipids 12, 290-310 |          |
| Strauss & Bräuer (2013) BBA 1831, 133-138           |          |
| Velmans et al. (2013) Neuroscience 14, 36-55        |          |
| Supplementary Material                              |          |

## Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Hannover

## III. Einstufung der gentechnischen Arbeiten

Aufgrund der Prüfung der aufgeführten Unterlagen stelle ich fest, dass

- die von Ihnen geplanten und unter Ziffer I. 2. aufgeführten gentechnischen Arbeiten gem. § 7 Abs. 3 GenTSV<sup>3</sup> den **Sicherheitsstufen 1 und 2** zuzuordnen sind. Gegen Ihre Sicherheitseinstufung und Risikobewertung der gentechnisch veränderten Organismen habe ich keine Bedenken.

## IV. Nebenbestimmungen

1. Zielzellen, die mit rekombinanten, replikationsdefizienten Lentiviren infiziert worden sind, dürfen erst unter S1-Bedingungen gehandhabt werden, wenn sichergestellt ist, dass die infizierten Zellen nicht mehr mit den zur Infektion benutzten Viren der Risikogruppe 2 kontaminiert sind, in der Regel nach 11 Tagen oder 3 Passagen.
2. Der Autoklaviererfolg ist halbjährlich durch Bioindikatoren (z.B. Sporenpackchen) zu überprüfen. Über die Ergebnisse sind betriebsintern Aufzeichnungen zu führen.
3. Um ein sicheres Auswechseln der Filter der Sicherheitswerkbank zu gewährleisten, ist eine Betriebsanweisung zu erstellen, anhand derer die Mitarbeiter vor der Durchführung unterwiesen werden. Die Unterweisung ist durch Unterschrift zu bestätigen.
4. In Raum 005 ist eine Kittelleiste anzubringen.
5. In Raum 005 können nur S1-Organismen mikroskopisch untersucht werden, da die Untersuchung von S2-Organismen unter den Mikroskopen offenes Arbeiten darstellt. Eine Arbeitsanweisung ist für diesen Raum zu erstellen, aus der hervorgeht, dass nur offenes Arbeiten mit S1-Organismen möglich ist.
6. Poster, Kalender oder Zettel müssen laminiert werden, in Klarsichthüllen gesteckt werden oder aus der Anlage entfernt werden.
7. Von der Decke herabhängende Steckdosenleisten müssen höher gehängt werden.
8. Räume, in den mit Tieren gearbeitet wird, sind für diese fluchtsicher zu gestalten.
9. Auf den Arbeitsplätzen dürfen nur geringe Abfallmengen abgestellt werden. Laborabfall, der zu Verletzungen führen kann, z.B. scharfkantiger Abfall, ist in durchstichsicheren Abfallbehältern zu sammeln und zu entsorgen.
10. Bei Verwendung von Alkohol als Desinfektionsmittel unter einer Sicherheitswerkbank sind folgende Punkte zu beachten und in die Betriebsanweisung oder den Hygieneplan aufzunehmen:
  - Pro m<sup>2</sup> dürfen aus Gründen des Explosionsschutzes nicht mehr als 50 ml 70%iger Alkohol verwendet werden.
  - Während der Verwendung von 70%igem Alkohol dürfen keine Zündquellen (z. B. offene Brennerflamme) in der Nähe sein. Heiße Flächen müssen vor der Desinfektion abgekühlt sein.
  - Während der Desinfektion mit 70%igem Alkohol muss die Sicherheitswerkbank eingeschaltet sein

3) Verordnung über die Sicherheitsstufen und Sicherheitsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten in gentechnischen Anlagen (Gentechnik-Sicherheitsverordnung - GenTSV) vom 14. März 1995 (BGBl. I S. 297) zuletzt geändert durch Artikel 57 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474)



## Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Hannover

11. Es ist dafür Sorge zu tragen, dass das Reinigungspersonal regelmäßig über die besonderen Gefahren beim Reinigen der gentechnischen Anlagen belehrt wird.
12. Die Schutzkleidung ist in regelmäßigen Zeitabständen und bei Bedarf durch Autoklavieren oder durch chemische Wäschedesinfektion gemäß RKI- oder VAH-Liste zu dekontaminieren.

### V. Hinweise

1. Die Durchführung der gentechnischen Arbeiten sowie der Betrieb der gentechnischen Anlage hat entsprechend den eingereichten Unterlagen zu erfolgen, soweit nachfolgend nichts anderes bestimmt wird.
2. Die Zugänge zu der gentechnischen Anlage sind als gentechnischer Arbeitsbereich der Sicherheitsstufe 2 und mit dem Warnzeichen „Warnung vor Biogefährdung“ nach ASR A1.3 zu kennzeichnen.
3. Der Zutritt zur gentechnischen Anlage ist auf hierzu ermächtigte Personen zu beschränken. An den Zugängen der gentechnischen Anlage ist durch Aushang darauf hinzuweisen.
4. Bei Arbeiten, bei denen Aerosole entstehen können, muss sichergestellt werden, dass diese nicht in den Arbeitsbereich gelangen. Dazu sind insbesondere folgende Maßnahmen geeignet:
  - a) Durchführung der Arbeit in einer Sicherheitswerkbank oder unter einem Abzug, bei denen ein Luftstrom vom Experimentator zur Arbeitsöffnung hin gerichtet ist, oder
  - b) Benutzung von Geräten, bei denen keine Aerosole freigesetzt werden,
  - c) das Tragen geeigneter Schutzausrüstung, wenn technische und organisatorische Maßnahmen nicht ausreichen oder nicht anwendbar sind.
 Die Abluft aus den unter Buchstabe a) genannten Geräten muss durch einen Hochleistungsschwebstoff-Filter geführt oder durch ein anderes geprüftes Verfahren keimfrei gemacht werden. Die Funktionsfähigkeit der Geräte ist durch regelmäßige Wartung sicherzustellen.
5. Der Autoklav ist nach den Bestimmungen der Betriebssicherheitsverordnung<sup>4</sup> zu betreiben. Insbesondere auf die wiederkehrenden Prüfungen weise ich hin. Prüfprotokolle sind so aufzubewahren, dass sie dem Gewerbeaufsichtsamt auf Verlangen vorgezeigt werden können.
6. Gentechnisch veränderte Organismen und Abfall, der gentechnisch veränderte Organismen enthält, dürfen nur in bruch sicheren, dicht verschlossenen, entsprechend gekennzeichneten und von außen desinfizierbaren Behältern innerbetrieblich transportiert werden.
7. Kontaminierte Prozessabluft, die in den Arbeitsbereich gegeben wird, muss durch geeignete Verfahren wie Filterung oder thermische Nachbehandlung gereinigt werden. Dies gilt auch für die Abluft von Autoklaven, Pumpen oder Bioreaktoren.
8. Entscheidungen anderer Behörden, die für das gentechnische Vorhaben aufgrund anderer öffentlich-rechtlicher Vorschriften erforderlich sind, bleiben von diesem Zustimmungsbescheid unberührt.  
Sollten weitere behördliche Entscheidungen für die Errichtung und den Betrieb der Anlage erforderlich sein, sind diese vom Betreiber selbst zu beantragen.
9. Gentechnische Arbeiten müssen gemäß § 6 Abs. 3 GenTG aufgezeichnet werden. Dabei sind die Bestimmungen der Gentechnik-Aufzeichnungsverordnung (GenTAufzV)<sup>5</sup> zu beachten. Es sollte ein Aufzeichnungssystem gewählt werden, das ein unbemerktes Entwenden von Seiten nicht erlaubt.

<sup>4</sup> **Betriebssicherheitsverordnung** vom 3. Februar 2015 (BGBl. I S. 49), zuletzt geändert durch Artikel 5 Absatz 7 der Verordnung vom 18. Oktober 2017 (BGBl. I S. 3584)

<sup>5</sup> **Verordnung über Aufzeichnungen bei gentechnischen Arbeiten und bei Freisetzungen (Gentechnik-Aufzeichnungsverordnung - GenTAufzV)** vom 04. November 1996 (BGBl. I S. 1647) geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 28. April 2008 (BGBl. I S. 766)

## Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Hannover

10. Auf die Mitteilungspflicht gemäß § 21 GenTG weise ich hin. Außer besonderen Vorkommnissen, die nicht dem erwarteten Verlauf der gentechnischen Arbeit entsprechen, sind insbesondere Änderungen von sicherheitsrelevanten Einrichtungsgegenständen sowie ein Wechsel des Projektleiters oder des BBS dem Staatlichen Gewerbeaufsichtsamt Hannover mitzuteilen.
11. Auf die Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung gentechnischer Arbeiten mit primären Zellen aus Vertebraten Az. 6790-10-03 wird hingewiesen.

### VI. Begründung

1. Aufgrund des Antrages vom 13.03.2018 habe ich das Anmeldeverfahren nach §12 GenTG zur Einrichtung und des Betriebs einer gentechnischen Anlage der **Sicherheitsstufe 2** durchgeführt.
2. Die Anlage erfüllt die technischen Anforderungen der Stufe 2 gemäß § 9 i.V.m. Anhang III. Stufe 2 GenTSV. Eine Begehung der Anlage fand am 28.02.2018 statt.
3. Die BBS Dr. Scholten besitzt die erforderliche Sachkunde gemäß § 15 Abs. 3 bzw. § 17 GenTSV. Die Sachkunde von Frau Prof. Dr. Anja Bräuer und Frau Dr. Nicola Brandt wurde durch die eingereichten Unterlagen hinreichend nachgewiesen.
4. Im Anmeldeverfahren wurde keine Stellungnahme der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) eingeholt, da die geplanten Arbeiten mit bereits sicherheitsbewerten Arbeiten (BVL-Aktenzeichen 6790-10-41, 6790-10-73) vergleichbar sind.  
Danach handelt es sich bei der geplanten Arbeit um gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufen 1 und 2.
5. Nach Aufnahme der Nebenbestimmungen in den Bescheid, liegen die Voraussetzungen gem. § 12 Abs. 2 GenTG vor. Die Zustimmung ist zu erteilen.
6. Die Kostenentscheidung beruht auf § 24 GenTG und §§ 1, 2 Abs. 1 Nr. 2 Niedersächsisches Verwaltungskostengesetz<sup>6</sup>

### IX. Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung Widerspruch beim Staatlichen Gewerbeaufsichtsamt Hannover, Am Listholze 74, 30177 Hannover erhoben werden.

Im Auftrage

Dr. Helmbrecht-Kallies

<sup>6</sup> Niedersächsisches Verwaltungskostengesetz (NVwKostG) vom 25. April 2007 (Nds. GVBl. S. 172) zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 31. Oktober 2013 (Nds. GVBl. S. 254)

## Anzeige der Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen und Geweben

Es wurde bei der qRT-PCR murine cDNA aus der laboreigenen cDNA-Datenbank als Positivkontrolle verwendet, welche in Vorzeiten in der Forschungsgruppe der Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Bräuer an der Charité Berlin generiert wurde.

Hier die entsprechende Anzeige:

### Landesamt für Gesundheit und Soziales



Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin  
Postfach 310029, 10639 Berlin (Postanschrift)



Frau  
Prof. Dr. Anja Bräuer  
Institut für Zell- und Neurobiologie, Anatomie  
Charité - Universitätsmedizin Berlin, CCO  
Campus Mitte  
10117 Berlin

Geschäftszeichen (bitte immer angeben)  
I C 1 Fu - T 0108/11 -

Dienstgebäude:  
Turmstraße 21, Haus A  
10559 Berlin

Bearbeiterin:  
Claudia Fuhrmann  
Zimmer: 620

Telefon: +49 30 90229 2408

Telefax: +49 30 90229 2096

E-Mailadresse:  
Claudia.Fuhrmann@lageso.berlin.de  
(nicht für Dokumente mit elektronischer Signatur)

Datum: 08.04.2014

nachrichtlich: TierSchB

Dr. Thöne-Reineke

### Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen oder Geweben -T 0108/11-

Ihr Schreiben vom 04.04.2014

BERLIN WÄHLT EUROPA



25.05.2014

[www.berlin.de/europawahl](http://www.berlin.de/europawahl)

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. Bräuer,

aufgrund Ihres o. g. Schreibens nehme ich zur Kenntnis, dass Ihr Vorhaben mit der Bezeichnung:  
"Anlegen von primären Zellkulturen" (Kurzbezeichnung: Tötungsanzeige) unter Verwendung  
von unverändert 2000 Mäusen und 500 Ratten weitergeführt wird und erhebe keine Einwände.

Als Abschlusstermin bzw. für eine Prüfung der Aktualität Ihrer Anzeige habe ich den

30.04.2019

vorgemerkt.

Die in meinem Bestätigungsschreiben vom 13.04.2011 genannten Vorschriften bleiben hiervon unberührt.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Fuhrmann

#### Verkehrsverbindungen:

Eingang Turmstr. 21  
U 9 Turmstraße

Bus M 27, 245, TXL  
Haltestelle U-Turmstraße

Bus 101, 123, 187  
Haltestelle Turmstr./  
Lübecker Str.

Eingang Birkenstr. 62  
U 9 Birkenstraße  
Kein Fahrstuhl vorhanden

Bus M 27, Haltestelle  
Havelberger Str.

Bus 123, Haltestelle  
Birkenstr. / Rathenower Str.

Sprechzeiten  
nach telefonischer  
Vereinbarung

Zahlungen bitte  
bargeldlos an die  
Landeshauptkasse  
Klosterstr. 59  
10179 Berlin

Geldinstitut  
Postbank  
Berlin

Landesbank  
Berlin

Deutsche  
Bundesbank  
Filiale Berlin

IBAN  
DE47 1001 0010  
0000 0581 00

DE25 1005 0000  
0990 0076 00

DE53 1000 0000  
0010 0015 20

BIC  
PBNKDEFF100

BELADEBEXXX

MARKDEF1100

Internetadresse: <http://www.lageso.berlin.de>