

Die Rolle von transformierenden
Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β) in der
Entwicklung von Synapsen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Katharina Heupel
aus Frankfurt am Main

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. Friedrich-Wilhelm Schürmann

Korreferent: Prof. Dr. Michael Hörner

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Mai 2007

Diese Dissertation entstand in der Zeit von Oktober 2003 bis März 2007 in der Abteilung Neuroanatomie des Zentrums für Anatomie der Georg-August-Universität Göttingen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Krieglstein.

Meinen Großeltern

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>I</u>
<u>Zusammenfassung</u>	<u>III</u>
<u>Abstract</u>	<u>V</u>
<u>Danksagung</u>	<u>VII</u>
<u>1</u>	<u>Einleitung</u>
1.1	Die transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β) 1
1.1.1	Die TGF- β Isoformen 1
1.1.2	Die TGF- β -Signalkaskaden 2
1.1.3	Maus-Mutanten mit TGF- β -Deletionen 4
1.1.4	Lokalisation von TGF- β s im neuromuskulären System 5
1.1.5	Lokalisation von TGF- β s im zentralen Nervensystem 6
1.1.6	Funktionen von TGF- β s im Nervensystem 6
1.2	Synaptogenese: Entwicklung synaptischer Verbindungen 8
1.2.1	Synaptogenese im peripheren Nervensystem: Die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte 9
1.2.2	Synaptogenese im zentralen Nervensystem 12
1.3	TGF- β s und Synaptogenese 14
1.4	Zielsetzung der Arbeit 19
<u>2</u>	<u>Material</u>
2.1	Tiere 20
2.2	Zelllinien 20
2.3	Zellkulturmedien und Zusätze 20
2.4	Puffer und Lösungen 20
2.4.1	Puffer und Lösungen für Zellkulturarbeiten 20
2.4.2	Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten 20
2.4.3	Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten 21
2.4.4	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten 22
2.5	Zytokine und andere Faktoren 23
2.6	Inhibitoren 23
2.7	Biochemikalien 23
2.8	Chemikalien 23
2.9	Enzyme 24
2.10	Antikörper 24
2.11	Kits 25
2.12	Standards 25
2.13	Software 25
2.14	Primer 26

2.15	Verbrauchsmaterialien	26
2.16	Geräte	27
3	Methoden	28
3.1	Tierhaltung, Zuchtschema und Genotypisierung	28
3.2	Zellbiologische Methoden	28
3.2.1	Kultivierung der Zelllinie C2C12	28
3.2.2	Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neurone	29
3.3	Histologische und zytochemische Methoden	30
3.3.1	Fixierung und immunzytochemische Darstellung primärer Zellen	30
3.3.2	Fixierung und immunzytochemische Darstellung von C2C12-Zellen	31
3.3.3	<i>whole-mount</i> -Präparation und immunhistochemische Darstellung des Zwerchfells	31
3.3.4	Histologische und immunhistochemische Darstellung des Gehirns	33
3.3.5	Fluoreszenzmikroskopie	33
3.3.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	34
3.4	Proteinbiochemische Methoden	35
3.4.1	Zellaufschluss	35
3.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	35
3.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.4.4	Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Western Blotting)	36
3.5	Molekularbiologische Methoden	37
3.5.1	Isolierung von genomischer DNA	37
3.5.2	Isolierung, Konzentrationsbestimmung und reverse Transkription von <i>messengerRNA</i>	37
3.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA	38
3.5.4	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.6	Funktionelle Untersuchungen	39
3.6.1	Aufzeichnung der Atemtätigkeit	39
3.6.2	Elektrophysiologische Ableitungen in akuten Hirnschnitten des Hirnstamms (in Kollaboration mit V. Sargsyan)	39
3.7	Statistische Auswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Ergebnisse der Genotypisierung der analysierten <i>Tgf-β2^{+/-}</i> -, <i>Tgf-β2^{+/-}</i> - und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Tiere	41
4.2	Phänotyp und Respirationsverhalten der <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Embryonen	41
4.3	Struktur und Organisation des Zwerchfell-Muskels von TGF-β2-defizienten Embryonen	45
4.4	Einfluss von TGF-β auf die Entwicklung peripherer Synapsen: Untersuchung der Komponenten der neuromuskulären Endplatte	48

4.4.1	Die Innervation des Zwerchfells und die Faszikulation des N. phrenicus werden nicht durch den Verlust von TGF- β 2 beeinträchtigt	49
4.4.2	Die Deletion von TGF- β 2 führt zu keiner Veränderung des Verzweigungsmusters des N. phrenicus	51
4.4.3	In TGF- β 2 ^{-/-} -Embryonen sind die Aggregation und das Clustern von AChR nicht verändert, jedoch ist die Zahl der AChR-Cluster vermindert	53
4.4.4	Die Breite des postsynaptischen zentralen Endplatten-Bandes ist nach der Deletion von TGF- β 2 nicht verändert	56
4.4.5	Die Innervation einzelner Endplatten ist nach der Deletion von TGF- β 2 nicht verändert	58
4.4.6	Schwannzellen des N. phrenicus differenzieren in Abwesenheit von TGF- β 2	59
4.4.7	Inhibition des TGF- β -Signalweges vermindert Agrin-induziertes AChR-Clustern <i>in vitro</i>	61
4.5	Einfluss von TGF- β auf die Entwicklung zentraler Synapsen	65
4.5.1	Der Prä-Bötzing-Komplex des zentralen respiratorischen Systems in Tgf- β 2 ^{-/-} -Embryonen weist eine verminderte spontane Aktivität und synaptische Transmission auf (in Kollaboration mit V. Sargsyan)	65
4.5.2	Die Struktur und Zytoarchitektur der ventralen Medulla sind in TGF- β 2-defizienten Embryonen nicht verändert	69
4.5.3	Die Anzahl von Synaptophysin-positiven Synapsen ist in TGF- β 2-defizienten Tieren erhöht	70
4.5.4	Einfluss von TGF- β 1 und anti-TGF- β (1,2,3) auf die Anzahl und Größe von Synapsen <i>in vitro</i>	74
4.6	Modulation der Funktion von Synapsen durch Phosphorylierung von Synapsin	78
5	Diskussion	80
5.1	TGF- β 2 und die morphologische Entwicklung von Synapsen	80
5.2	Kooperation von TGF- β 2 mit anderen Faktoren	84
5.3	TGF- β 2 und synaptische Funktion	87
5.4	Der Tgf- β 2 ^{-/-} -Phänotyp	92
5.5	TGF- β 2 und Muskelentwicklung	94
5.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	95
6	Literatur	97
7	Anhang	111
7.1	Abbildungsverzeichnis	111
7.2	Tabellenverzeichnis	112
7.3	Veröffentlichungen	113
7.4	Lebenslauf	114

Abkürzungsverzeichnis

(Englische Begriffe sind in kursiver Schrift gehalten)

ACh, AChR	Azetylcholin, Azetylcholin-Rezeptor
ActR	Activin-Rezeptor
ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>
α -BTX	α -Bungarotoxin
AraC	Cytosin-Arabinosid
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin
ChAT	Cholin-Azetyltransferase
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DIV	<i>day in vitro</i> , Tag <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Embryonaltag
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
et al.	et alia, und Mitarbeiter
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
HE	Hämatoxilin/Eosin
HRP	<i>horse reddish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
LAP	<i>latency associated protein</i>
LTBP	<i>latent TGF-β binding protein</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mEPSC	<i>miniature excitatory postsynaptic currents</i> , exzitatorische postsynaptische Miniatur-Ströme
mIPSC	<i>miniature inhibitory postsynaptic currents</i> , inhibitorische postsynaptische Miniatur-Ströme
N.	Nervus
NB-Medium	Neurobasal-Medium
NF	Neurofilament
NGS	<i>normal goat serum</i> , normales Ziegenserum
Nkl.	Nukleus
n.s.	nicht signifikant
NT-3/4	Neurotrophin 3/4
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PNS	peripheres Nervensystem

PreBötC	Prä-Bötzinger Komplex
sPSC	<i>spontaneous postsynaptic currents</i> , spontane postsynaptische Ströme
PSD	<i>postsynaptic density</i> , postsynaptische Dichte
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodezylsulfat
sEPSC	<i>spontaneous excitatory postsynaptic currents</i> , spontane exzitatorische postsynaptische Ströme
sIPSC	<i>spontaneous inhibitory postsynaptic currents</i> , spontane inhibitorische postsynaptische Ströme
SLC	<i>small latent complex</i>
Smad	zusammengesetzt aus Sma und Mad, homologen Genen für <i>Sma</i> (<i>C. elegans</i>) bzw. <i>mothers against decapentaplegic</i> (<i>Drosophila</i>)
TβRI/TβRII	TGF-β-Rezeptor Typ I/ TGF-β-Rezeptor Typ II
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor β
UV	ultraviolett
vGat	vesikulärer GABA-Transporter
vGlut	vesikulärer Glutamattransporter
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
WNT	zusammengesetzt aus Wg und Int-1, homologen Genen für <i>Wingless</i> (<i>Drosophila</i>) bzw. <i>integration-site1</i> (Maus)
w/v	Verhältnis Masse/Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Neben zahlreichen anderen Faktoren spielen sezernierte, reziprok wirkende Moleküle für die Ausbildung funktioneller synaptischer Verbindungen eine Rolle. Die transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β) stellen eine Superfamilie von Proteinen dar, die in der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems unterschiedlichste Funktionen erfüllen. Ihre Rolle in der Synaptogenese in Säugetieren ist jedoch bislang nur teilweise untersucht und insbesondere zur Funktion der Isoformen TGF- β 1, - β 2 und - β 3 liegen keine Befunde vor. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die biologische Bedeutung von TGF- β 2 in der Entstehung und Funktion von Synapsen zu untersuchen. Als Modell dienten dabei embryonale TGF- β 2-defiziente Mäuse, in denen Synapsen des peripheren und zentralen Nervensystems untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Innervation des Zwerchfells, die Faszikulation des Nervus phrenicus und die Morphologie der neuromuskulären Endplatte durch die Deletion von TGF- β 2 nicht beeinträchtigt wurden. Es wurde jedoch eine signifikant reduzierte Anzahl von neuromuskulären Endplatten festgestellt und *in vitro*-Experimente mit C2C12-Zellen gaben einen Hinweis darauf, dass diese Reduzierung durch einen Verlust an Agrin-stabilisierten Azetylcholin-Rezeptor-Clustern verursacht sein könnte. Dies führte zu der Hypothese, dass TGF- β 2 an der neuromuskulären Endplatte als Ko-Faktor für Agrin die Nerv-Muskel-Interaktion modulieren könnte. Die TGF- β 2-defizienten Embryonen wiesen eine ausgeprägte Disorganisation des Zwerchfelmuskels und eine gestörte Differenzierung der Muskelzellen auf. Dies bestätigte die Annahme, dass TGF- β 2 an der Differenzierung von Myoblasten beteiligt ist.

In einer elektrophysiologischen Untersuchung des Prä-Bötzinger-Komplexes, der Teil des respiratorischen Systems der ventralen Medulla ist, wurde in TGF- β 2-defizienten Embryonen eine signifikant erniedrigte Netzwerk-Aktivität festgestellt. Diese konnte auf eine verminderte glutamaterge und GABAerge/glyzinerge Transmission zurückgeführt werden. Gleichzeitig ist durch diese Beobachtung der Verlust der Atemtätigkeit der TGF- β 2-defizienten Tiere zu erklären, die in dieser Arbeit ebenfalls belegt wurde und die wahrscheinlich zur kongenitalen Zyanose der Tiere führt. Der verminderten synaptischen Transmission lag keine verminderte Anzahl von Synapsen und damit wahrscheinlich kein Defekt in der Synaptogenese zugrunde. Es wurde deshalb geprüft, ob die verminderte Transmission durch eine beeinträchtigte synaptische Funktion wie zum Beispiel eine veränderte Mobilität der Neurotransmitter-Vesikel verursacht werden könnte. In hippokampalen Neuronen wurde daher der Einfluss von TGF- β auf die Phosphorylierung von Synapsin untersucht, da diese zu einer Umverteilung der Vesikel in den synaptischen Terminalien beiträgt. Es konnte eine erhöhte Phosphorylierung verschiedener Synapsin-Isoformen nach akuter Behandlung mit TGF- β und eine Hypophosphorylierung nach Blockierung des TGF- β -Rezeptor Typ I demonstriert werden.

Dies gibt einen Hinweis darauf, dass auch TGF- β 2 *in vivo* über die Phosphorylierung von Synapsin die Beweglichkeit der Vesikel und damit die effiziente synaptische Transmission modulieren könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beleuchten Aspekte der biologischen Bedeutung von TGF- β 2 an peripheren und zentralen Synapsen in Säugetieren und weisen darauf hin, dass TGF- β 2 ähnlich wie *glass bottom boat* in *Drosophila* und TGF- β 1 in *Aplysia* die Interaktion von Prä- und Postsynapse und die Funktion von Synapsen modulieren kann.

Abstract

Amongst many other factors, secreted and reciprocally acting molecules play a role for the development of functional synaptic contacts. The transforming growth factors-beta (TGF- β) constitute a super-family of proteins that fulfil various functions during development and differentiation of the nervous system. However, their role during synaptogenesis in mammals is only partially explored as yet and particularly the functions of the isoforms TGF- β 1, - β 2 and - β 3 have not been analysed so far.

The aim of the present work was to determine the biological significance of TGF- β 2 in the development and function of synapses. Therefore, embryonic TGF- β 2-deficient mice were chosen as a model to analyse synapses of the peripheral and central nervous system. The results showed that the innervation of the diaphragm, the fasciculation of the phrenic nerve, and the morphology of the neuromuscular junction were not affected by the genetic deletion of TGF- β 2. On the other hand there was a significant reduction of the number of neuromuscular junctions. In addition, *in vitro*-experiments with C2C12-cells suggested that this reduction could be due to a loss of agrin-stabilised acetylcholine-receptor-clusters. This led to the hypothesis that, at the neuromuscular junction, TGF- β 2 acts as a co-factor for agrin and modulates the nerve-muscle interaction. TGF- β 2-deficient embryos displayed a pronounced disorganisation of the diaphragm-muscle and a disturbed differentiation of the muscle cells. This confirmed the assumption that TGF- β 2 is involved in the differentiation of myoblasts.

Electrophysiological analyses of the pre-Bötzinger-complex, which is part of the respiratory system of the ventral medulla, revealed a significantly reduced network-activity. This was assigned to a diminished glutamatergic and GABAergic/glycinergic transmission. At the same time, this observation explains the loss of any respiratory activity of the TGF- β 2-deficient animals, which has also been documented in the present work and which probably leads to the congenital cyanosis of the animals.

The reduced synaptic transmission was not due to fewer synapses and hence to a defect in synaptogenesis. Thus, it was tested whether it could be caused by an impaired synaptic function such as an altered motility of neurotransmitter vesicles. Therefore, the influence of TGF- β on the phosphorylation of synapsin was assayed as the phosphorylation state crucially affects the redistribution of the vesicles in the synaptic terminal. An increase in the phosphorylation of different synapsin-isoforms was detected after acute treatment with TGF- β and a hypophosphorylation was observed after inhibition of the TGF- β -receptor type I.

This points to the possibility that also *in vivo* TGF- β 2 could modulate the motility of vesicles through the phosphorylation of synapsin and could modulate efficient synaptic transmission by this mechanism.

The findings of the present work reveal new aspects of the biological relevance of TGF- β 2 at peripheral and central synapses in mammals. They suggest that mammalian TGF- β 2 can influence the interaction of pre- and postsynapse and can modulate the function of synapses similar to *glass bottom boat* in drosophila and TGF- β 1 in Aplysia.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kerstin Krieglstein, die mir dieses spannende Thema zur Bearbeitung übertragen hat. Ich danke ihr für ihre kompetente, interessierte, offene und freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Des Weiteren danke ich ihr für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller nötigen Arbeitsmaterialien.

Herrn Prof. Dr. Schürmann und Herrn Prof. Dr. Hörner danke ich für die Übernahme des Erst- bzw. Zweit-Gutachtens meiner Dissertation sowie für ihre kritischen und hilfreichen Anregungen im Verlauf der Arbeit und während der Entstehung des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. Wimmer, Herrn Prof. Dr. Ficner und Herrn Prof. Dr. Treue danke ich für ihre Bereitschaft die Prüfungskommission zu bilden.

Bei Vardanush Sargsyan, Weiqi Zhang und Frédérique Varoqueaux möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und für die zahlreichen spannenden Diskussionen und Anregungen bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dazu gehören Eleni Roussa, die auch bei der Korrektur des Manuskriptes eine große Hilfe war, Michael Rickmann, Ivo Chao und Helmut Gerlach. Außerdem danke ich Gabi Curdt-Hollmann, Herma Böttcher und Steffi Heidrich für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Allen anderen derzeitigen und ehemaligen Kollegen in Göttingen und London danke ich für die schöne Zeit im Labor, für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und für alles, was ich von ihnen lernen durfte.

Den Tierpflegern der zentralen tierexperimentellen Einrichtung danke ich für die angenehme und problemlose Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Paulus und Christine Crozier danke ich für die Organisation und Koordination des Europäischen Graduiertenkollegs "Neuroplasticity: From Molecules to Systems".

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung meines Projektes im Rahmen eines Doktoranden-Stipendiums.

Johannes und meiner Familie gilt mein unendlicher Dank für ihr immerwährendes Verständnis und ihre bedingungslose Unterstützung.

1 Einleitung

1.1 Die transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β)

Die transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (*transforming growth factors- β* , TGF- β) gehören zu einer großen, nach ihnen benannten Superfamilie von Proteinen (TGF- β -Superfamilie), zu der auch die GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*)-, die BMP (*bone morphogenetic protein*)- und die Activin-Familie zählen (Böttner et al., 2000). TGF- β s werden aufgrund ihrer Bedeutung bei immunologischen Vorgängen zur Klasse der Zytokine (Prehn et al., 1993) und durch ihre Rolle bei der Proliferationskontrolle auch zu den Wachstumsfaktoren gezählt (Massagué, 1990). Zusammen mit den Mitgliedern anderer Proteinfamilien gehören sie zur Gruppe der neurotrophen Faktoren (Hefti, 1997). TGF- β s besitzen pleiotrope Funktionen, was bedeutet, dass sie abhängig von Zelltyp, Zeitpunkt, Konzentration oder Umgebung unterschiedliche Wirkungen besitzen können (Nathan und Sporn, 1991).

1.1.1 Die TGF- β Isoformen

Zur Untergruppe der TGF- β s zählen fünf bekannte Isoformen von TGF- β (TGF- β 1 bis TGF- β 5), von denen drei, TGF- β 1, - β 2 und - β 3, in Säugern vorkommen (Assoian et al., 1983; Derynck et al., 1988; Holley et al., 1980; ten Dijke et al., 1988; Wrann et al., 1987). TGF- β 4 wurde in *Gallus gallus* beschrieben und ist wahrscheinlich ortholog zu TGF- β 1 (Jakowlew et al., 1988). TGF- β 5 wurde in *Xenopus laevis* beschrieben (Kondaiah et al., 1990). Die TGF- β -Isoformen weisen eine hohe Homologie auf, wobei die Sequenz einer bestimmten Isoform (TGF- β 1, - β 2 und - β 3) in verschiedenen Spezies zu über 97 % konserviert ist (Massagué, 1990).

TGF- β s werden von zahlreichen Zellpopulationen gebildet, so zum Beispiel von Zellen mesenchymalen Ursprungs, so auch von Knochen- und Bindegewebszellen, von Muskelzellen, von Endothelzellen, Thrombozyten und Zellen des Immunsystems (Roberts und Sporn, 1990). Sie haben während der Embryogenese und im adulten Organismus zahlreiche Funktionen. Dazu gehören Zellzyklus-Kontrolle, Differenzierung, Apoptose, Hämatopoese, Angiogenese, Chemotaxis und eine Funktion als Immunmolekül (Böttner et al., 2000). TGF- β 1 ist zudem ein wichtiger Regulator der Bildung von extrazellulärer Matrix (Roberts und Sporn, 1990). So stimuliert TGF- β 1 einerseits die Synthese von Matrixproteinen wie Collagen (Typ I, III, IV und V), Fibronectin, Thrombospondin und Tenascin, andererseits vermindert TGF- β die Degradation von Matrix-Proteinen, indem es die Sezernierung von Proteasen inhibiert und die Sezernierung von Protease-Inhibitoren erhöht (Roberts und Sporn, 1990).

Alle TGF- β -Isoformen werden von Zellen in latenter Form sekretiert. Der so genannte *large latent complex* besteht aus dem *small latent complex* (SLC) und dem *latent TGF- β binding*

protein (LTBP) (Koli et al., 2001). Der SLC ist über Disulfidbrücken an das LTBP gebunden, das zu effektiver Sekretion und zur Speicherung in der extrazellulären Matrix beiträgt. Der SLC ist ein dimeres Prä-Propeptid, wobei jede Prä-Propeptid-Kette ein Signalpeptid (N-terminal), eine Pro-Domäne (auch: *latency associated protein*, LAP) und eine bioaktive Domäne (C-terminal) besitzt. Das Signalpeptid leitet das Vorläufer-Protein durch das endoplasmatische Retikulum in den sekretorischen Exozytoseweg, die Pro-Domäne ist an der richtigen Faltung, der Dimerisierung der Untereinheiten und der Regulation der Aktivität des Faktors beteiligt. Die bioaktive C-terminale Domäne stellt das eigentliche, biologisch aktive TGF- β -Molekül dar und weist wie andere Wachstumsfaktoren und auch Neurotrophine einen Cystein-Knoten als Strukturmotiv auf (Böttner et al., 2000; Massagué, 1990).

Latentes TGF- β kann jedoch nicht an Rezeptoren binden, sondern es muss zunächst eine Spaltung von TGF- β und der Pro-Domäne erfolgen. Diese Aktivierung kann *in vitro* zum Beispiel durch Hitze und niedrigen pH-Wert (Brown et al., 1990), chaotrope Agenzien und reaktive Oxygen-Spezies erzeugt werden, die die TGF- β /LAP-Interaktion angreifen. Zu weiteren Aktivatoren von TGF- β gehören Trombospondin-1, Integrin $\alpha_v\beta_6$, Proteasen wie Plasmin, Matrix-Metalloproteinasen MMP-3, -9 und MT1-MMP, sowie Cathepsin B. Obwohl die Mechanismen der Aktivierung weitestgehend verstanden sind, sind die physiologischen Umstände, die dazu führen, nahezu unbekannt (Solovyan und Keski-Oja, 2005).

Im Gegensatz zu anderen Neurotrophinen ist die genaue zelluläre Prozessierung von TGF- β in Neuronen nicht sehr gut untersucht. In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass TGF- β 2 und - β 3 von kultivierten hippokampalen Neuronen sowohl über den konstitutiven als auch über den regulierten Exozytoseweg ausgeschüttet werden. Beide Isoformen werden nach Aktivierung der Neurone (zum Beispiel durch 55 mM KCl oder durch Glutamat-Agonisten) vermehrt reguliert sezerniert und besitzen eine vergleichbare biologische Aktivität (Anke Lacmann, persönliche Mitteilung). Es ist dabei jedoch bislang nicht geklärt, ob TGF- β 2 und - β 3 von einem bestimmten Zell-Kompartiment wie beispielsweise an der Synapse bevorzugt ausgeschüttet werden.

1.1.2 Die TGF- β -Signalkaskaden

Der funktionale Komplex von TGF- β -Rezeptoren auf der Zelloberfläche besteht aus dimeren, transmembranen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren vom Typ I und II. Bei Säugetieren gibt es sieben Typ I- (ALK1-7, *activin receptor-like kinases* 1-7) und fünf Typ II-Rezeptoren (BMPRII, Activin-Receptor (ActR) II, ActRIIB, TGF- β -Rezeptor (T β R) II und AMHR (*anti-Müllerian hormone receptor*)). Die verschiedenen Liganden der TGF- β -Superfamilie binden unterschiedlich an die verschiedenen Rezeptor-Dimere. So binden beispielsweise TGF- β 1 und - β 3 an den entsprechenden Typ II-Rezeptor (T β RII), ohne dass dazu ein Typ I-Rezeptor benötigt wird; TGF- β 2 dagegen interagiert nur an Typ II/Typ I- Rezeptor-Kombinationen

(Derynck und Zhang, 2003). Neben den Typ I und II-Rezeptoren gibt es noch TGF- β -Rezeptoren Typ III (T β RIII), Betaglycan und Endoglin, die wahrscheinlich den Zugang des Liganden zu den anderen Rezeptor-Typen modulieren (Cheifetz et al., 1992; Lopez-Casillas et al., 1993).

Die intrazelluläre Signalkaskade wird erst durch Phosphorylierung des Typ I-Rezeptors durch den Typ II-Rezeptor ausgelöst und kann über verschiedene Wege ausgeführt werden. So unterscheidet man Smad-abhängige und Smad-unabhängige Wege (Derynck und Zhang, 2003), die in Abb. 1 schematisch dargestellt werden.

Smad-Proteine sind Effektor-Moleküle, die durch die Phosphorylierung des T β RI aktiviert werden. Bei Säugetieren gibt es acht verschiedene Smads (Smad ist zusammengesetzt aus Sma und Mad, *mothers against decapentaplegic*, den homologen Proteinen aus *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*) (Derynck und Zhang, 2003). Sie werden unterteilt in Rezeptor-Smads (R-Smads), *common*-Smads (co-Smads) und *inhibitory*-Smads (siehe auch Tab. 1). R-Smads (Smads1, 2, 3, 5, 8) interagieren direkt mit den TGF- β -Rezeptoren und werden nach deren Aktivierung in einen heterotrimeren Komplex aus zwei R-Smads und einem co-Smad (Smad4) entlassen, der in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von Zielgenen durch direkte DNA-Interaktion oder durch funktionelle Kooperation mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren reguliert.

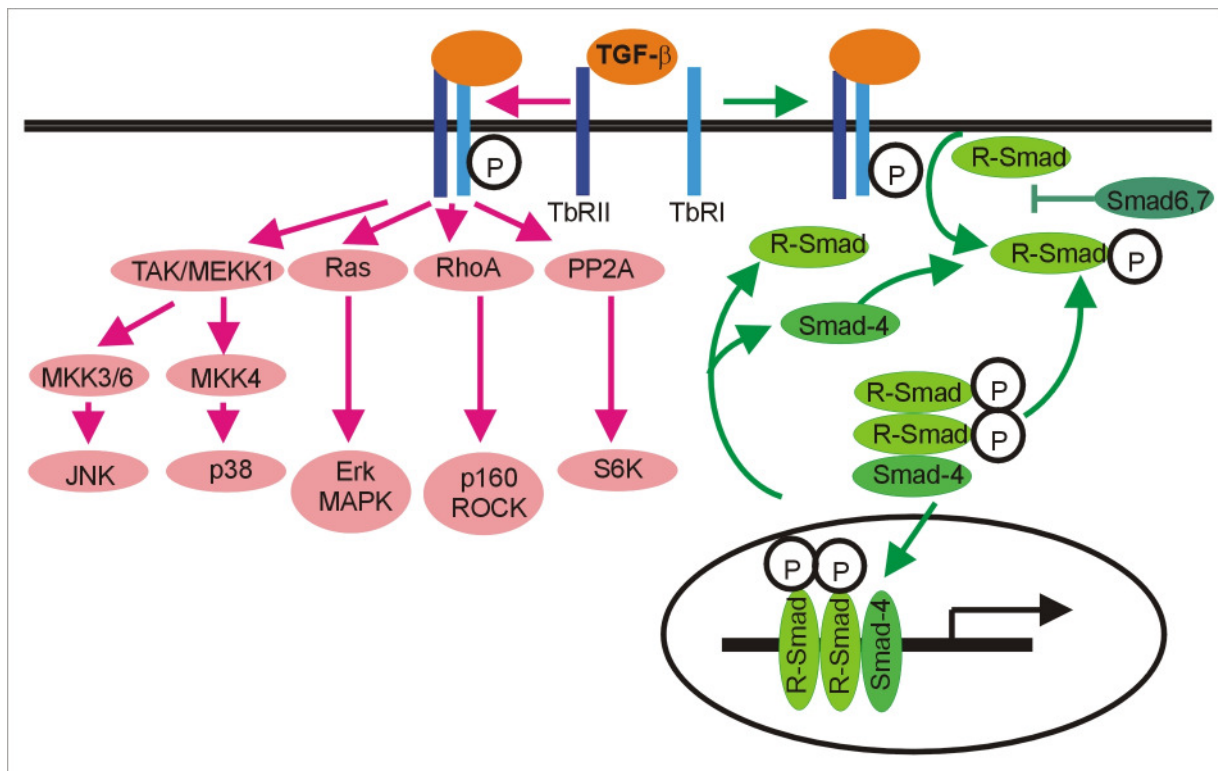


Abb. 1 TGF- β -Signalwege.

Ein TGF- β -Dimer bindet an den TGF- β -Rezeptor Typ II (T β RII), der den TGF- β -Rezeptor Typ I (T β RI) rekrutiert. Nach Phosphorylierung (P) des T β RII kommt es zu Smad-abhängiger (grün) oder Smad-unabhängiger (rosa) Signaltransduktion.

[nach Derynck und Zhang, 2003]

Inhibitory-Smads (Smad 6, 7) stellen einen auto-inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus dar, da sie die Aktivierung von R-Smads durch T β RI verhindern. Zu den Smad-unabhängigen TGF- β -Signalwegen gehören die Erk-, JNK- und p38 MAP-Kinase-Signalwege (Derynck und Zhang, 2003).

Viele der oben vorgestellten Signalwege und -moleküle wurden an nicht-neuronalen Zellen erforscht und es nicht geklärt, ob sie in Neuronen von Vertebraten ebenfalls in dieser Vielfalt vorkommen. Es wurde aber zum Beispiel gezeigt, dass es nach TGF- β 3-Behandlung in Neuronen des ventralen Mesenzephalons zu Smad-Translokation kommt (Farkas et al., 2003).

1.1.3 Maus-Mutanten mit TGF- β -Deletionen

Für alle TGF- β -Isoformen, die in Säugerzellen gebildet werden, wurden Maus-Mutanten mit den entsprechenden Gen-Deletionen generiert. Die Deletion der jeweiligen Isoformen führt zu unterschiedlichen, größtenteils nicht überlappenden Phänotypen.

Die Deletion des TGF- β 1-Gens führt zu einer allgemeinen Entzündungsreaktion. Die TGF- β 1-defizienten Tiere verkümmern und sterben wenige Wochen nach der Geburt. Die Analyse der defizienten Tiere verweist auf eine besondere Rolle von TGF- β 1 in der Regulation der Proliferation von Immunzellen und deren Extravasation in Gewebe (Shull et al., 1992).

Die TGF- β 3-defizienten Mäuse besitzen eine Gaumenspalte, die auf eine mangelnde Verschmelzung der gegenüberliegenden Kanten der Gaumenplatten zurückzuführen ist. Durch die Gaumenspalte sind die Neugeborenen nicht in der Lage richtig zu atmen und Milch zu saugen und sterben daher innerhalb des ersten Tages nach der Geburt (Proetzel et al., 1995).

Die Deletion des TGF- β 2-Gens bewirkt eine Reihe von Entwicklungsdefekten, die nicht mit denen der TGF- β 1 und - β 3-defizienten Tiere überlappen und damit zeigen, dass sie Isoform-spezifisch sind (Sanford et al., 1997). Zu den beobachteten Defekten gehören Fehlbildungen des Herzens, der Lunge, der Knochen, der Wirbelsäule, der Augen, des Innenohrs und des Urogenitaltraktes. Die TGF- β 2-defizienten Tiere sind zyanotisch und sterben kurz vor, während oder nach der Geburt. Die Analyse der beobachteten Defekte zeigt, dass diese wahrscheinlich auf eine gestörte Epithel-Mesenchym-Interaktion, auf Störungen des Zellwachstums, der Produktion extrazellulärer Matrix und der Gewebeumbildung zurückgeführt werden können. Außerdem haben viele der betroffenen Gewebe einen Neuralleisten-Ursprung (Sanford et al., 1997). Die TGF- β 2-defizienten Embryonen zeigen keine morphologischen Auffälligkeiten im Gehirn (Sanford et al., 1997) oder in der Anzahl von Motoneuronen im Rückenmark (Anika Ferdinand, persönliche Mitteilung).

Sanford und Mitarbeiter (1997) führen als mögliche Ursachen für die perinatale Sterblichkeit der TGF- β 2-defizienten Tiere pulmonale, kardiovaskuläre oder neuromuskuläre Defekte auf. Sie schlagen vor, dass die Herz-Defekte in zwei Drittel der Fälle die Todesursache sind und sie zusammen mit der Lungeninsuffizienz die postnatale Sterblichkeit bewirken. Untersuchungen des neuromuskulären Systems wurden in der Arbeit nicht durchgeführt. Die Deletion des T β RII ist früh (Embryonaltag (E) 10,5) letal (Oshima et al., 1996). Es gibt T β RII cre/loxP-Mäuse, bei denen T β RII konditionell deletiert werden kann (Cazac und Roes, 2000; Chytil et al., 2002), allerdings sind die Auswirkungen einer Deletion in Neuronen oder im gesamten Nervensystem bislang nicht untersucht.

1.1.4 Lokalisation von TGF- β s im neuromuskulären System

Im peripheren Nervensystem (PNS) von Säugetieren sind die drei TGF- β -Isoformen in verschiedenen Konzentrationen in den Zellen des neuromuskulären Systems, also in Motoneuronen, Muskelzellen und Schwannzellen zu finden (McLennan und Koishi, 2002). Die jeweiligen Zellen sezernieren die Isoformen dabei in unterschiedlichen Konzentrationen, wie in Abb. 2 durch verschiedene Farbschattierungen angedeutet ist.

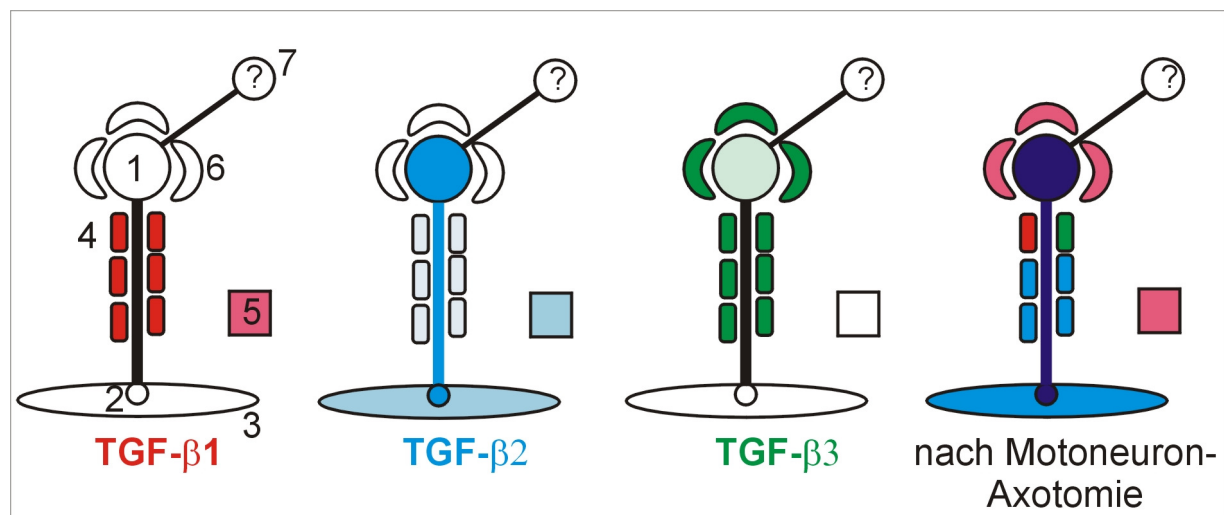


Abb. 2 Schematische Darstellung der Lokalisation der TGF- β -Isoformen im reifen neuromuskulären System und nach Motoneuron-Axotomie.

TGF- β 1: rot, TGF- β 2: blau, TGF- β 3: grün.

Die Farbabstufungen deuten die relativen Konzentrationen der Isoformen an, weiß: keine Expression, ?: unbekannte Konzentration.

1: Motoneuron, 2: synaptische Region der Skelettmuskel-Faser, 3: Muskelfaser, 4: Schwannzelle, 5: Plasma, 6: Glia, die mit dem Zellkörper des Motoneurons assoziiert ist, 7: Neurone, die Motoneurone innervieren.

[nach McLennan und Koishi, 2002]

Motoneurone exprimieren T β RI, T β RII und Betaglycan und die Rezeptoren sind einerseits an der Synapse, andererseits an den Membranen, die Schwannzellen gegenüber liegen, lokalisiert (Jiang et al., 2000). Schwannzellen sezernieren TGF- β 1, - β 2 und - β 3 in latenter Form und exprimieren alle drei TGF- β -Rezeptoren (Einheber et al., 1995). Dabei wird die Menge der TGF- β -Isoformen *in vitro* differentiell durch die Interaktion von Nerv und Schwannzellen reguliert, sodass die Konzentration von TGF- β 1 in Nerv-Schwannzellen-Kulturen im Gegensatz zu Schwannzellen-Monokulturen erniedrigt, die Konzentration von TGF- β 3 erhöht und die Menge an TGF- β 2 unverändert ist.

1.1.5 Lokalisation von TGF- β s im zentralen Nervensystem

Im sich entwickelnden zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugern werden TGF- β 2 und - β 3 von Neuronen und Gliazellen gebildet. TGF- β 1 ist im intakten, unverletzten zentralen Nervensystem nur in Meningen und im Plexus choroideus zu finden. TGF- β 2/3-Immunreaktivität ist im sich entwickelnden Embryo ab E 12,5-13 in Gliazellen und erst ab E 15 in Neuronen des Gehirns, des Rückenmarks und der peripheren Ganglien zu finden (Flanders et al., 1991). Zu den Neuronen, die eine starke TGF- β 2/3-Immunreaktivität zeigen, gehören Pyramidenzellen der kortikalen Schichten 2, 3 und 5 und des Hippokampus, die meisten magnozellulären Neurone der septalen Kerne und des Hypothalamus, sowie alle somato- und viszeromotorischen Neurone des Hirnstamms und des Rückenmarks (Krieglstein et al., 2002).

Im Vergleich zur Proteinlokalisierung der Liganden ist die Lokalisation der TGF- β -Rezeptoren im ZNS weniger bekannt, jedoch ist die Expression von Rezeptor-mRNA untersucht. T β RII-mRNA ist im ZNS weitverbreitet und konnte in Kortex, Mittelhirn, Cerebellum, Hirnstamm und Hippokampus nachgewiesen werden (Böttner et al., 1996). Im Nukleus (Nkl.) hypoglossus wurde die mRNA von T β RI, T β RII und Betaglycan nachgewiesen und die Motoneurone des Kerns sind für die drei Proteine auch immunpositiv (Jiang et al., 2000).

1.1.6 Funktionen von TGF- β s im Nervensystem

Betrachtet man die Mitglieder der gesamten TGF- β -Superfamilie (insbesondere BMPs), so reichen deren Aufgaben im Nervensystem von der Trennung von Epidermis und Neuroektoderm und der Ausbildung der Dorsal-Ventral-Achse des Neuralrohrs (Lee und Jessell, 1999) bis zur Induktion eines spezifischen Neurotransmitter-Phänotyps (López-Coviella et al., 2000; Reissmann et al., 1996). Zu den etablierten Funktionen der Unterfamilie der TGF- β -Isoformen 1-3 im Nervensystem gehören die Kontrolle von Überleben und Apoptose in Neuronen (Krieglstein, 2004; Krieglstein, 2006; Krieglstein et al., 2000; Krieglstein et al., 1995a; Krieglstein et al., 1995b; Krieglstein et al., 1995c; Krieglstein und Unsicker, 1994; Krieglstein und Unsicker, 1996; Schuster und Krieglstein, 2002).

TGF- β besitzt außerdem einen Einfluss auf die Differenzierung dopaminerger Neurone des Mesenzephalons *in vivo* (Farkas et al., 2003) und *in vitro* (Roussa et al., 2004) sowie einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Astrozyten (Flanders et al., 1993) und die Proliferation (Einheber et al., 1995; Ridley et al., 1989), Differenzierung (Day et al., 2003) und Apoptose von Schwannzellen (Parkinson et al., 2001).

Trotz der teilweise überlappenden Lokalisation der drei TGF- β -Isoformen ist es möglich, einzelnen Isoformen bestimmte Funktionen zuzuweisen. So besitzt beispielsweise TGF- β 1 einen ausgeprägten Einfluss auf die Myelinisierung durch Schwannzellen (Einheber et al., 1995). TGF- β 2 nimmt unter den drei TGF- β -Isoformen im neuromuskulären System eine besondere Rolle ein. Seine Lokalisation und Konzentration variiert während der Muskelentwicklung im Gegensatz zu der von - β 1 und - β 3, die unverändert bleiben (McLennan und Koishi, 2002). Es ist außerdem zumindest in postnatalen/reifen Muskelzellen in der subsynaptischen Region neuromuskulärer Endplatten lokalisiert und seine Expression ist in extrasynaptischen Regionen durch Innervation inhibiert (McLennan und Koishi, 1994; McLennan et al., 1998). Im adulten Organismus wird TGF- β 2 außerdem von Motoneuronen produziert und bidirektional in Richtung der Synapse und des Somas transportiert (Jiang et al., 2000). Aufgrund seiner Lokalisation könnte TGF- β 2 daher einerseits für das Überleben von Motoneuronen eine bedeutende Rolle spielen (McLennan et al., 1998), andererseits könnte es auch zu den Faktoren gehören, die die sekundäre Myotuben-Formation stimulieren (Jiang et al., 2000).

Zahlreiche Beispiele belegen, dass TGF- β s allein keine neurotrophe Wirkung besitzen, sondern dass sie vielmehr für die Wirkung klassischer Neurotrophine und anderer Faktoren essentiell sind (Unsicker und Krieglstein, 2000). So ist eindeutig belegt, dass TGF- β für die neurotrophe Wirkung von GDNF essentiell ist (Krieglstein et al., 1998b) und die Stimulation mit TGF- β die Rekrutierung des GDNF-Rezeptors GFR α an die Plasmamembran bewirkt (Peterziel et al., 2002). TGF- β moduliert als wichtiger Ko-Faktor die neurotrophe Wirkung von CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) und FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) in Neuronen des Ganglion ciliare (Krieglstein et al., 1998a) und von Neurotrophin (NT)-3 und NT-4 in Hinterwurzel-Neuronen (Krieglstein und Unsicker, 1996). In Astrozyten (Flanders et al., 1993) und auch in Schwannzellen (Schubert, 1992) kooperieren TGF- β und FGF-2 bei der Proliferation. Darüberhinaus hängt in Schwannzellen auch die Wirkung von β -Neuregulin von der Anwesenheit des T β RII ab (D'Antonio et al., 2006). Eine Ausnahme für eine rein kooperative Wirkung bilden jedoch Motoneurone, bei denen TGF- β auch allein eine neurotrophe Wirkung besitzt (Böttner et al., 2000).

1.2 Synaptogenese: Entwicklung synaptischer Verbindungen

Das Nervensystem von Vertebraten ist ein komplexes Netzwerk, das verschiedenste Funktionen erfüllt, die von der Sinneswahrnehmung über die Kontrolle von Bewegung bis hin zu höheren kognitiven Leistungen wie Lernen reichen. Das Nervensystem besteht aus mehreren Milliarden von Zellen – allein das menschliche Gehirn besteht aus bis zu 100 Milliarden Nervenzellen (Williams und Herrup, 1988) – jedoch ist nicht allein die Zahl, sondern vielmehr die synaptische Verbindung der Neurone untereinander und mit den Zellen ihres Zielgebiets (zum Beispiel Muskelzellen oder Drüsen) für die Funktion des Nervensystems von entscheidender Bedeutung. An so genannten chemischen Synapsen findet die elektrochemische Übertragung einer Erregung statt. Dabei wird aus präsynaptischen Vesikeln ein Transmitter freigesetzt, der in den synaptischen Spalt diffundiert und an der postsynaptischen Membran an spezifische Rezeptoren bindet, deren Aktivierung die Öffnung von Ionenkanälen bewirkt (Kandel und Siegelbaum, 2000).

Die Entwicklung von Synapsen (Synaptogenese) ist ein vielschichtiger Prozess, der die Bildung einer selektiven Verbindung zwischen einem Axon und seiner Zielzelle, die Differenzierung des Axon-Wachstumskegels in eine spezialisierte Nervenendigung und die Ausbildung eines spezialisierten postsynaptischen Apparates beinhaltet (Sanes und Jessel, 2000). Die Synaptogenese beginnt während der Embryonalentwicklung und ist zeitlich eng an die neuronale Differenzierung gekoppelt. Bei der Ausbildung eines Kontaktes zum Zielgebiet muss das Neuron von einem „Wachstums-Status“ zu einem „Synaptogenese-Status“ umschalten, sodass das Neuriten-Wachstum unterbrochen und die Entwicklung einer stabilen synaptischen Verbindung zwischen den prä- und postsynaptischen Partnern ermöglicht wird (Sanes und Lichtman, 1999).

Die Signale, die die Synaptogenese beeinflussen, sind entweder endogen, d.h. genetisch programmiert, oder werden über sekretorische Faktoren aus der Umgebung, wie zum Beispiel vom Zielgebiet oder von Gliazellen, vermittelt. Bestimmte Signale müssen die Polarität der Synapse gewährleisten und die unterschiedlichen Strukturen auf der prä- und postsynaptischen Seite erzeugen, die grundlegend für die gerichtete Signalübertragung sind (Scheiffele, 2003). Gleichzeitig muss durch spezifische Signale die funktionelle Differenzierung der prä- und postsynaptischen Seite aufeinander abgestimmt werden, sodass sich die jeweiligen Membranspezialisierungen genau gegenüberstehen und eine effiziente Neurotransmission möglich ist. Besonders im ZNS ist es außerdem wichtig, dass der präsynaptische Neurotransmitter und der postsynaptische Rezeptortyp aufeinander abgestimmt werden.

1.2.1 Synaptogenese im peripheren Nervensystem: Die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte

Die neuromuskuläre Endplatte, die synaptische Verbindung zwischen Nerv und Muskel, ist ein etabliertes Modell für die Untersuchung von Synaptogenese. Sie wird durch drei Kompartimente gebildet: Motoneuron, Muskelfaser und perisynaptische/terminale Schwannzelle. Als Neurotransmitter wird in Vertebraten Acetylcholin (ACh) verwendet. Auf der postsynaptischen Seite liegen im adulten Muskel subsynaptisch Acetylcholinrezeptoren (AChR) in sehr hohen Konzentrationen (> 10.000 Moleküle/ μm^2) vor, während die Konzentration in extra-synaptischen Regionen sehr niedrig ist (< 10 Moleküle/ μm^2) (Sanes und Lichtman, 1999; Sanes und Lichtman, 2001). Im Vergleich zu zentralen Synapsen ist die neuromuskuläre Endplatte etwa 30mal größer und daher leicht zugänglich (Sanes und Lichtman, 2001). Sie ist in Muskeln wie dem Zwerchfell oder dem M. Soleus gut immunhistochemisch darstellbar. Die Struktur der neuromuskulären Endplatte ist seit vielen Jahren gut charakterisiert und ihre molekularen Bestandteile sind weitestgehend bekannt (Grinnell, 1995).

Die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte kann nach derzeitigen Interpretationen in folgende Schritte eingeteilt werden (zusammengefasst in Witzemann, 2006 und Sanes und Lichtman, 1999): In einem frühen embryonalen Stadium (E 12-14 der Maus) kommt es zum so genannten *Prepatterning* der AChR auf der Muskeloberfläche. Unter *Prepatterning* versteht man die Aggregation von AChR in der zentralen Region der Muskelzellen. Dies geschieht durch einen Nerv-unabhängigen Mechanismus, der auf der spontanen Kinase-Aktivität der Muskelspezifischen Kinase (MuSK) beruht. Danach (E 14-16) kommt es zu einer aktivitätsabhängigen, also ACh- beziehungsweise AChR-abhängigen Stabilisierung der Kontakte zwischen Motoneuron und Muskel. Die Aggregate von AChR beginnen Cluster zu formen, d.h. Plaques mit höherer AChR-Dichte und scharfen Begrenzungen. Myogene Faktoren wie myoD und Myogenin induzieren die Gene für die AChR-Untereinheiten. Durch synaptische Aktivität wird die Ausbildung neuer Kontakte beziehungsweise neuer Rezeptor-Cluster in nicht-neuronalen Regionen verhindert, da es durch den Kalzium-Einstrom zu einer Proteinkinase C-abhängigen Inaktivierung der myogenen Faktoren kommt. Gleichzeitig folgt eine Agrin-abhängige Stabilisierung der bestehenden Kontakte. Die Analyse einer Agrin/ChAT-doppelt-defizienten Maus zeigte, dass Agrin nicht die initiale Bildung der AChR-Clustern fördert, wie es lange Zeit angenommen wurde (Burgess et al., 1999), sondern dass es eher als ein Gegenspieler von Neurotransmission verstanden werden muss, der eine AChR-Cluster-Auflösung an der Synapse verhindert (Kummer et al., 2006).

Im Zuge der synaptischen Differenzierung kommt es präsynaptisch zur Anreicherung von synaptischen Vesikeln, zur Ausbildung einer aktiven Zone und der Bildung einer Basallamina im synaptischen Spalt. Extra-synaptische AChR-Cluster werden eliminiert und es folgt ein

Wechsel von poly- zu monoinnervierten Clustern (Sanes und Lichtman, 1999). Die pränatale Reifung der Endplatte ist am E 18 abgeschlossen (Witzemann, 2006). Postnatal kommt es zu einer weiteren Differenzierung des neuromuskulären Kontakts. Dies beinhaltet den Austausch einer AChR-Untereinheit (von γ zu ϵ), die Bildung von Einstülpungen der postsynaptischen Membran, an deren Kämmen die AChR lokalisiert sind, und Perforationen des Clusters, der so ein "Bretzel-förmiges" Aussehen bekommt (Mishina et al., 1986; Sanes und Lichtman, 2001).

Das genannte Molekül Agrin wird von Motoneuronen sezerniert und bindet und aktiviert MuSK, die in der postsynaptischen Membran lokalisiert ist. Über das Protein Rapsyn wird wahrscheinlich die Verbindung zwischen MuSK und den AChR herstellt (Sanes und Lichtman, 1999). Agrin, MuSK und Rapsyn werden daher als Kernmoleküle bezeichnet, die die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte entscheidend steuern und notwendig – im Falle von Agrin und MuSK auch ausreichend – für die prä- und postsynaptische Differenzierung sind. Bei Mäusen, in denen die Gene dieser Moleküle deletiert wurden, sind entsprechend nahezu alle Aspekte der postsynaptischen Differenzierung wie zum Beispiel das Clustern der postsynaptischen AChR gestört (DeChiara et al., 1996; Gautam et al., 1996; Gautam et al., 1995). In Agrin- und MuSK-defizienten Tieren kommt es darüber hinaus zu einem exzessiven Auswachsen der tertiären Verzweigungen des Nervus (N.) phrenicus.

Es wurde lange Zeit angenommen, dass Neuregulin, das ebenfalls von Motoneuronen sezerniert wird, die Transkription von ACh fördert und damit zur Bildung von AChR notwendig ist (Chu et al., 1995). Jedoch zeigte eine jüngere Studie, dass der Verlust der Neuregulin-Rezeptoren ErbB2 und ErbB4 in Skelettmuskeln nur zu verhältnismäßig geringen Störungen in der Bildung neuromuskulärer Endplatten führte (Escher et al., 2005). Daher wird Neuregulin ein Effekt auf Schwannzellen zugeordnet, der die Synaptogenese sekundär beeinflusst (Kummer et al., 2006).

Weitere Faktoren, die zumindest *in vitro* die präsynaptische Differenzierung beeinflussen, sind Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs) wie NCAM (neurales CAM) und N-cadherin, die auf der Oberfläche des Wachstumskegels und der Muskelzellen lokalisiert sind und die das Auswachsen von Motoneuronen auf der Muskeloberfläche fördern (Dai und Peng, 1996). Die adhäsiven Wechselwirkungen stabilisieren wahrscheinlich frühe Kontakte zwischen Motoneuron und Muskel (Yamagata et al., 2003). Auch Komponenten der Basallamina, wie Laminin $\beta 2$, sind wichtig für die präsynaptische Differenzierung (Noakes et al., 1995).

Neben den genannten Molekülen beeinflusst auch die synaptische Aktivität selbst schon früh die Entwicklung von Synapsen. Wurde die synaptische Aktivität an der neuromuskulären Endplatte durch die Deletion des ACh-synthetisierenden Enzyms Cholin-Azetyltransferase (ChAT), unterbunden, kam es zu einer verminderten Anzahl von Motor-Axonon, Myotuben

und Schwannzellen (Misgeld et al., 2002). Zusätzlich war die Anzahl und Verteilung von synaptischen Kontakten und die Anzahl der Axone an einer einzelnen Endplatte verändert.

Terminale Schwannzellen sind neben Motoneuron und Muskelzelle das dritte Kompartiment der neuromuskulären Endplatte (Feng et al., 2005). Sie sind nicht-myelinisierende Schwannzellen und bilden verstärkt S100 und NCAM (Mirsky und Jessen, 1996). Untersuchungen an perisynaptischen/terminalen Schwannzellen in *Xenopus* zeigten, dass sie während der Entwicklung ebenfalls die Entstehung von Synapsen beeinflussen und auch für die Aufrechterhaltung der Struktur und der Funktion von Synapsen wichtig sind (Koirala et al., 2003). Sie produzieren einen Faktor, der die Anzahl von Synapsen, die Ausbildung der synaptischen Faltung, die Expression von Butyrylcholinesterase und die Aggregation von AChR beeinflusst (Koenig et al., 1998).

Neben den genannten Molekülen Agrin und MuSK, Zelladhäsionsproteinen, Basallamina-Komponenten und der Neurotransmission wird auch neurotrophen Faktoren eine bedeutende Rolle bei der prä- und postsynaptischen Differenzierung und Synapsenbildung zugeschrieben (Lu und Je, 2003). Im Sinne der klassischen Definition werden als neurotrophe Faktoren solche Moleküle bezeichnet, die sowohl das Überleben als auch die Differenzierung von Neuronen fördern (Hefti, 1997). Mittlerweile ist gut belegt, dass neurotrophe Faktoren ebenfalls die Entwicklung sowie die Plastizität des adulten Nervensystems regulieren und seine strukturelle Integrität sichern.

Faktoren mit neurotropher Wirkung sind Mitglieder der Familie der Neurotrophine, der IGF (*insulin-like growth factor*)-Familie, der EGF (*epidermal growth factor*)-Familie, der FGF-Familie, der PDGF (*platelet-derived growth factor*)-Familie, der Interleukin-6-Familie sowie der TGF- β -Superfamilie mit der BMP- und der GDNF-Familie (Hefti, 1997). Zu den Neurotrophinen gehören der Nervenwachstumsfaktor (NGF), der *brain-derived growth factor* (BDNF), sowie NT-3 und NT-4 (Huang und Reichardt, 2001).

Studien aus den 1950er Jahren von Hamburger und Levi-Montalcini über NGF, der als das klassische Neurotrophin gilt, führten zur Aufstellung der "Neurotrophe Faktoren-Hypothese" (Thoenen et al., 1987). Diese beruht auf der Beobachtung, dass in vielen Neuronen-Populationen der Zeitpunkt der Zielgebiets-Innervation (oder der affarenten Innervation) in die Periode des natürlichen Zelltods fällt. Es wurde daher angenommen, dass den Neuronen nur eine begrenzte Anzahl von synaptischen Kontaktstellen zur Verfügung steht, sie daher um diese konkurrieren und zugrunde gehen, wenn sie nicht genügend Synapsen ausbilden können (Oppenheim, 1991). Die Weiterführung dieser Theorie zeigte, dass die Neurone im Zielgebiet tatsächlich eher um neurotrophe Faktoren konkurrieren, die nur in limitierter Menge vorhanden sind. Neurone, die keine ausreichende Menge des Faktors erhalten, gehen in Apoptose und degenerieren (Oppenheim, 1991).

Mittlerweile ist belegt, dass neurotrophe Faktoren nicht nur die Neuron-Zielgebiets- (beziehungsweise Neuron-Affärenz-) Interaktion vermitteln und so eine Anpassung an die Zielgebietsgröße bewirken. Vielmehr erfüllen sie verschiedenste Aufgaben an der Synapse und beeinflussen ihre Morphologie und Funktion (Huang und Reichardt, 2001; Lu und Je, 2003; Poo, 2001). Sie fördern und steuern chemotaktisch das Auswachsen von Neuriten und beeinflussen im PNS wie im ZNS einerseits über einen längeren Zeitraum die Morphologie von Synapsen, andererseits haben sie auch einen akuten Einfluss auf die synaptische Transmission und Plastizität (Poo, 2001). So haben die Neurotrophine BDNF, NT-3 und NT-4 sowie auch GDNF bei *Xenopus* einerseits einen ausgeprägten Einfluss auf das Auswachsen und Überleben von Motoneuronen. Andererseits inhibieren sie die Synaptogenese beziehungsweise die Induktion von AChR-Clustern, wahrscheinlich indem sie die Agrin-Synthese der Motoneurone inhibieren (Peng et al., 2003). BDNF, NT-3 und NT-4 erhöhten darüberhinaus in Nerv-Muskel-Kulturen (aus *Xenopus*) sowohl spontane als auch evozierte synaptische Aktivität über einen präsynaptischen TrkB-Rezeptor-vermittelten Effekt (Boulanger und Poo, 1993; Lohof et al., 1993; Wang und Poo, 1997). Auch GDNF und Neurturin steigerten die Frequenz spontaner synaptischer Transmission und erhöhten auch leicht deren Amplitude (Wang et al., 2002). Bei Säugetieren (Maus) erhöhte eine akute Stimulation mit GDNF, jedoch nicht mit BDNF, NT-3, NT-4, LIF (*leukaemia inhibitory factor*), IGF-1 oder IGF-2 die neuromuskuläre Transmission (Ribchester et al., 1998).

1.2.2 Synaptogenese im zentralen Nervensystem

Im ZNS werden Synapsen zwischen Neuronen gebildet. Je nach genauer Lokalisation des Kontakts unterscheidet man axo-dendritische (Dornen- und Schaftsynapsen), axo-somatische und axo-axonale Synapsen (Kandel und Siegelbaum, 2000). Als Neurotransmitter werden in der Regel an erregenden Synapsen Glutamat, an hemmenden Synapsen Glyzin und GABA (γ -Amino-Buttersäure) verwendet. Die entsprechenden Rezeptoren sind in der postsynaptischen Membran geclustert. Weiterhin findet man auf der präsynaptischen Seite verschiedene Proteine, die generelle Strukturproteine darstellen (zum Beispiel bassoon und piccolo) oder an der Exo- und Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt sind (zum Beispiel munc-13, Synaptotagmin und α -SNAP) (Brachya et al., 2006). Auf der postsynaptischen Seite befinden sich Proteine wie PSD-95 (*postsynaptic density protein-95*), das Glutamat-Rezeptoren (vom NMDA-Typ) untereinander und mit dem Zytoskelett verankert (Kornau et al., 1995; Niethammer et al., 1996), und Gephyrin, das Glyzin- und GABA-Rezeptoren mit Mikrotubuli verbindet (Essrich et al., 1998; Feng et al., 1998). Im synaptischen Spalt zentraler Synapsen gibt es keine Basallamina. Stattdessen vermittelt die Interaktion entsprechender Adhäsionsmoleküle die nötige Stabilität. Zu diesen gehören Cadherine, Integrine, Neurexine und Neuroligine (Li und Sheng, 2003).

Auch wenn sich zentrale und periphere Synapsen zum Beispiel in ihren jeweiligen postsynaptischen Partnern deutlich unterscheiden, so gibt es in der Struktur und Entwicklung dennoch auffällige Ähnlichkeiten zwischen beiden Systemen (Sanes und Lichtman, 1999). Bei neuromuskulären Endplatten wie bei zentralen Neuron-Neuron-Synapsen ist eine Nervenendigung mit einem spezialisierten postsynaptischen Apparat verbunden und der Kontakt wird von einer Gliazelle bedeckt. In beiden Fällen besitzen die Nervenendigungen synaptische Vesikel, die die gleichen Proteine aufweisen und sich auch in den Mechanismen ihrer Ausschüttung ähneln. Es ist daher anzunehmen, dass Synaptogenese im zentralen und im peripheren Nervensystem nach ähnlichen Prinzipien verläuft. So wird auch im ZNS die Synaptogenese entweder durch Membran-gebundene Moleküle wie Zelladhäsionsmoleküle oder durch sezernierte Faktoren wie neurotrophe Faktoren gesteuert (Scheiffele, 2003). Allerdings wurden im ZNS im Gegensatz zum PNS bisher noch keine Signale gefunden, die allein ausschlaggebend für die Synapsenbildung sind. Es ist daher anzunehmen, dass mehrere redundante Mechanismen bestehen, die den Wegfall eines Signals kompensieren können (Scheiffele, 2003).

Während der Synaptogenese im ZNS werden Neurite zunächst durch bestimmte sezernierte Botenstoffe wie Netrine und Semaphorine in ihre Zielregion geführt (Waites et al., 2005). Danach treffen die Neurone auf so genannte *priming factors* (Vorbereitungs-Faktoren), die zum Beispiel die Axon- und Dendriten-Verzweigung fördern. Zu diesen Faktoren gehören FGF, WNT-Proteine, Cholesterin und Thrombospondin (Waites et al., 2005). Befinden sich die Axone im richtigen Zielgebiet, vermittelt die Interaktion von Zelladhäsionsproteinen – zum Beispiel Mitglieder der Cadherin- und Protocadherin-Superfamilien – einen ausreichend stabilen Kontakt. Mittlerweile ist belegt, dass Zelladhäsionsmoleküle nicht nur für die mechanische Stabilität von Synapsen notwendig sind, sondern auch deren Entstehung beeinflussen (Yamagata et al., 2003). So induzieren zum Beispiel NCAM und SynCAM (synaptisches CAM) die Bildung von präsynaptischen aktiven Zonen (Biederer et al., 2002). Die Neuroligin-Bindungspartner α - und β -Neurexin sowie Narp und EphrinB fördern die Rekrutierung von Glutamat-Rezeptoren und postsynaptischen Gerüst-Proteinen (Scheiffele, 2003; Waites et al., 2005). Des Weiteren wird auch Laminin β 2, Versican und Heparansulfat-Proteoglycan eine Rolle in der Synaptogenese im ZNS zugeschrieben (Akins und Biederer, 2006).

Auch die Gliazellen des ZNS, genauer Astrozyten, spielen bei der Synaptogenese eine wichtige Rolle. Sie bieten den Neuronen nicht nur eine trophische Unterstützung, sondern modulieren auch das Axon-Wachstum, entfernen überflüssige Axon-Projektionen und unterstützen damit die Ausformung des neuronalen Netzwerkes. Sie formen dendritische Dornen und sezernieren viele Faktoren, die die Bildung und funktionelle Reifung von Synapsen fördern (Freeman, 2006).

Auch im ZNS spielen neurotrophe Faktoren, insbesondere Neurotrophine, nicht nur eine Rolle für das Überleben von Neuronen, sondern beeinflussen auch die Synaptogenese (Bibel und Barde, 2000). Im Sinne des "Neurotrophe Faktoren"-Konzeptes werden Neurotrophine im ZNS von prä- oder postsynaptischen Neuronen sezerniert und können retrograde, anterograde und autokrine Wirkung besitzen. Sie werden auch von Gliazellen sezerniert und können parakrin auf die Neurone wirken. Neuronale Aktivität verstärkt die Expression, Sekretion und Wirkung der Neurotrophine, die ihrerseits die synaptische Transmission modulieren. Dabei können sie eine direkte instruktive oder eine eher indirekte permissive Wirkung besitzen (Schinder und Poo, 2000). So können sie zum Beispiel selbst einen Einfluss auf die präsynaptische Transmitter-Ausschüttung haben, die postsynaptische Sensitivität für die Transmitter erhöhen oder zum Beispiel als Ko-Faktoren die Wirkung anderer Faktoren unterstützen, die die Morphologie der Synapsen verändern. So wird beispielsweise BDNF an glutamatergen Synapsen Aktivitäts-abhängig ausgeschüttet (Hartmann et al., 2001) und ist einerseits *in vivo* (Causing et al., 1997; Pozzo-Miller et al., 1999) und *in vitro* (Tyler und Pozzo-Miller, 2001) ein wichtiger Faktor für die präsynaptische Differenzierung. Andererseits wurde eine Rolle in der Langzeit-Potenzierung (LTP) beschrieben, wodurch BDNF an einem Prozess beteiligt ist, der die synaptische Effizienz beeinflusst (Lessmann, 1998).

1.3 TGF- β s und Synaptogenese

Wie in den beiden vorangehenden Kapiteln beschrieben wurde, vermitteln während der Synaptogenese eine Reihe sezernierter Faktoren eine abgestimmte Entwicklung der Prä- und Postsynapse. Diese Faktoren können dabei anterograde Wirkung haben (zum Beispiel Agrin) und die postsynaptische Differenzierung steuern. Sie können jedoch auch vom Zielgebiet ausgeschüttet werden (zum Beispiel Neurotrophine) und retrograd wirken, indem sie zu einer Differenzierung der Präsynapse führen. In den bestehenden Modellen der Synaptogenese ist jedoch unklar, warum so viele verschiedene Faktoren die Entwicklung der Synapsen beeinflussen und welche davon für die initiale Synaptogenese und welche für die synaptische Reifung und Stabilität verantwortlich sind. Auch ist ungeklärt, ob all diese Faktoren eine gleichberechtigte Funktion besitzen oder ob es einen Faktor gibt, der physiologisch am relevantesten ist und dessen Wirkung durch die anderen Faktoren nur moduliert wird. Es ist ebenfalls nicht ausreichend untersucht, inwieweit die verschiedenen Faktoren miteinander kooperieren und erst eine synergistische Wirkung den erforderlichen Effekt bewirken kann. Es könnte dabei auch möglich sein, dass nur ein bestimmtes zeitliches oder räumliches Muster von verschiedenen Ko-Faktoren die Synapsenentwicklung steuern kann.

Als anterograde und retrograde Signale werden speziell Neurotrophine, WNT-Signale und Mitglieder der TGF- β Superfamilie diskutiert (Packard et al., 2003; Salinas, 2003; Snider und Lichtman, 1996). Obwohl insbesondere die Rolle von Neurotrophen, GDNF und BMPs an der Synapse untersucht wurde, ist die Funktion der TGF- β -Isoformen in Säugetieren bislang nicht bekannt. Ihre Lokalisation an der neuromuskulären Endplatte und in den Zellpopulationen des ZNS lässt eine Rolle in der Synaptogenese jedoch möglich erscheinen. Ihre Rolle in der Bildung von extrazellulärer Matrix führt zu der Annahme, dass TGF- β s das Auswachsen von Neuriten steuern können und TGF- β 2 eventuell als "Stop-Signal" dient, das bei einem Kontakt zum Zielgebiet ein weiteres Wachstum der Neurite verhindert. Vor dem Hintergrund der "Neurotrophe Faktoren"-Hypothese kann angenommen werden, dass die Aktivitäts-abhängige Ausschüttung von TGF- β 2/3 von Neuronen in Zusammenhang mit der Bildung von synaptischen Kontakten steht und dies einen Mechanismus der neurotrophen Stabilisierung von Synapsen beziehungsweise der synaptotrophen Wirkung von TGF- β darstellt.

Es muss daher untersucht werden, ob diese möglichen Rollen von TGF- β bestehen und wie sie aussehen könnten, d.h. ob TGF- β s einen Einfluss auf die morphologische Entwicklung der Synapsen, auf ihre Funktion oder auf beide Vorgänge haben. Falls ein solcher Einfluss besteht, muss untersucht werden, ob er sich fördernd oder hemmend auf die Synapsen auswirkt und welche Mechanismen daran beteiligt sind. Es muss analysiert werden, ob TGF- β s allein eine essentielle Wirkung besitzen, ob sie die Wirkung anderer Faktoren beeinflussen oder ob ihre Wirkung selbst von Ko-Faktoren abhängt. Es gilt zu klären, ob die drei TGF- β -Isoformen redundante oder unterschiedliche Funktionen besitzen. Insbesondere in Anbetracht der weitverbreiteten Expression von TGF- β s ist es darüber hinaus wichtig zu untersuchen, ob ein möglicher Einfluss auf Synapsen ein generelles Prinzip darstellt, oder ob TGF- β s nur in bestimmten Systemen oder zu bestimmten Zeitpunkten in die Synaptogenese eingreifen.

Dass TGF- β s tatsächlich eine Rolle in der Entwicklung und Funktion von Synapsen spielen, lässt sich nicht nur aus der beschriebenen Lokalisation sondern auch aus den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen an *Drosophila*, *Xenopus* und *Aplysia* ableiten: In *Drosophila* wurde durch gemischte genetische Ansätze ein recht verständliches Bild des TGF- β -Signalweges, der das Wachstum der neuromuskulären Endplatte während der larvalen Entwicklung reguliert, entwickelt. Die Ansätze kombinierten einen Mutagenese-Screen und die Suche nach Kandidaten-Genen und identifizierten BMP-Homologe und die entsprechenden Rezeptoren als wichtige Regulatoren von Synaptogenese. Die homologen Proteine der TGF- β -Familie in *Drosophila* und Säugetieren sind in Tab. 1 zusammengefasst. *Wishful thinking* (Wit) trägt maßgeblich zur Struktur und Funktion neuromuskulärer Endplatten bei (Aberle et al., 2002; Marqués et al., 2002). Wit-Mutationen führten während

der Embryogenese zu einem gestörten Wachstum der neuromuskulären Endplatte, wobei die Muskel-Innervation normal war. Am Ende der larvalen Entwicklung war die Anzahl der synaptischen Boutons im Vergleich zum Wildtyp um 30-35 % reduziert. Die synaptischen Boutons waren zwar morphologisch normal, wiesen jedoch ultrastrukturelle Defekte in der Präsynapse auf. Dazu gehörten ein Ablösen der prä- und postsynaptischen Membran sowie der *T-bars*. Die ultrastrukturellen Defekte gingen mit einer funktionellen Störungen der synaptischen Transmission einher: Die Frequenz von spontaner Neurotransmitter-Ausschüttung war im Vergleich zum Wildtyp auf 25 % reduziert, wobei die Größe eines Quants unverändert (Marqués et al., 2002) beziehungsweise nur gering vermindert war (Aberle et al., 2002). Zusätzlich kam es in den Wit-Mutanten neben der veränderten Präsynapse auch zu einem spezifischen Verlust des Zelladhäsions-moleküls Fasciclin II an synaptischen Terminalien. Die Lokalisation entlang der Motor-Axon-Bündel blieb dagegen unverändert (Aberle et al., 2002).

Das BMP-7-Homolog *glass-bottom boat* (Gbb) ist der Ligand für Wit, und Mutationen in Gbb bewirkten einen vergleichbaren Phänotyp (McCabe et al., 2003). Gbb fungierte einerseits als retrogrades Signal, das vom Muskel ausgeschüttet wird und lokal direkt an der Präsynapse wirkt. Andererseits gab es auch Hinweise für eine Funktion von präsynaptisch ausgeschüttetem Gbb (Baines, 2004), das einen Einfluss auf die postsynaptische Differenzierung hat (Dudu et al., 2006).

Tab. 1 Übersicht über homologe TGF- β -Liganden, TGF- β -Rezeptoren und Smad-Proteine in *Drosophila* und Säugetieren.

		Drosophila	Säugetiere
Ligand		Gbb, <i>glass-bottom boat</i>	BMP-7
		Dpp, <i>decapentaplegic</i> Scw, <i>screw</i>	BMP-2, BMP-4
Rezeptor Typ I		Tkv, <i>thickveins</i> Sax, <i>saxophone</i>	BMPI (BMP-Rezeptor Typ I)
		Babo, <i>baboon</i>	T β RI (TGF- β -Rezeptor Typ I)
Rezeptor Typ II		Wit, <i>wishful thinking</i>	BMPII (BMP-Rezeptor Typ II)
		Put, <i>punt</i>	T β RII (TGF- β -Rezeptor Typ II)
Smad-Proteine	<i>receptor-Smad</i>	Mad, <i>mother against dpp</i>	Smad1, -5, -8 Smad2, -3
	<i>common Smad</i>	Med, <i>medea</i>	Smad4
	<i>inhibitory Smad</i>	Dad, <i>daughters against dpp</i>	Smad6, -7

Des Weiteren resultierten auch Mutationen der Typ I BMP-Rezeptoren *thickveins* (Tkv) und *saxophone* (Sax), sowie in dem R-Smad (Smad1) *mothers against decapentaplegic* (Mad) oder dem Co-Smad (Smad4) *Medea* (Med) in kleineren Synapsen, gestörter synaptischer Transmission und abweichender Struktur der synaptischen Boutons (Aberle et al., 2002; Haghighi et al., 2003; Marqués et al., 2002; Marqués et al., 2003; McCabe et al., 2004; McCabe et al., 2003; Rawson et al., 2003).

Zu den durch Wit-Signalwege beeinflussten Genen gehört *highwire* (hiw). Hiw-Mutationen führten zu deutlich vergrößerten Synapsen und erhöhter Anzahl von synaptischen Boutons. Hiw stellt daher wahrscheinlich ein inhibitorisches Signal während der Synaptogenese dar und könnte mit den Synapsen-fördernden BMP-Signalen eine Balance ausbilden (McCabe et al., 2004).

In Säugern ist das beschriebene Gbb ein Homolog von BMP-7 und nicht von TGF- β 1-3. Dennoch entspricht die Lokalisation von Gbb und Wit in *Drosophila* der Situation an der neuromuskulären Endplatte von Säugern: TGF- β s werden sowohl von Motoneuronen als auch von Muskelzellen sezerniert, und die TGF- β -Rezeptoren Typ I und II werden von Motoneuronen exprimiert und sind an der neuromuskulären Endplatte lokalisiert (Jiang et al., 2000; McLennan und Koishi, 2002). Es könnte daher sein, dass TGF- β s und T β RI/T β RII "Funktions-Orthologe" von Gbb und Wit/Tkv sind und in Säugern die Entstehung der neuromuskulären Endplatte beeinflussen. Dabei könnte insbesondere TGF- β 2 aufgrund seiner besonderen Lokalisation (McLennan und Koishi, 2002) der wirksame TGF- β -Ligand sein.

Weitere Hinweise auf die Rolle von TGF- β stammen aus Untersuchungen in Nerv-Muskel-Kulturen aus *Xenopus*. So konnte TGF- β 1 aus Schwannzellen-konditioniertem Medium isoliert werden und es wurde gezeigt, dass es den Schwannzellen-induzierten synaptogenen Effekt in den Nerv-Muskel-Kulturen vermittelte (Feng und Ko, 2004).

In *Aplysia* konnte ein Zusammenhang zwischen TGF- β und der Funktion von Synapsen gezeigt werden. Die Rolle von TGF- β in der Langzeit-Fazilitation wurde in isolierten Ganglien untersucht. In diesen Neuronen ist Serotonin ein bekannter Auslöser von Fazilitation (Bahnung) (Byrne und Kandel, 1996). Die Autoren konnten zeigen, dass eine 24- bis 48-stündige Behandlung mit TGF- β 1 ebenfalls eine Fazilitation induzierte (*long-term facilitation*), nicht aber die Behandlung für 5-15 Minuten (*short-term facilitation*) oder für zwei bis vier Stunden (*intermediate-term facilitation*). Es gab dabei keinen additiven Effekt bei gleichzeitiger Gabe von Serotonin, jedoch konnte die Serotonin-induzierte Fazilitation durch einen TGF- β -Inhibitor (löslicher rekombinanter humaner TGF- β -Rezeptor II) unterdrückt werden (Zhang et al., 1997). TGF- β 1 induzierte ebenfalls Langzeit-Anstiege in neuronaler Erregbarkeit (Chin et al., 1999; Farr et al., 1999). Darüber hinaus besaß TGF- β auch einen akuten Effekt. So führte eine TGF- β -Behandlung für fünf Minuten zu einer Aktivierung der

Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und stimulierte darüber hinaus MAPK-abhängig die Phosphorylierung von Synapsin. Diese Phosphorylierung modulierte die Synapsin-Verteilung in kultivierten sensorischen Neuronen, was darauf hindeutet, dass TGF- β 1 durch diesen Mechanismus synaptische Vesikel mobilisiert (Chin et al., 2002).

Um eine mögliche Rolle von TGF- β 2 in der morphologischen Entwicklung und der Funktion von Synapsen zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell einer TGF- β 2-defizienten Maus gewählt. In dieser Maus sollten Aspekte der Synaptogenese im PNS und im ZNS analysiert werden. Zur Analyse der Synaptogenese im PNS wurde das Zwerchfell (Diaphragma) verwendet. Es besteht im Gegensatz zu anderen Systemen aus nur einem Muskel, der zum Beispiel bei der Ratte durch ~20.000 Motoneurone innerviert wird (Gottschall, 1981). Die Motoneurone bilden den N. phrenicus, der das Zwerchfell motorisch innerviert. Die Motoneurone erreichen das Zwerchfell am E 12 und bilden initiale Kontakte mit dem Muskel. Etwa 24 Stunden später (E 13,5) kommt es zu einer intramuskulärer Aufspaltung des Nervs und einer Induktion der Expression von AChR (Greer et al., 1999; Hall und Sanes, 1993). Die AChR aggregieren zunächst in einem Band, das entlang des Zentrums der Muskelfasern senkrecht zu ihrer Ausrichtung verläuft. Diese Region wird daher auch zentrales Endplatten-Band genannt. Der N. phrenicus und das Zwerchfell stellen die wichtigsten neuromuskulären Bestandteile des respiratorischen Systems dar und müssen bis zur Geburt funktionell vollständig ausgebildet sein um Atmung und damit Überleben zu gewährleisten (Greer et al., 1992).

Im ZNS beginnt Synaptogenese zwar pränatal, allerdings wird der Großteil der Synapsen erst postnatal gebildet. Sie vollzieht sich zuerst in den phylogenetisch alten Hirnteilen und schreitet vom Hirnstamm rostralwärts fort. Zu den Systemen, die auch schon pränatal über eine funktionell reife Vernetzung verfügen, gehört der Prä-Bötzing-Komplex (PreBötC) in der ventralen Medulla, der einen Teil des zentralen respiratorischen Zentrums darstellt (Richter und Spyer, 2001). Wie die periphere Innervation des Zwerchfells muss auch dieses System ab dem Zeitpunkt der Geburt funktionell sein. Stellt man akute Schnitte dieser Gehirnregion her, so lässt sich in ihnen trotz der Abtrennung ihrer Eingänge eine rhythmische Aktivität feststellen (Greer et al., 2006). Präparationen des PreBötC eignen sich somit gut für die Analyse von synaptischer Transmission im embryonalen Gehirn.

Zur Untersuchung von Synaptogenese *in vitro* eignen sich Kulturen von Neuronen aus verschiedenen Gehirnregionen, wobei hippokampale Neuronenkulturen zu den am häufigsten verwendeten zählen. Ein Vorteil des *in vitro*-Systems ist die Möglichkeit einer gezielten Faktorenzugabe oder -neutralisation, nach der sich die Bildung von Synapsen, aber auch involvierte Signalwege und beteiligte Gene gut untersuchen lassen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von TGF- β 2 auf die Entstehung und Funktion von Synapsen im peripheren sowie im zentralen Nervensystem von Säugern zu untersuchen.

Am Beispiel der Innervation des Zwerchfells sollte untersucht werden, ob durch die Deletion von TGF- β 2 die Morphologie der neuromuskulären Endplatte beeinflusst wird. Dazu sollten Faszikulation und Verzweigungsmuster des N. phrenicus, Innervation der Endplatten sowie Differenzierung der Postsynapse und von Schwannzellen untersucht werden. Außerdem sollte analysiert werden, ob die Deletion von TGF- β 2 die synaptische Transmission in Neuronen der ventralen Medulla beeinflusst, und ob es zu einer veränderten Anzahl und Größe von Synapsen dieser Neurone kommt. Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob TGF- β die Anzahl und Größe von Synapsen in hippocampalen Neuronen beeinflusst und ob es Hinweise auf einen akuten Effekt von TGF- β auf die Funktionalität dieser Synapsen gibt.

Mit Hilfe der erhaltenen Ergebnisse sollten Aussagen über die biologische Funktion von TGF- β 2 an Synapsen und bei deren Entstehung getroffen werden: Beeinflusst TGF- β 2 tatsächlich die Entstehung beziehungsweise die Morphologie von Synapsen oder hat es auch eine Bedeutung für die Funktionalität der synaptischen Kontakte? Ist TGF- β 2 im PNS und im ZNS gleichermaßen an der Synaptogenese oder der synaptischen Funktion beteiligt? Könnte TGF- β 2 mit der Wirkung eines weiteren Faktors kooperieren? Gibt es einen bestimmten Zeitpunkt während der Entwicklung, an dem eine Wirkung von TGF- β 2 besonders wichtig ist? Kann die Deletion von TGF- β 2 durch andere Isoformen oder Faktoren kompensiert werden?

Da bei der Untersuchung überwiegend an den peripheren und zentralen Anteilen des respiratorischen Systems der TGF- β 2-defizienten Tiere gearbeitet wurde, sollten die erarbeiteten Ergebnisse auch darüber Aufschluss geben, welche Defizite dieses Systems dem beobachteten Phänotyp (kongenitale Zyanose) zugrunde liegen könnten.

2 Material

2.1 Tiere

NMRI-Mäuse wurden von der zentralen tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen bezogen. *Tgf-β2^{+/-}*-Mäuse stammten ursprünglich von Tom Doetschmann, Cincinatti (Sanford et al., 1997) und wurden im hauseigenen Tierstall gehalten und gezüchtet.

2.2 Zelllinien

Der Einfluss von TGF-β auf das Clustern von AChR *in vitro* wurde an der Zelllinie C2C12 (Blau et al., 1985; Yaffe und Saxel, 1977) untersucht. Bei C2C12 handelt es sich um eine Muskel-Zelllinie der Maus, die durch entsprechende Kulturbedingungen (Serum-Entzug) zu Myotuben differenziert werden kann.

2.3 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*), 50x B27, fötales Rinderserum (FBS), Pferdeserum (HS), normales Ziegenserum (NGS), Glutamin 200 mM, 10x HBSS, Neurobasal-Medium, 100x Penicillin/Streptomycin/Neomycin (PSN) und 7,5 % Natriumbicarbonat wurden von Gibco/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Apo-Transferrin, Cytosin-Arabinosid (AraC), Glutathion, Laminin und Super-Oxid-Dismutase (SOD) wurden von Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in Wasser mit Millipore-Qualität (18,2 MΩ) angesetzt.

2.4.1 Puffer und Lösungen für Zellkulturarbeiten

CMF (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ frei)	2 %	Natriumhydrogencarbonat
		in 1x HBSS, pH 7,4

2.4.2 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten

ADS (<i>antibody dilution solution</i>)	10 %	NGS
	125 mM	Lysin
	0,02 %	Natriumazid
		in PBS

Bouin-Fixans	1 %	Pikrinsäure
	10 %	Formalin
	5 %	Essigsäure
Eosin-Lösung	0,1 %	Eosin in A. dest
Kresylviolett-Lösung	0,5 % (w/v)	Kresylviolett
	0,96 %	Essigsäure
	in Natrium-Acetat-Puffer	
Paraformaldehyd-Lösung, 4 %ig	4 % (w/v)	Formaldehyd
	in 0,1 M	Phosphatpuffer
PBS (<i>Phosphat-buffered saline</i>), 10x	1,38 M	Natriumchlorid
	27 mM	Kaliumchlorid
	81 mM	Dinatriumhydrogenphosphat
	14,7 mM	Kaliumdihydrogenphosphat
Phosphatpuffer, 0,2 M	0,2 M	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	0,2 M	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

2.4.3 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

Ammoniumperoxysulfatlösung	10 % (w/v)	Ammoniumperoxysulfat
Laufpuffer (SDS-PAGE), 10x	250 mM	Tris
	2,5 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
NP40-Lysispuffer	10 mM	Tris
	1,5 mM	MgCl_2
	0,5 % (v/v)	NP40
Ponceau-Lösung	0,2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (v/v)	Trichloressigsäure
	3 % (v/v)	Sulfosalycylsäure
PBS-T	PBS + 0,05 % Tween 20	

Sammelgelpuffer	8 mM	EDTA
	0,4 %	SDS
	0,5 M	Tris-HCl
	pH 6,8	
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5 mM	Tris-HCl pH 6,8
	100 mM	β-Mercaptoethanol
	2 % (w/v)	SDS
TBS (<i>Tris-buffered saline</i>), 10x	1,38 M	NaCl
	0,2 M	Tris-Base
	pH 7,6	
TBS-T	TBS + 0,1 % Tween-20	
Transferpuffer (<i>semi-dry</i> Blot), 1x	2,5 mM	Tris-HCl
	1,9 mM	Glycin
	10 % (v/v)	Methanol
	0,2 % (w/v)	SDS
	pH 8,4-8,6	
Trenngelpuffer	8 mM	EDTA
	0,4 %	SDS
	1,5 M	Tris-HCl
	pH 8,8	

2.4.4 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

DNA-Ladepuffer Orange G (50 bp), 6x	0,2 % (w/v)	Orange G
	1 % (w/v)	SDS
	50 % (w/v)	Saccharose
DNA-Ladepuffer Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanol
	30 % (v/v)	Glycerin
	3 % (w/v)	SDS
	30 % (v/v)	10x TAE
	ad 10 ml mit A. dest	

TAE-Puffer, 50x	2 M	Tris-Base
	5,71 % (v/v)	Eisessig
	10 % (v/v)	0,5 M EDTA
	pH 8,0	

2.5 Zytokine und andere Faktoren

TGF- β 1	PeptoTech, London/Hamburg (Kat. Nr. 100-21C)
Aggrin, rekombinant (Ratte, C-Terminal)	R&D Systems (Kat. Nr. 550- AG)

2.6 Inhibitoren

SB 431542 (ALK4,5,7-Inhibitor)	Tocris (Kat. Nr. 1614)
Protease-Inhibitor	Roche

2.7 Biochemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva
Eiweiß-Glycerin	Roth
Magermilchpulver	Roth
Trypan-Blau	Seromed
Poly-L-Ornithine	Sigma
Glutamat	Sigma
dNTPs	Roche
OligodT-Primer	Invitrogen

2.8 Chemikalien

Acrylamidlösung (30 %, gebrauchsfertig), Agarose, Ammoniumperoxysulfat, EDTA, Ethanol, Glycin, Glycerin, Isopropanol, Methanol, Meyers Hämalaun-Lösung, Natriumchlorid, Saccharose, Salzsäure (HCl), Tris-Base, Tween-20 und Xylol wurden von Roth (Karlsruhe) bezogen.

Bradford-Lösung (gebrauchsfertig) wurde von Bio-Rad (München) bezogen.

Eindeckmittel (Fluomount) wurde von Dako (Hamburg) bezogen.

Entellan-Eindeckmittel, Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Eosin Yellow, Formaldehyd, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat Monohydrat ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Kresylviolett, Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und Pikrinsäure wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

β -Mercaptoethanol, TEMED (Tetramethylethyldiamin) und Triton-X 100 wurden von Fluka/Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Kryomedium (Neg -50) wurde von Richard-Allan Scientific bezogen.

Natriumdodezylsulfat (SDS) wurde von Serva (Heidelberg) bezogen.

Entwickler- und Fixierlösung für Röntgenfilme wurden von Adefo (Nürnberg) bezogen.

2.9 Enzyme

0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA	Gibco
Taq-Polymerase	Invitrogen
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
DNaseI	Qiagen oder Machery Nagel

2.10 Antikörper

Neutralisierende Antikörper	Hersteller (Katalognummer)
Maus anti-TGF- β 1,2,3 (Klon 1D11)	R&D Systems (MAB1835)

Polyklonale Antikörper

Kaninchen anti-Neurofilament 150 kD	Chemicon (AB 1981)
Kaninchen anti-phospho-Smad2 (Ser465/467) Cell Signaling (3101)	
Kaninchen anti-phospho-Synapsin (Ser9) Cell Signaling (2311)	
Kaninchen anti-Synapsin I/II	Synaptic Systems (106002)
Kaninchen anti-TGF- β Rezeptor Typ II	Upstate (06-227)
Meerschweinchen anti-vGlut1	Chemicon (AB 5905)
Meerschweinchen anti-vGlut2	Chemicon (AB 5907)
Meerschweinchen anti-vGat	Chemicon (AB 5855)

Monoklonale Antikörper	Hersteller (Katalognummer)
Maus anti-GAPDH	abcam (ab8245)
Maus anti-Gephyrin, Klon mAb7a (GlyR7a)	Synaptic Systems (147011)
Maus anti-Golgi 58K, Klon 58K-9	Sigma (G 2404)
Maus anti-Smad1,2,3	Santa Cruz Technology (sc-7960)
Maus anti-Synaptophysin, Klon SY38	Dako (M 0776)
Maus anti-smooth muscle actin	Sigma (A5228)

Gekoppelte Zweit-Antikörper**Hersteller (Katalognummer)**

Ziege anti-Kaninchen-FITC	Jackson Immuno Research (111095003)
Ziege anti-Maus-FITC	Jackson Immuno Research (115165003)
Esel anti-Kaninchen-Cy3	Jackson Immuno Research (711165152)
Esel anti-Maus-Cy3	Jackson Immuno Research (715165150)
Ziege anti-Meerschweinchen-Rhodamin	Chemicon (AP10812)
Ziege anti-Maus-HRP	Jackson Immuno Research (115035003)
Ziege anti-Kaninchen-HRP	Jackson Immuno Research (111035003)

Weitere Fluoreszenz-gekoppelte Moleküle

DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) Sigma

Alexa Fluor 488- α -Bungarotoxin Molecular Probes (B-13422)

2.11 Kits

PCR Kit (Taq-Polymerase)	Invitrogen
Reverse Transkriptase Kit	Fermentas
RNeasy Kit	Qiagen
DNA Midi Kit	Qiagen
Enhanced Chemiluminescence Kit	Perkin Elmer

2.12 Standards

DNA-Standards:

Hyperladder I (1 kb)	Bioline
Hyperladder II (100 bp)	Bioline
Hyperladder V	Bioline

Proteinstandard:

SeeBlueTMPlus2, *prestained* Invitrogen

2.13 Software

Word, Excel	Microsoft Office
Photoshop, Illustrator	Adobe
CorelDraw	Corel Corporation
Image J	National Institute of Health, USA http://rsb.info.nih.gov/ij/
AnalySIS	Soft-Imaging Systems

2.14 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Tab. 2 **Verwendete Primer-Paare mit Angabe der jeweiligen Hybridisierungstemperatur und der erwarteten Fragmentgröße.**

Name	Sequenz	Hybridisierungstemperatur in °C	erwartete Fragmentgröße in bp
b2-3'	AAC TCC ATA GAT ATG GGC ATG C	56	132 (WT)
b2-5'	AAT GTG CAG GAT AAT TGC TGC		1500 (ko)
b2-neo	GCC GAG AAA GTA TCC ATC AT (Sanford et al., 1997)		600 (ko)
GAPDH-f GAPDH-r	CGG CCG CAT CTT CTT GTG TGA CCA GGC GCC CAA TAC	56	120
Smad1-f Smad1-r	TGA CCA GCT TGT TTT CAT TCA ATA GTG GTA GGG GTT GAT GCA	56	374
Smad2-f Smad2-r	CCC TTC AGT GCG ATG CTC A GAA TAC TAC GAC GGA GGA GCT GTT	56	74
Smad3-f Smad3-r	CAC GCA GAA CGT GAA CAC C GGC AGT AGA TAA CGT GAG GGA	56	101
Smad4-f Smad4-r	ACA GAG AAC ATT GGA TGG ACG A ACG GGC ATA GAT CAC ATG AGG	56	69
Smad7-f Smad7-r	GGC CGG ATC TCA GGC ATT C TTG GGT ATC TGG AGT AAG GAG G	56	152

f: forward, r: reverse

2.15 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml-, 0,5 ml-, 1,5 ml-, 2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf und Biozym
DakoCytomation Pen	Dako
Deckgläschen (Durchmesser 12 mm)	Menzel-Gläser
Mikropipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, Brand oder Sarstedt
Multiwellplatten (12 well, 24 well)	Falcon/Becton Dickinson
Objektträger	Roth
Pasteurpipetten, Glas	WU, Mainz
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Nunc oder Costar

Plastik-Küvetten (1,5 ml)	Brand
PVDF-Membran	Amersham
Röntgenfilme (<i>hyperfilm</i>)	Amersham
Spritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun
Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc oder Falcon/Becton Dickinson
Zellschaber	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/Becton Dickinson

2.16 Geräte

Biokular (Zellkultur)	Zeiss
Blot-Apparatur (<i>semi-dry</i>)	Harnischmacher
CO ₂ -Inkubator	Sanyo
Geldokumentations-Anlage	Intas
Neubauer Zählkammer	Assistent
PAGE-Kammer	Biorad
PCR-Cycler	Mastercycler, Eppendorf
	Mastercycler gradient, Eppendorf
	Mastercycler personal, Eppendorf
pH-Elektrode	Sentix 4.1, Wissenschaftlich- Technische Werkstätten, Weilheim
pH-Meter	pH 526, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim
Scanner	Epson Perfection 1240U, Epson
Spannungsquellen	Bio-Rad, Fisher Scientific
Steril-Werkbank, horizontal	hera guard, Heraeus
Steril-Werkbank	EN 12469, Clean Air
Tischzentrifuge	5415D, Eppendorf
Tischzentrifuge, kühlbar	5417R, Eppendorf
Ultraschallbad	Elma
UV/VIS-Photometer	Eppendorf
Zentrifuge (bis 50 ml)	5804R, Eppendorf

3 Methoden

3.1 Tierhaltung, Zuchtschema und Genotypisierung

Die Mäuse wurden in klimatisierten Räumen mit einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten und erhielten normales Maus-Zucht-Futter und Wasser ad libitum. Für die Analyse embryonaler Wildtyp- und *Tgf-β2^{-/-}*-Tiere wurden heterozygote Elterntiere über Nacht terminiert verpaart (*Tgf-β2^{+/-}* x *TGF-β2^{+/-}*). Der Morgen nach der Verpaarung wurde als E 0,5 definiert.

Die Tiere wurden im Einklang mit den Richtlinien des Tierschutzgesetzes gehalten und getötet. Die Tötung erfolgte nach einer CO₂-Narkotisierung durch zervikale Dislokation.

Zur Genotypisierung wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gewonnen (siehe 3.5.1). Die Genotypisierung erfolgte wie von Sanford et al. (1997) beschrieben: mit den Primerpaaren b2-3' und b2-neo wurde auf die neo-Kassette (im Ansatz 2B) und mit b2-3' und b2-5' wurde auf das Exon 6 des Wildtyps (im Ansatz 2A) getestet.

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden Standard-Ansätze verwendet (siehe 3.5.3).

Zur Amplifikation beider Ansätze diente folgendes Programm:

Initiale Denaturierung	3 Minuten	93 °C	} 35x
Denaturierung	30 Sekunden	93 °C	
Hybridisierung	1 Minute	56 °C	
Elongation	1 Minute	72 °C	
Finale Elongation	10 Minuten	72 °C	

Aus dem Bandenmuster der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Amplifikate wurde der Genotyp ermittelt. Für Wildtypen wurde nur das 132 bp-Fragment, für *Tgf-β2^{-/-}* nur das 1300 bp-Fragment (Ansatz 2A) beziehungsweise das 600 bp-Fragment (Ansatz 2B) amplifiziert. Für heterozygote Tiere ließen sich das Wildtyp- und das neo-Allel nachweisen.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zelllinie C2C12

C2C12-Zellen wurden in Proliferationsmedium (DMEM, 10 % FBS, 1x PSN) in unbeschichteten Zellkulturflaschen (75 cm²) gehalten. Aufgrund der hohen Proliferationsrate wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit warmen PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml 37 °C warmes Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) auf die Zellen gegeben, die daraufhin im Brutschrank für circa zwei Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde die Kulturflasche kräftig auf einer Oberfläche abgeklopft, die Zellsuspension

abgenommen und bei 1.000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in Proliferationsmedium aufgenommen und die Zellen wurden nach einer 1:8-Verdünnung erneut in Zellkulturflaschen ausgesät.

Sollten die Zellen zu Myotuben differenziert werden, so wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS auf Differenzierungsmedium (DMEM, 2 % HS, 1 % PSN) umgestellt. Nach zwei bis fünf Tagen konnte ein Verschmelzen der Myoblasten zu mehrkernigen, langgestreckten Myotuben festgestellt werden.

Zur Durchführung von immunzytochemischen Färbungen wurden die Zellen auf Kollagen-beschichteten Deckgläschen (s. u.) in einer Dichte von 4000 Zellen/80 µl Tropfen ausgesät. Nach etwa einer Stunde wurde auf 500 µl Medium aufgefüllt.

Für die Kollagen-Beschichtung wurden sterile Deckgläschen für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus Kollagen (1:100) in 0,1 % Essigsäure beschichtet. Die Kollagen-Lösung wurde abgenommen, die Deckgläschen wurden zweimal mit A. dest gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

3.2.2 Präparation und Kultivierung primärer hippokampaler Neurone

[nach Dotti, 1988, und Brewer, 1993]

Primäre Zellen wurden auf Poly-L-Ornithin/Laminin-beschichteten Deckgläsern ausplattiert. Für die Beschichtung wurden 12 mm-Deckgläser durch Backen für drei Stunden bei 180 °C sterilisiert, in 24-well-Platten ausgelegt und am Tag vor der Präparation mit 500 µl Poly-L-Ornithin-Lösung (0,1 mg/ml in Aqua dest.) bedeckt. Nach einer Stunde wurden sie zweimal mit Wasser gewaschen, über Nacht mit 500 µl Laminin-Lösung (1:1.000 in DMEM) bedeckt und bis zur Verwendung im Brutschrank bei 37 °C aufbewahrt. Kurz vor Aussaat der Zellen wurden die Deckgläser zweimal mit DMEM gewaschen und dann feucht verwendet.

Die Neurone wurden aus den Hippokampi embryonaler Mäuse (E 17,5) isoliert (Dotti et al., 1988). Dazu wurde der Schädel embryonaler Mäuse von dorsal aus eröffnet, die Hippokampi herauspräpariert und sofort in eiskaltem CMF ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freies Medium) gesammelt. Nach einer Zentrifugation (fünf Minuten bei 1.000 rpm, RT) erfolgte ein enzymatischer Verdau der Hippokampi mit 750 µl 0,05 % Trypsin für zehn Minuten bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 450 µl FBS beendet. Die Suspension wurde mit Kulturmedium (siehe unten) auf 2 ml aufgefüllt und es erfolgte zunächst eine grobe mechanische Zerkleinerung mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette (Durchmesser der Öffnung = 3 mm), dann eine feine Trituration mit einer silikonisierten Pasteur-Pipette mit kleinerer Öffnung (Durchmesser = 1 mm). Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (zehn Minuten bei 1.000 rpm, RT) und in 2 ml Kulturmedium resuspendiert. Bei der Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer wurden durch die Trypanblau-Ausschluß-Methode nur vitale Zellen gezählt.

Für die Experimente zur Bestimmung von Synapsenanzahl und -größe wurden die Zellen in einer Dichte von 25.000 Zellen/Deckglas beziehungsweise 220 Zellen/mm² ausgesät. Für die Gewinnung von RNA wurden die Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen/Deckglas beziehungsweise 880 Zellen/mm² und für die Gewinnung von Protein-Extrakt in einer Dichte von 800.000 Zellen/2 cm Kulturschale beziehungsweise 640 Zellen/mm² ausgesät. Bei der Aussaat wurde dem Kulturmedium 25 µM Glutamat zugefügt.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchte in serumfreiem, B27-supplimentiertem Neurobasal-Medium (NB-Medium) kultiviert, dem zusätzlich 0,5 mM Glutamin, 1 mg/ml apo-Transferrin, 1,25 mg/ml Glutathion, 1 mg/ml SOD, 1x B27 und 1x Penicillin/Streptomycin/Neomycin zugesetzt wurden (Brewer et al., 1993). Das Medium wurde ab Tag *in vitro* (DIV) 5 alle drei Tage zur Hälfte erneuert, dabei wurde jeweils 2 mM AraC zugesetzt um das Wachstum nicht-neuronaler Zellen zu inhibieren.

Wenn die Neurone mit TGF-β1 beziehungsweise anti-TGF-β(1,2,3) behandelt wurden, so erfolgte dies an DIV 2 ohne Mediumwechsel, an DIV 5, 8 und 11 jeweils mit dem Mediumwechsel.

Alle Experimente wurden – soweit nicht anders angegeben – an DIV 10 durchgeführt.

3.3 Histologische und zytochemische Methoden

3.3.1 Fixierung und immunzytochemische Darstellung primärer Zellen

Synaptische Proteine

Für die Darstellung von synaptischen Proteinen wurde das Medium von kultivierten Zellen abgenommen und die Zellen wurden mit 4 % PFA (Paraformaldehyd) für zehn Minuten bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal kurz mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungen durch eine 30-minütige Inkubation mit 5 % NGS/PBS blockiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper, der in 5 % NGS/PBS verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C (anti-vGlut1 1:10.000, anti-gephyrin 1:1.000). Nach fünfmaligem Waschen in PBS wurde mit dem Zweit-Antikörper (anti-Kaninchen 1:500; anti-Meerschweinchen 1:200; verdünnt in PBS) und DAPI (1:1.000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut fünfmal mit PBS gewaschen, dann wurde das Deckglas mit Fluomount-Medium eingedeckt.

TβRII und Golgi-58k

Für die Darstellung des TβRII und des Golgi-Markers (Golgi-58k) wurde das Medium von kultivierten Zellen abgenommen und sie wurden mit Methanol für zehn Minuten bei -20 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal kurz mit PBS gewaschen und mit Aceton für zehn Minuten bei -20 °C permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch eine 30-minütige Inkubation mit 10 % NGS/PBS blockiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper,

der in 10 % NGS/PBS verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C (anti-T β RII 1:200 und anti-Golgi-58k 1:50). Nach fünfmaligem Waschen in PBS wurde mit dem Zweit-Antikörper (anti-Maus und anti-Kaninchen 1:500; verdünnt in PBS) und DAPI (1:1.000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut fünfmal mit PBS gewaschen, dann wurde das Deckglas mit Fluomount-Medium eingedeckt.

3.3.2 Fixierung und immunzytochemische Darstellung von C2C12-Zellen

Smad1,2,3

Zur Darstellung der Smad-Translokation nach Gabe von TGF- β 1 wurde das Medium von kultivierten Zellen abgenommen und sie wurden mit 4 % PFA für zehn Minuten bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal kurz mit PBS gewaschen und mit Aceton für zehn Minuten bei -20 °C permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch eine zweistündige Inkubation mit 10 % NGS/PBS blockiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper, der in 10 % NGS/PBS verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C (anti-smad1,2,3 1:100). Nach fünfmaligem Waschen in PBS wurde mit dem Zweit-Antikörper (anti-Maus 1:500; verdünnt in PBS) und DAPI (1:1.000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut fünfmal mit PBS gewaschen, dann wurde das Deckglas mit Fluomount-Medium eingedeckt.

MF20 und α -BTX

Für die Darstellung des Differenzierungsmarkers MF20 und von α -BTX wurde das Medium von kultivierten Zellen abgenommen und sie wurden mit 4 % PFA für zehn Minuten bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden die Zellen fünfmal kurz mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch eine 30-minütige Inkubation mit ADS plus 0,3 % Triton-X blockiert. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper, der in der Blocklösung verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C (anti-MF20 1:50). Nach fünfmaligem Waschen in PBS wurde mit dem Zweit-Antikörper (anti-Maus; verdünnt in PBS), sowie mit α -BTX (1:500) und DAPI (1:1.000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut fünfmal mit PBS gewaschen, dann wurde das Deckglas mit Fluomount-Medium eingedeckt.

3.3.3 *whole-mount*-Präparation und immunhistochemische Darstellung des Zwerchfells

Zur Präparation des Zwerchfells wurde der Bauchraum der Maus-Embryonen eröffnet, und alle sich über dem Brustkorb befindlichen Muskelschichten wurden entfernt. Das Zwerchfell wurde mitsamt der unteren zwei bis drei Rippen präpariert, indem diese beginnend am

Sternum um den Körper herum abgetrennt wurden. Das Zwerchfell wurde in kaltem PBS gewaschen, anschließend wurden mit einem Skalpell die Rippen sowie die Wirbelsäule abgetrennt. Das Zwerchfell wurde zwischen zwei Glas-Objektträgern in 4 % PFA für eine Stunde bei 4 °C fixiert.

Neurofilament 150 kD (NF 150 kD), S100, *smooth muscle*-Aktin und α -Bungarotoxin

Nach der Fixierung wurden die Zwerchfelle dreimal für je 15 Minuten in PBS gewaschen, dann wurden sie für eine Stunde in 0,5 % Triton/PBS permeabilisiert und für drei Stunden in ADS/0,5% Triton geblockt. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur (anti-Neurofilament 150 kD 1:500; anti-S100 1:500; anti-*smooth muscle*-Aktin 1:500; alle verdünnt in Blocklösung). Nach dreimaligem Waschen für je 15 Minuten in PBS wurde mit dem Zweit-Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG-Cy3 bzw. Ziege-anti-Maus IgG-Cy3 1:500; verdünnt in ADS) sowie Alexa Fluor 488-gekoppeltem α -Bungarotoxin (α -BTX 1:500, Verdünnung in ADS) und DAPI (1:1.000) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde das Gewebe erneut dreimal für 15 Minuten in PBS gewaschen und mit Fluomount-Medium eingedeckt.

Zur Auswertung wurden Übersichtsaufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop sowie z-Bildstapel mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen.

Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung des Zwerchfells

Für eine histologische Darstellung wurde das Zwerchfell embryonaler Mäuse wie oben beschrieben präpariert, jedoch nicht von den Rippen abgelöst. Anschließend wurde das Gewebe für fünf Stunden in Bouin-Lösung fixiert. Es erfolgte eine Entwässerung mittels einer Alkohol-Reihe (dreimal zehn Minuten, über Nacht und einmal zehn Minuten 70 % Ethanol, viermal 30 Minuten 80 % Ethanol, zweimal 30 Minuten 96 % Ethanol, zweimal 45 Minuten 100 % Ethanol, 60 Minuten 1:1 Ethanol:Aceton). Zuletzt wurde das Gewebe in Aceton (zweimal 30 Minuten) und schließlich in flüssigem Paraffin (zweimal zehn Minuten, einmal 90 Minuten) aufgenommen und abschließend in Paraffin eingebettet.

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Microtom (2050, Reichert Jung) in 10 μ m dicke Schnitte geschnitten, die konsekutiv auf mit Eiweiß-Glycerin überzogene Glas-Objektträger aufgezogen wurden.

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkohol-Reihe (viermal Xylol, zweimal 100 % Isopropanol, zweimal 96 % Isopropanol, 90 % Isopropanol, 80 % Isopropanol, 70 % Isopropanol, 50 % Isopropanol; jeweils fünf Minuten) entparaffiniert. Nach einem kurzen Bad in Aqua dest. wurden die Schnitte in Meyers Hämalaun-Lösung überführt und nach circa acht Minuten für etwa vier Minuten in fließendem Leitungswasser

gebläut. Nach einem kurzen Bad in A. dest erfolgte die Gegenfärbung in Eosin für fünf Minuten. Mittels einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (70 % Ethanol, 80 % Ethanol, 90 % Ethanol, zweimal 100 % Ethanol; jeweils fünf Minuten) wurde die Färbung anschließend differenziert und dem Gewebe gleichzeitig Wasser entzogen. Nach vier fünfminütigen Bädern in Xylol wurde mit Entellan eingedeckt.

3.3.4 Histologische und immunhistochemische Darstellung des Gehirns

Nach Entnahme der Embryonen aus dem Uterus wurden diese immobilisiert und zunächst mit circa 3-5 ml 0,9 %iger Salzlösung, dann mit 15-20 ml 4 % PFA (in 0,1 M Phosphatpuffer) transkardial perfundiert.

Die Gehirne wurden entnommen und für eine Stunde in 4 % PFA nachfixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Gehirne bei Raumtemperatur in 10 %-, 20 %- und 30 %iger Saccharose-Lösung (in 0,1 M Phosphatpuffer) inkubiert bis sie jeweils die gleiche Dichte wie die Lösung hatten. Anschließend wurden sie in Kryomedium eingebettet und aufgefroren. Die Blöcke wurden bis zur Weiterverwendung bei -80 °C aufbewahrt und dann mit einem Kryostat (HM 560, Microm) bei -20 °C in 14 µm-dicke Schnitte geschnitten, die aufeinander folgend in den Gruppen A-E auf Superfrost-Glasobjektträgern gesammelt wurden.

Alle Schnitte der Gruppe A wurden nach Nissl gefärbt. Diese Färbung diente einerseits zur Beurteilung der Hirnstruktur, andererseits wurden anhand dieser Schnitte dann Schnitte der Gruppen B, C, D und E ausgewählt, um damit spezifische Antikörperfärbungen durchzuführen.

Für die Nissl-Färbung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur in 0,1 M Phosphatpuffer aufgetaut und dreimal für zehn Minuten gewaschen. Nach einem kurzen Bad in Aqua dest. wurden die Schnitte in Kresylviolett überführt und nach zwei bis fünf Minuten für fünf bis zehn Minuten in Leitungswasser gebläut. Mittels einer aufsteigenden Alkohol-Reihe (50 % Ethanol, 70 % Ethanol, 80 % Ethanol, 90 % Ethanol, zweimal 100 % Ethanol; jeweils fünf Minuten) wurde die Färbung anschließend differenziert und dem Gewebe gleichzeitig Wasser entzogen. Nach vier fünfminütigen Bädern in Xylol wurde mit Entellan eingedeckt.

Für die Darstellung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die Schnitte ebenfalls in 0,1 M Phosphatpuffer aufgetaut und dreimal für zehn Minuten gewaschen.

Die Färbung mit den Antikörpern für synaptische Proteine sowie für NF 150 kD (1:500) erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bereits für fixierte Zellen beschrieben. Allerdings wurde der Blocklösung 0,1 % Triton-X zugesetzt.

3.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Aufnahmen von fluoreszierenden Antikörper-Markierungen wurden mit einem Mikroskop (Nikon eclipse E600) mit angeschlossener Digitalkamera (AxiCam, Zeiss) bei verschiedenen

Vergrößerungen gemacht. Die Anregungs (Ex)- und Emissionswellenlängen (BA) betrugen für den DAPI-Filter: Ex 340-380, BA 435-485, für den FITC-Filter: Ex 465-495, BA 515-555 und für den Cy3-Filter: 510-560, BA 590 (alle Angaben in nm).

Für quantitative Analysen von Signalen unter verschiedenen Bedingungen wurde bei der Bildaufnahme die Belichtungszeit konstant gehalten.

Die Bilder wurden entweder mit der Software Adobe Photoshop digital übereinander gelegt oder für eine Quantifizierung in die Software AnalySIS (Soft-Imaging Systems) importiert. Zur Quantifizierung von Synapsenanzahl und -größe wurde der Schwellenwert (*threshold*) für jedes Bild manuell eingestellt. Das Bild wurde binarisiert und es wurde eine Partikelanalyse durchgeführt um die Anzahl sowie die Größe der Partikel zu bestimmen.

3.3.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für die Dokumentation der immunhistochemischen Darstellungen der Zwerchfelle wurden aufgrund der Gewebsdicke mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DM IRE2 mit He/Ar-Laser) z-Bildstapel aufgenommen.

Für jedes Fluochrom wurde zunächst die Laserintensität (Anregung für FITC bei 488 nm, Anregung für Cy3 bei 543 nm) und die Verstärkung des PMTs (Emission für FITC 500-530 nm, für Cy3 bei 555-700 nm) eingestellt. Die Größe des *pinholes* wurde auf 80 µm gesetzt. Diese Parameter wurden für die Aufnahmen von Zwerchfellen von Tieren aus einem Wurf konstant gehalten.

Die z-Bildstapel wurden bei verschiedenen Vergrößerungen (200x, 400x und 630x; Auflösung von 1024 x 1024 Pixel) im Abstand von 2 µm gemacht. Die beiden Fluorochrome wurden sequenziell im so genannten „between lines“-Verfahren aufgenommen, bei dem nach jeder gescannten Pixel-Linie zwischen den Parameter-Einstellungen der beiden Fluorochrome gewechselt wird. Anschließend wurden die Bilder in einer Maximal-Projektion zusammengefügt.

Für die Analyse der synaptischen Marker in Hirnschnitten wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop z-Bildstapel bei 630facher Vergrößerung und Zoom-Faktor 2 aufgenommen. Für jedes Fluorochrom wurde zunächst die Laserintensität (Anregung für FITC bei 488 nm, Anregung für Rhodamin/Cy3 bei 543 nm) und die Verstärkung des PMTs (Emission für FITC 500-530 nm, für Rhodamin/Cy3 bei 555-700 nm) eingestellt. Diese Parameter wurden für die Aufnahmen von Hirnschnitten von Tieren aus einem Wurf konstant gehalten. Die Größe des *pinholes* wurde auf 120 µm gesetzt.

Es wurde eine Fläche von 120 x 120 µm bei einer Auflösung von 2048 x 2048 Pixeln aufgenommen. Die Aufnahme lag dabei etwa 5-8 µm entfernt von der Schnittoberfläche um Schnitt-Artefakte zu vermeiden. Die beiden Fluorochrome wurden sequenziell im so

genannten „between frames“-Verfahren aufgenommen, bei dem bei der Aufnahme von zwei verschiedenen Fluorochromen zunächst ein vollständiges Bild mit den jeweiligen Parameter-Einstellungen eines Fluochroms aufgenommen wurde, bevor das zweite Bild mit seinen Einstellungen aufgenommen wurde.

Die Hirnschnitte wurden geblindet (d.h. ohne Kenntnis des Genotyps) fotografiert und die erhaltenen Daten ebenfalls geblindet ausgewertet.

Die Bilddaten wurden in die Software ImageJ importiert und ausgewertet. Dazu wurde für jedes einzelne Bild zunächst manuell der *threshold* festgelegt. Das farbige Bild wurde binarisiert und anschließend wurde eine Partikelanalyse durchgeführt um die Anzahl und Größe der Partikel zu bestimmen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Zellaufschluss

Um kultivierte Zellen zu lysieren, wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und dann in PBS mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in einer der Pelletgröße entsprechenden Menge NP40-Puffer (25-100 µl), dem Proteinase-Inhibitor (1:25) zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Zellen wurden durch dreimaliges Beschallen mit Ultraschall (Ultraschallbad, Elma) für jeweils fünf Minuten aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm von Debris befreit. Dann wurde die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

[nach Bradford, 1976]

Die Konzentration einer proteinhaltigen Lösung wurde nach der Bradford-Methode bestimmt, bei der die Farbverschiebung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 nach der Bindung an Proteine gemessen wird (Bradford, 1976). Dazu wurde die verdünnte Proteinlösung mit dem *Protein Assay Dye Reagent* (Bio-Rad) versetzt und nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur die Absorption bei 595 nm mittels eines UV/VIS-Photometers (Bio Photometer, Eppendorf) gemessen. Die Konzentration der Proteinlösung wurde anhand einer mitgeführten BSA-Standardreihe bestimmt.

3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

[nach Laemmli, 1970]

Für die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekular-Gewichtes wurden Polyacrylamidgele verwendet (Radikalstarter für die Polymerisationsreaktion von Acrylamid waren TEMED und APS) (Laemmli, 1970).

Die Proteinlösung (20-30 µg Protein) wurde in einem Ansatz mit Dithiothreitol, Wasser und NuPage-Puffer versetzt, für zehn Minuten bei 70 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Unter einer Spannung von 70 V durchliefen die Proteine zunächst das Sammelgel (5 %), dann das Trenngel (10 %) bei einer Spannung von 150 V. Unter denaturierenden Bedingungen (SDS in Sammel- beziehungsweise Trenngelpuffer) wurden sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

3.4.4 Transfer und immunologischer Nachweis von Proteinen auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (Western Blotting)

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in einer Semidry-Blot-Apparatur auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen übertragen. Dazu wurden in Transferpuffer angefeuchtete Whatman-Papiere, die zuvor für eine Minute in 100 % Methanol aktivierte PVDF-Membran und das Gel übereinandergeschichtet und die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 4 mA/cm² für 1,5-2 Stunden übertragen.

Nach dem Transfer der Proteine wurden die PVDF-Membranen für zehn Minuten in PBS-T oder TBS-T gewaschen. Dann wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockpuffer für zwei bis drei Stunden abgesättigt (für phospho-Smad2: 5 % Magermilchpulver plus 0,1 % Tween-20 in TBS; für phospho-Synapsin: 5 % BSA plus 0,1 % Tween-20 in TBS; für GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase): 5 % Magermilchpulver plus 0,05 % Tween-20 in PBS).

Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (anti-phospho-Smad2 1:1.000; anti-phospho-Synapsin(Ser9) 1:1.000; anti-GAPDH 1:10.000; verdünnt in der jeweiligen Blocklösung) über Nacht bei 4 °C. Die Membranen wurden dann dreimal für 15 Minuten mit PBS-T oder TBS-T gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Zweit-Antikörper inkubiert (anti-Maus-HRP 1:10.000 oder anti-Kaninchen-HRP 1:10.000, verdünnt in PBS-T oder TBS-T). Nachdem wieder dreimal für 15 Minuten mit PBS-T oder TBS-T gewaschen wurde, erfolgte die Signaldetektion mit der verstärkten Chemilumineszenz (ECL)-Methode. Die Membranen wurden dazu für eine Minute in einer 1:1-Mischung der beiden ECL-Lösungen inkubiert. Entsprechend der Signalstärke wurden dann Röntgenfilme für Zeiträume von zehn Sekunden bis 30 Minuten belichtet. Die Röntgenfilme wurden entwickelt und fixiert und nach Trocknung mit einem Flachbett-Scanner (Epson) eingelesen.

Um auf den Membranen andere Proteine mit einem weiteren Antikörper nachzuweisen, wurde der zuvor gebundene Antikörper durch einstündige Inkubation (Raumtemperatur) in *Stripping*-Puffer entfernt. Die Membranen wurden dann dreimal für zehn Minuten in PBS-T gewaschen, dann erfolgten das Blocken und das Inkubieren mit den Antikörpern wie oben beschrieben.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung von genomischer DNA

Für die Genotypisierung der analysierten Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Dazu wurde das DNA Midi Kit der Firma Quiagen entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Gewebeproben wurden in Lysispuffer und Proteinase K über Nacht bei 56 °C inkubiert und anschließend über eine alkalische Lyse weiter aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde dann über Säulen gereinigt und die genomische DNA schließlich in Puffer eluiert.

3.5.2 Isolierung, Konzentrationsbestimmung und reverse Transkription von *messenger*RNA

Zur Isolierung von *messenger* RNA (mRNA) aus hippokampalen Neuronenkulturen wurde das RNeasy-Kit der Firma Qiagen entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium verworfen, dann wurden die Zellen in RLT-Lysis Puffer lysiert und der Zellextrakt über Säulen aufgereinigt. Dies beinhaltet einen DNaseI-Verdau mit einem DNaseI-Kit der Firma Qiagen. Zur Konzentrationsbestimmung einer RNA-Lösung wurde die Absorption einer in A. dest verdünnten RNA-Lösung bei 260 nm mit Hilfe eines UV/VIS-Photometers (Bio Photometer, Eppendorf) bestimmt.

Zur Untersuchung der Expressionslevel von mRNA wurde je 1 µg der isolierten RNA zu cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt und zunächst für zehn Minuten bei 70 °C linearisiert. Dann wurde folgender Ansatz hinzupipettiert, durch den RNA durch die reverse Transkriptase zu *copy*DNA (cDNA) umgeschrieben wurde:

RT-Mastermix	2 µl	Puffer
	2 µl	10 mM dNTPs
	1 µl	RNase Inhibitor
	1 µl	oligo dT-Primer
	1 µl	H ₂ O
	1 µl	Reverse Transkriptase

Der Mix wurde für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend bei 72 °C für fünf Minuten inaktiviert.

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA

Für die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte wurden entweder 2 µl genomische DNA oder 1 µl cDNA eingesetzt und mit einem entsprechenden Mastermix vermischt. Für einen 25 µl-Ansatz wurde folgender Mastermix verwendet:

PCR-Mastermix Standard	ad 25 µl	A. dest
	2,5 µl	10x PCR-Puffer (ohne Mg ²⁺)
	0,5 µl	50 mM MgCl
	0,5 µl	10 mM dNTPs
	1 µl	Primer <i>forward</i> (10 µM)
	1 µl	Primer <i>reverse</i> (10 µM)
	0,25 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Zur Amplifikation der jeweiligen Ansätze diente folgendes Programm:

Initiale Denaturierung	3 Minuten	93 °C	
Denaturierung	0,5-1,5 Minuten	93 °C	} 25-40x
Hybridisierung	0,5-1 Minuten	X °C (s. u.)	
Elongation	0,5-1,5 Minuten	72 °C	
Finale Elongation	10 Minuten	72 °C	

Die Hybridisierungs-Temperatur (T_m) wurde nach der Faustregel $T_m = 4 \cdot (C+G) + 2 \cdot (A+T)$ berechnet, wobei C, G, A und T die Anzahl der jeweiligen Basen ist, oder mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt. Je nach Fragmentgröße wurden die Zeiten für Denaturierung, Hybridisierung und Elongation angepasst. Die Zyklenzahl wurde der Expressionsstärke des Gens angepasst.

3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

PCR-Produkte wurden zur Auftrennung nach ihrer Größe mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und je nach erwarteter Fragmentgröße auf 2 oder 3 %ige (w/v) Agarose-Gele (in 1x TAE-Puffer) mit 0,005 % Ethidiumbromid aufgetragen. Die Fragmente wurden bei einer Spannung von 100-120 V aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Fragmentbanden wurden in einer Geldokumentations-Anlage (Intas) durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera fotografiert.

3.6 Funktionelle Untersuchungen

3.6.1 Aufzeichnung der Atemtätigkeit

Die Atemtätigkeit von Embryonen am E 18,5 wurde mittels Ganzkörper-Plethysmografie aufgezeichnet. Dazu wurden die Tiere in eine verschließbare 15 ml-Kammer verbracht, die an einen differentiellen Druck-Wandler (CD15 Carrier Demodulator, Validyne) angeschlossen war. Das analoge Signal der durch die Atemtätigkeit hervorgerufenen Druckschwankungen wurde verstärkt und durch einen A/D-Wandler (DigiData 3200, Axon Instruments) in ein digitales Signal umgewandelt, das mit Hilfe der Clampfit-Software (Axon Instruments) aufgezeichnet wurde.

3.6.2 Elektrophysiologische Ableitungen in akuten Hirnschnitten des Hirnstamms (in Kollaboration mit V. Sargsyan)

Die Gehirne embryonaler Mäuse (E 18,5) wurden entnommen und sofort in begaste Badlösung überführt. Die Badlösung bestand aus 188 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1 mM NaHPO₄, 5 mM Glukose (pH 7,4) und wurde bei einer Temperatur von 28-30 °C mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast. Mit einem Vibratom (Campton Instruments) wurden 200 µm dicke akute Schnitte der ventralen Medulla hergestellt, die den PreBötC und den Nkl. hypoglossus enthielten. Die Schnitte wurden bis zur Durchführung des Experiments in Badlösung aufbewahrt.

Zur Analyse der spontanen Aktivität des Schnitt-Präparats wurden spontane postsynaptische Ströme aufgezeichnet. Diese wurden von den Neuronen des PreBötC unter Verwendung von *patch-clamp*-Elektroden unter einer Spannungs-Klemme (-70 mV, Ganzzell-Modus) abgeleitet. Spontane GABAerge/glyzinerge und glutamaterge Ströme wurden durch Applikation von 10 µM CNQX oder 1 µM Strychnin beziehungsweise 1 µM Bicucullin isoliert gemessen. Aufzeichnungen von spontanen Miniatur-Strömen wurden in Anwesenheit von 0,5 µM Tetrodotoxin durchgeführt.

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden von Vardanush Sargsyan (Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen) durchgeführt.

3.7 Statistische Auswertung

In allen Untersuchungen wurden Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten beziehungsweise von mindestens drei verschiedenen Tieren ($n \geq 3$) erhoben. Dabei wurden innerhalb eines Experimentes die Einzelwerte mehrfach und geblindet bestimmt und als Mittelwert zusammengefasst. Diese Werte wurden zur statistischen Prüfung in die GraphPad Prism-Software importiert. Es wurde eine Normalverteilung der Stichproben angenommen und die Werte der Gruppen Wildtyp vs. *Tgf- β 2*^{-/-} beziehungsweise Kontrolle vs. Behandlung wurden mit einem zwei-seitigen Student t-Test auf Signifikanz geprüft ($P < 0,05$ signifikant, $P > 0,05$ nicht signifikant (n.s.)). Alle Werte sind in grafischen Darstellungen als Mittelwert \pm SEM (*standard error of the mean*) wiedergegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Genotypisierung der analysierten *Tgf-β2^{+/+}*-, *Tgf-β2^{+/-}*- und *Tgf-β2^{-/-}*-Tiere

Da in der vorliegenden Arbeit die Rolle von TGF-β2 in der Synaptogenese untersucht wurde, wurden embryonale TGF-β2-defiziente Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern untersucht, die aus der Verpaarung von heterozygoten Elterntieren gewonnen wurden (Sanford et al., 1997). Von allen analysierten Embryonen wurde aus einer Schwanzbiopsie genomische DNA zur Genotypisierung gewonnen. Mittels spezifischer Primer wurden Fragmente aus dem Wildtyp-Exon 6 (132 bp im Ansatz 2A) oder der in Exon 6 eingeführten neo-Kassette (im Ansatz β2A 1300 bp, im Ansatz 2B 600 bp) amplifiziert. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 3 dargestellt und die Verteilung der Genotypen aller analysierten Tiere ist in Tab. 3 zusammengefasst. Diese Aufstellung zeigt, dass TGF-β2-defiziente Tiere nicht entsprechend des Mendel'schen Verhältnisses erhalten wurden. Dafür waren *Tgf-β2^{+/-}*- und Wildtyp-Embryonen leicht überrepräsentiert.

4.2 Phänotyp und Respirationsverhalten der *Tgf-β2^{-/-}*-Embryonen

Die TGF-β2-defizienten Mäuse sterben wenige Minuten nach der Geburt (Sanford et al., 1997). Alle Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden daher in embryonalen Stadien (E 14,5 oder E 18,5) durchgeführt.

Tgf-β2^{-/-}-Tiere waren kleiner als ihre Wildtyp- beziehungsweise heterozygoten Geschwistertiere. In einigen Fällen wiesen sie subkutane Einblutungen auf.

Für einige Würfe wurde vor der Präparation das Gewicht der Tiere am E 18,5 bestimmt. In Übereinstimmung mit Sanford et al. (1997) zeigte sich, dass *Tgf-β2^{-/-}*-Embryonen am E 18,5 signifikant weniger (-19 %) als ihre Wildtyp-Geschwister wogen (*Tgf-β2^{+/+}*: 1.181 ± 40 mg, n = 8; *Tgf-β2^{+/-}*: 1.166 mg ± 24 mg, n = 22 und *Tgf-β2^{-/-}*: 953 mg ± 19 mg, n = 7; *P* < 0,001, Student t-Test; siehe Abb. 4).

Die äußere Erscheinung von *Tgf-β2^{-/-}*-Tieren war vergleichbar mit der der Wildtypen, jedoch war stets eine gekrümmte Haltung (siehe Abb. 5 A, B) und keine Eigenbewegung zu beobachten, obwohl die TGF-β2-defizienten Tiere responsiv auf mechanische Stimulation waren und einen Herzschlag aufwiesen. Bei allen analysierten *Tgf-β2^{-/-}*-Tieren war eine Fehlbildung des Sternums und ein Defekt in der Brustkorbschließung zu beobachten (siehe Abb. 5 D). Dieser Phänotyp ließ sich nie bei Wildtypen oder heterozygoten Tiere beobachten.

Zusätzlich kam es zu einer Verwachsung des Zwerchfells mit der darunter liegenden Leber. Sanford und Mitarbeiter (1997) beschreiben, dass sich der Phänotyp von *Tgf-β2^{+/-}*-Tieren nicht von dem ihrer Wildtyp-Geschwister unterscheidet. In der vorliegenden Arbeit konnten

ebenfalls keine Unterschiede zwischen Wildtypen und heterozygoten Tieren gefunden werden. In allen folgenden Untersuchungen wurden daher stets *Tgf-β2*^{-/-}-Tiere mit Wildtypen verglichen. In den funktionellen Untersuchungen (dieser Abschnitt und 4.5.1) wurden heterozygote Tiere und Wildtypen in einer Kontroll-Gruppe zusammengefasst.

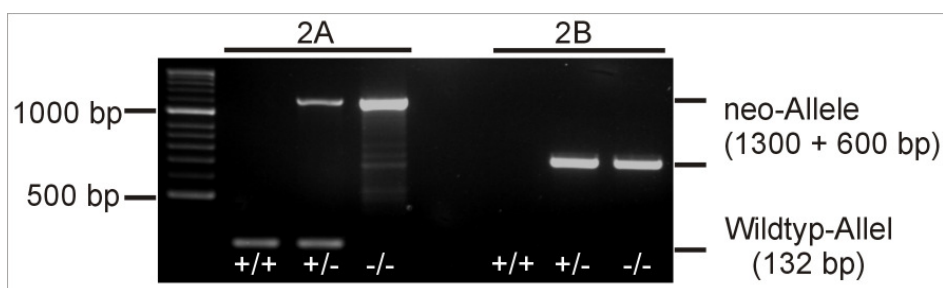


Abb. 3 Repräsentatives Ergebnis einer Genotypisierung für *Tgf-β2*^{+/+}-, *Tgf-β2*^{+/-}- und *Tgf-β2*^{-/-}-Tiere.

Für Wildtypen wurde nur das 132 bp-Fragment, für *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen nur das 1300 bp-Fragment (Ansatz 2A) beziehungsweise das 600 bp-Fragment (Ansatz 2B) amplifiziert. Für heterozygote Tiere ließen sich Wildtyp- und neo-Allel nachweisen.

Tab. 3 Übersicht über die Genotypen aller analysierten *Tgf-β2*^{+/+}-, *Tgf-β2*^{+/-}- und *Tgf-β2*^{-/-}-Tiere.

Genotyp	E 14,5 (in %)	E 18,5 (in %)	Gesamt (in %) E 14,5/ E 15,5/ E 16,5/ E 18,5	theoretisch nach Mendel (in %)
<i>Tgf-β2</i> ^{+/+}	3 (20)	87 (27)	111 (29)	97 (25)
<i>Tgf-β2</i> ^{+/-}	6 (40)	189 (58)	215 (56)	193 (50)
<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	4 (27)	41 (14)	49 (13)	97 (25)
gesamt	15 (100)	326 (100)	386 (100)	386 (100)
tote Embryonen	-	9 (2)	9 (2)	-
unbestimmt	2 (13)	-	2 (1)	-

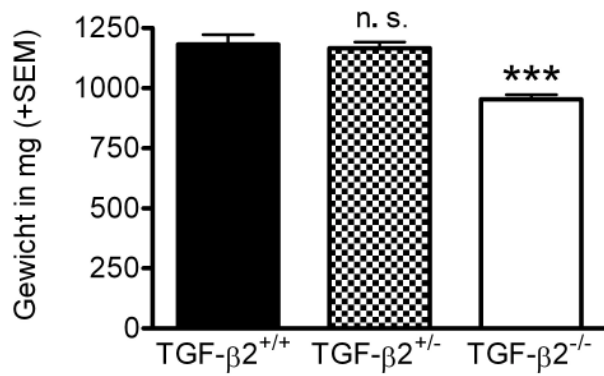


Abb. 4 **Gewicht der TGF-β2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5.**

Das Gewicht von *Tgf-β2*^{+/-}-Embryonen und *Tgf-β2*^{+/+}-Embryonen war vergleichbar. *Tgf-β2*^{-/-}-Tiere waren am E 18,5 signifikant 19 % leichter als ihre Wildtyp-Geschwister.

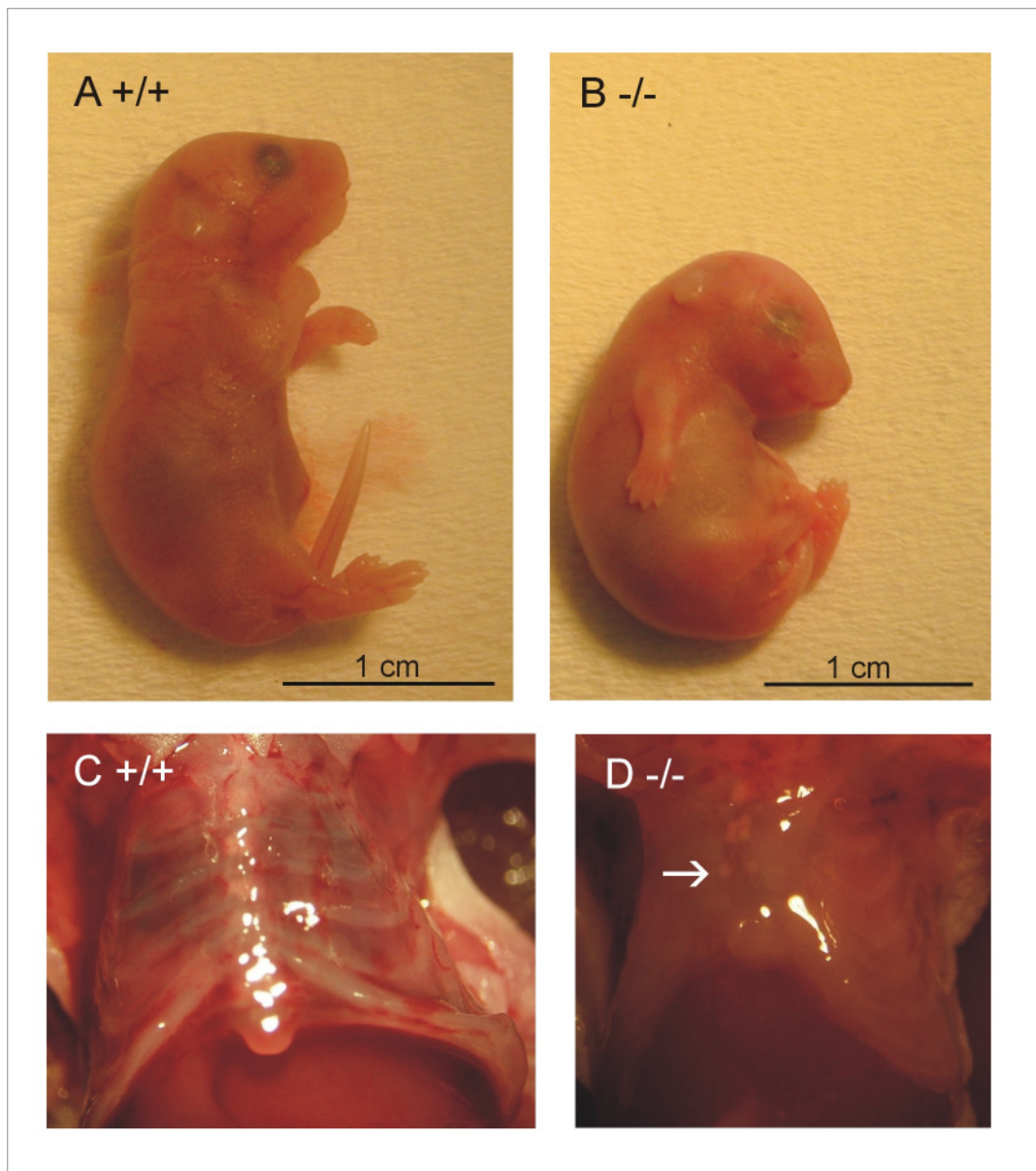


Abb. 5 **Phänotyp von Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen am Embryonaltag 18,5.**

(A, B) *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen (B) wiesen im Vergleich zum Wildtyp (A) eine gekrümmte Haltung, keine Eigenbewegung und keine Atemtätigkeit auf.

(C, D) Das Sternum von *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen war nicht vollständig ausgebildet (→). Aufgrund dieses Phänotyps, der eine Penetranz von 100 % aufwies, konnten TGF-β2-defiziente Embryonen eindeutig identifiziert werden.

Um das Respirationsverhalten von Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen am E 18,5 näher zu untersuchen, wurde mittels einer Ganzkörper-Plethysmografie die Atemtätigkeit aufgezeichnet. Dazu wurden die Embryonen in eine geschlossene Kammer verbracht, die an ein hoch-sensitives Barometer angeschlossen war, sodass Atemzüge als Druckschwankungen aufgezeichnet werden konnten. Bevor die Embryonen in die Kammer verbracht wurden, wurde durch Auslösen einer Bewegung durch mechanische Stimulation stets überprüft, ob sie noch am Leben waren.

Das Respirationsverhalten der Embryonen wurde über 3 Minuten aufgezeichnet.

In Abb. 6 sind repräsentative Aufzeichnungen der Atemtätigkeit von Kontroll-Tieren und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen dargestellt. Zwölf der 22 untersuchten Kontroll-Tiere wiesen regelmässige Atemzüge und damit eine rhythmische Atemtätigkeit auf (Abb. 6 A), während die anderen zehn Kontroll-Tiere eine unregelmäßigere Respiration zeigten. In den TGF- β 2-defizienten Tieren wurden bei 3 von 3 Tieren keine regelmäßigen Atemzüge beobachtet (Abb. 6 B). TGF- β 2-defiziente Tiere zeigten daher einen vollständigen Verlust jeglicher respiratorischer Aktivität.

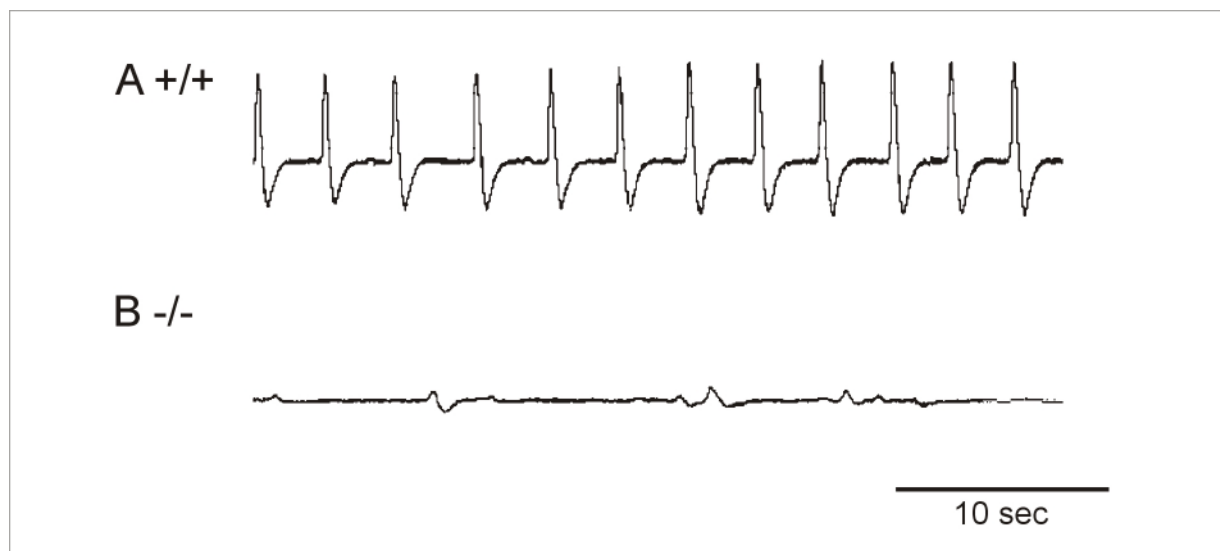


Abb. 6 Repräsentatives Respirationsverhalten von Wildtyp und *Tgf- β 2^{-/-}* am Embryonaltag 18,5.

Die respiratorische Aktivität der Embryonen wurde mittels Ganzkörper-Plethysmografie aufgezeichnet.

(A) 12/22 Kontroll-Tieren zeigten eine rhythmische Atemaktivität mit regelmässigem Ein- und Ausatmen.

(B) Bei allen untersuchten TGF- β 2-defizienten Embryonen wurde keine Atemtätigkeit beobachtet. Die geringen Druckschwankungen stellen keine Atemzüge dar.

4.3 Struktur und Organisation des Zwerchfell-Muskels von TGF- β 2-defizienten Embryonen

Die Untersuchungen zur Synaptogenese im peripheren Nervensystem wurden am Modell der neuromuskulären Endplatte des Zwerchfells durchgeführt. Der Zwerchfell-Muskel stellt in diesem Modell neben dem Motoneuron und der Schwannzelle die dritte Komponente der neuromuskulären Endplatte dar. Während der embryonalen Entwicklung des Zwerchfells verschmelzen Myoblasten in den Anteilen, in denen Kontakte mit dem N. phrenicus ausgebildet werden, zu primären Myotuben (Greer et al., 1999). Je weiter die intramuskuläre Verzweigung des N. phrenicus fortschreitet, desto mehr Myoblasten fusionieren zu weiteren Myotuben, bis schließlich die Myotuben-Bildung des Zwerchfells am E 17 abgeschlossen ist. Um die Differenzierung der Muskelzellen und damit die Entwicklung des Zwerchfell-Muskels nach der Deletion von TGF- β 2 zu untersuchen, wurde das Zwerchfell embryonaler Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Tiere mit Hilfe histologischer und immunhistochemischer Methoden dargestellt.

Um die Differenzierung der Muskelzellen am E 18,5 zu untersuchen, wurden zunächst sagittale Paraffin-Schnitte (10 μ m) von Zwerchfellen von Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Tieren angefertigt, die dann mit HE gefärbt wurden.

Die Begutachtung der Schnitte zeigte, dass ein Großteil der Muskelzellen im Zwerchfell von Wildtyp- (Abb. 7 A) und *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen (Abb. 7 B) einen randständigen Kern besaß und die Zellen in ihrem Durchmesser vergleichbar waren. Zusätzlich ließen sich jedoch in den lateralen Anteilen des Zwerchfells der TGF- β 2-defizienten Tiere Muskelzellen beobachten, die sich mit Eosin stärker anfärbten als die restlichen Muskelzellen (vergleiche Abb. 7). Sie hatten einen größeren Durchmesser und wiesen zum Teil mittelständige Kerne auf (vergleiche Abb. 7 C, Kreis). Die Muskelfasern einer Schnittebene besaßen im Wildtyp alle die gleiche Ausrichtung, d.h. sie waren entweder längs oder quer (oder in einer Zwischenstufe) angeschnitten. In den Zwerchfellen von *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen waren dagegen Fasern zu beobachten, die in einer Schnittebene mehrere Richtungen aufwiesen (vergleiche Abb. 7 B, * längs und ↓ quer angeschnitten).

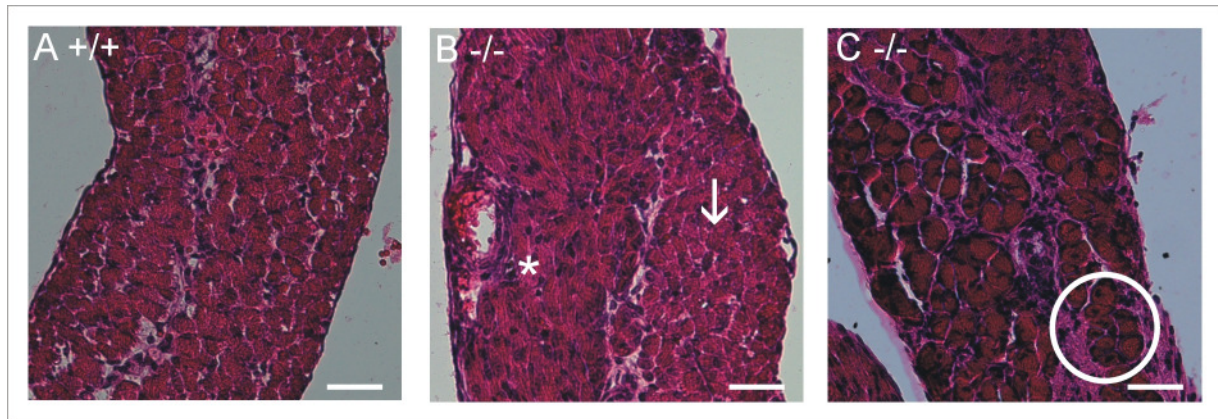


Abb. 7 Sagittale Schnitte durch das Zwerchfell von *Tgf- β 2^{+/-}* und *Tgf- β 2^{-/-}* Mäusen am Embryonaltag 18,5 (HE-Färbung).

(A) Im Wildtyp besaßen alle Muskelfasern einer Schnittebene die gleiche Ausrichtung, d.h. sie waren entweder längs oder quer (oder in einer Zwischenstufe) angeschnitten.

(B) In den *Tgf- β 2^{-/-}*-Zwerchfellen waren Fasern zu beobachten, die in einer Schnittebene beide Richtungen aufwiesen (*: längs angeschnitten und ↓: quer angeschnitten).

(C) Außerdem waren in den lateralen Anteilen der *Tgf- β 2^{-/-}*-Zwerchfelle Muskelzellen mit einem größeren Durchmesser zu finden, die sich mit Eosin dunkler anfärbten und zum Teil einen mittelständigen Kern besaßen (Kreis). (Balken entspricht 50 μ m)

Die Struktur des Zwerchfell-Muskels, d.h. der Verlauf der Muskelfasern wurde auch mittels Durchlicht-Mikroskopie beziehungsweise anhand einer immunzytochemischen Darstellung des Proteins Aktin untersucht.

Wie Abb. 8 A, C und E zeigen, waren im Wildtyp die Fasern parallel angeordnet und verliefen radial um das Zentrum des Muskels. Dies ist in den Abbildungen jeweils durch eine Gruppe von Pfeilen (→) angedeutet. In den Zwerchfellen TGF- β 2-defizienter Embryonen war dieser geordnete Verlauf dagegen gestört. Zwar gab es ebenfalls parallel verlaufende Fasern (angedeutet durch eine Gruppe von Pfeilen (→)), jedoch verliefen diese teilweise nicht radial zum Zentrum des Zwerchfells (vergleiche Abb. 8 B, D und F, Ausrichtung durch eine Reihe von Sternen (*) markiert). Die Faserbündel mit unterschiedlicher Ausrichtung liefen ungeordnet übereinander.

Abschließend ließ sich also feststellen, dass TGF- β 2-defiziente Tiere eine ausgeprägte Disorganisation des Zwerchfell-Muskels und in den lateralen Anteilen des Zwerchfells Muskelzellen mit einem anderen Differenzierungsgrad aufwiesen.

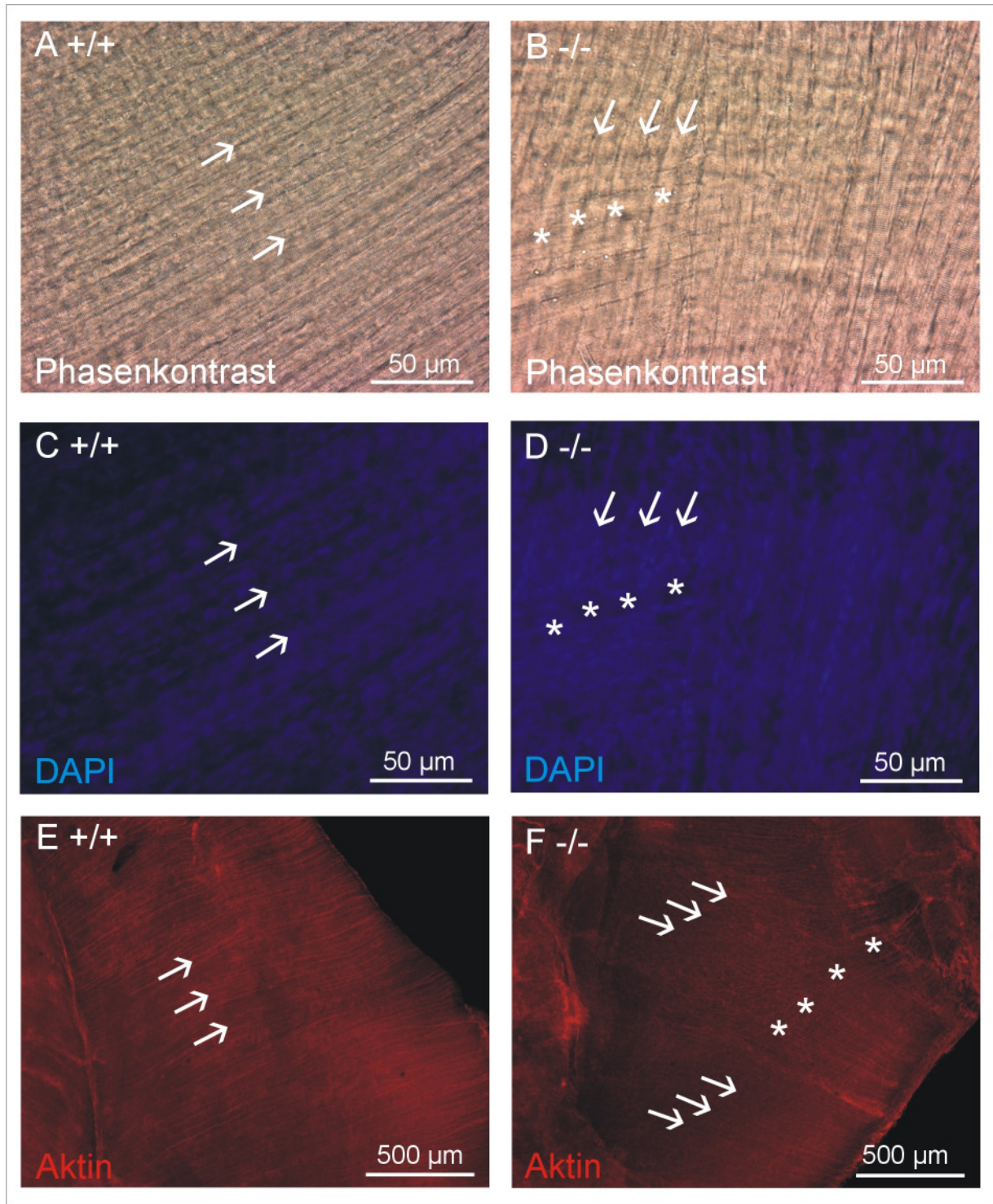


Abb. 8 **Zwerchfelle von Wildtyp- und TGF-β2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5: Phasenkontrast, Kernfärbung (DAPI) und immunzytochemische Darstellung von Aktin.**

(A, C, E) Im Wildtyp liefen die Muskelfasern parallel zueinander und radial zum Zentrum des Zwerchfells. Die Ausrichtung der Fasern ist durch eine Gruppe von Pfeilen (→) angedeutet.

(B, D, F) In *Tgf-β2*^{-/-}-Zwerchfellen traten ebenfalls Faserbündel auf, die radial zum Zentrum des Zwerchfells verliefen. Dies ist angedeutet durch eine Gruppe von Pfeilen (→). Zusätzlich gab es jedoch auch Faserbündel, die eine andere Ausrichtung aufwiesen. Ihre Ausrichtung ist durch eine Reihe von Sternen (*) angedeutet.

4.4 Einfluss von TGF- β auf die Entwicklung peripherer Synapsen: Untersuchung der Komponenten der neuromuskulären Endplatte

Um die Entwicklung der neuromuskulären Endplatte zu untersuchen, eignet sich eine Analyse des Zwerchfell-Muskels, der durch den N. phrenicus innerviert wird. Verschiedene Parameter wie das Verzweigungsmusters und die Fortsatzlänge des N. phrenicus, die Innervation und die Größe und Anzahl der Endplatten lassen wichtige Rückschlüsse auf die Integrität der neuromuskulären Synapsen und damit letztlich auf die Synaptogenese zu.

Die folgenden Analysen orientierten sich methodisch an verschiedenen Studien zur Synaptogenese in Gephyrin-, MuSK-, cdk5-, Agrin, erbB2- und ChAT-defizienten Mäusen sowie in einer transgenen Maus, in der die γ -Untereinheit des AChR durch eine ϵ -Untereinheit ersetzt wurde (Banks et al., 2005; DeChiara et al., 1996; Fu et al., 2005; Gautam et al., 1996; Gautam et al., 1995; Koenen et al., 2005; Lin et al., 2000; Misgeld et al., 2002). Entsprechend wurden am Zwerchfell von Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Mäusen am E 14,5 beziehungsweise E 18,5 der N. phrenicus sowie AChR und auch Schwannzellen immunhistochemisch dargestellt und qualitativ sowie quantitativ verglichen.

Der Zwerchfell-Muskel wurde für alle immunhistochemischen Analysen als *whole-mount*, d.h. als ganzes präpariert. In dieser Präparation konnten gleichzeitig Muskel, Nerv, Schwannzellen und synaptische Kontakte untersucht werden.

Um zu analysieren wie das Verzweigungsmuster des N. phrenicus und die Innervation einzelner neuromuskulärer Endplatten durch die Deletion von TGF- β 2 verändert wurde, wurden am Zwerchfell von embryonalen Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Tieren NF 150 kD und AChR (mittels α -BTX) immunhistochemisch nachgewiesen. NF 150 kD ist eine Komponente des axonalen Zytoskeletts, α -BTX ist ein Schlangengift (aus *Bungaris multicinctus*), das hochspezifisch und irreversibel an AChR bindet. Es wird standardmäßig zur Darstellung von AChR verwendet, die in der postsynaptischen Membran angereichert sind (Sanes und Lichtman, 2001). Um zu untersuchen wie sich die Deletion von TGF- β 2 auf die Differenzierung von Schwannzellen auswirkt, wurden diese in *whole-mount*-Präparationen mit einem Antikörper gegen S100 nachgewiesen, der Schwannzellen (auch terminale Schwannzellen) darstellt (Woolf et al., 1992).

Anschließend wurden die angefärbten Strukturen in anatomisch vergleichbaren Regionen des Zwerchfells in Wildtyp und *Tgf- β 2^{-/-}* verglichen. Mit Ausnahme der Übersichtsaufnahmen bei 40facher Vergrößerung wurden alle folgenden Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen.

4.4.1 Die Innervation des Zwerchfells und die Faszikulation des N. phrenicus werden nicht durch den Verlust von TGF- β 2 beeinträchtigt

Zu den Bestandteilen der extrazellulären Matrix des PNS gehören Zelladhäsionsmoleküle wie NCAM, N-cadherin und Laminine, deren fördernder Einfluss auf präsynaptische Differenzierung und das Auswachsen von Axonen nachgewiesen wurde (Dai und Peng, 1996; Noakes et al., 1995). Da TGF- β bei der Bildung von extrazellulärer Matrix eine Rolle spielt, wurde überprüft, ob TGF- β 2 die genannten Proteine reguliert und daher die Deletion von TGF- β 2 eine veränderte Faszikulation des N. phrenicus oder ein verändertes Auswachsen der Axone auf der Muskeloberfläche zur Folge haben könnte. Um zu untersuchen, ob der Verlust von TGF- β 2 einen Einfluss auf den Verlauf, die Verzweigung oder die Bündelung (Faszikulation) des N. phrenicus hat, wurde der N. phrenicus durch den immunhistochemischen Nachweis von NF 150 kD dargestellt. Dadurch waren die Hauptäste bis hin zu den Axonenden ausreichend gut zu untersuchen.

Motoneurone aus zervikalen Rückenmarkssegmenten verlassen das Rückenmark und bilden den N. phrenicus. Wie in Abb. 9 A schematisch dargestellt, trifft der N. phrenicus beidseitig zentral auf den Zwerchfell-Muskel auf und teilt sich in seine drei primären Hauptäste. Einer dieser Äste zieht in Richtung der Crura, die anderen beiden verlaufen intramuskulär in dorsaler beziehungsweise ventraler (sternaler) Richtung in der Mitte einer Zwerchfellhälfte senkrecht zu den Muskelfasern. Von den intramuskulären Ästen spalten sich Axone ab (sekundäre Zweige), die sich zunächst weiter in tertiäre Äste verzweigen und sich schließlich terminal aufspalten.

Abb. 9 B und C zeigen Übersichtsaufnahmen bei 40facher Vergrößerung von Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Zwerchfellen. Dabei ist in Wildtyp- wie in *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen der Auftreffpunkt des Nervs erkennbar (gekennzeichnet durch einen Stern (*)). Der Nerv spaltete sich sowohl in Wildtyp- als auch in *Tgf- β 2^{-/-}*-Tieren in seine primären Äste auf (gekennzeichnet durch Pfeile mit gefüllten Pfeilspitzen), die in dorsaler und ventraler Richtung über die Zwerchfellhälften verliefen. Von den primären Ästen spalteten sich sekundäre Zweige ab (gekennzeichnet durch Pfeile mit offenen Pfeilspitzen). Wie Abb. 9 D und E in 630facher Vergrößerungen zeigen, verliefen die Axone der Motoneurone des N. phrenicus parallel zueinander und geordnet.

Die Innervation des Zwerchfells sowie die Faszikulation des Nervs waren daher in Wildtypen und TGF- β 2-defizienten Embryonen vergleichbar.

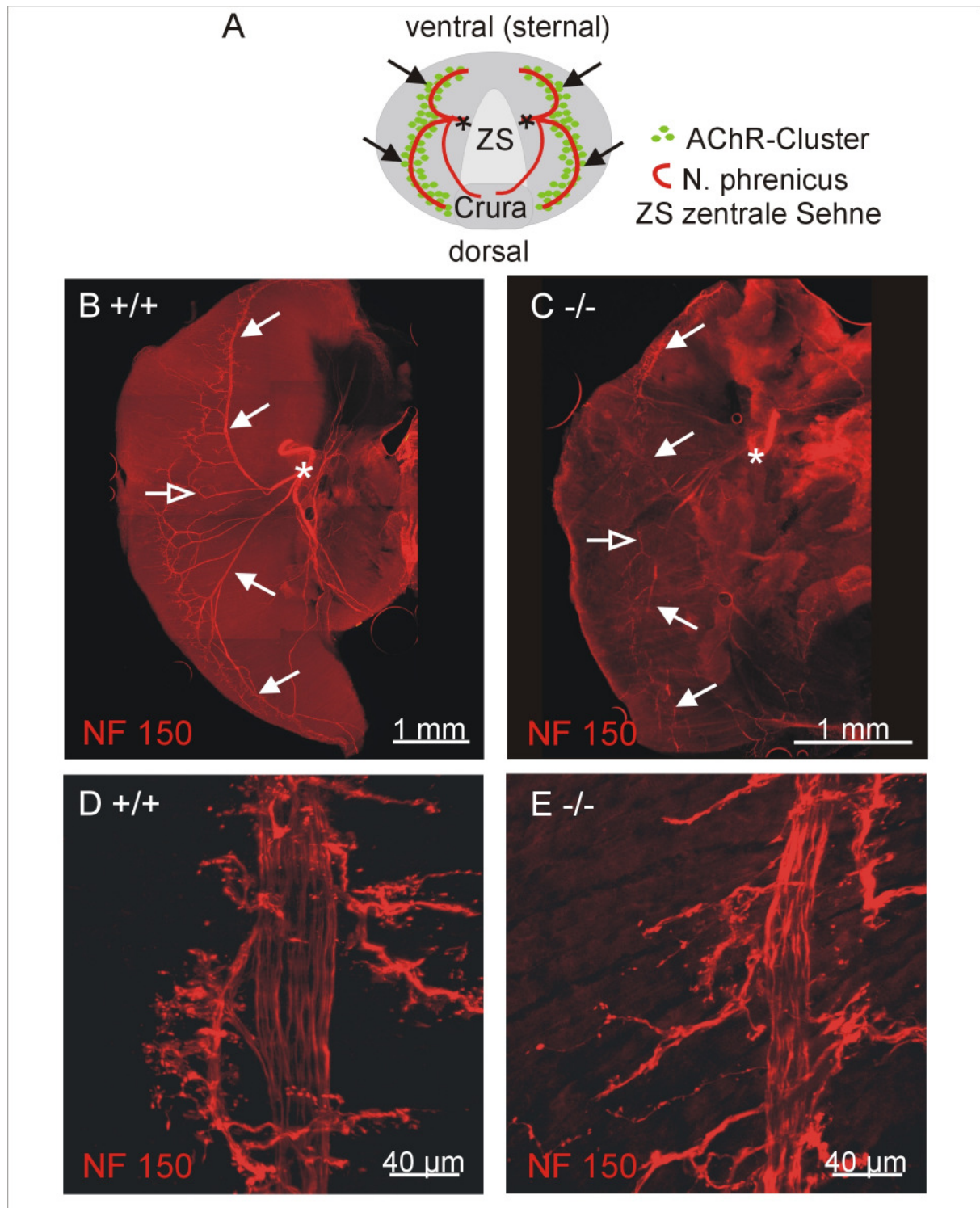


Abb. 9 Verzweigungen und Faszikulation des N. phrenicus in Wildtyp- und *TGF-β2*^{-/-}-Embryonen am Embryonaltag 18,5.

(A, B, C) Darstellung der Innervation des Zwerchfells (schematisch (A), in Wildtyp- (B) und *TGF-β2*^{-/-}-Embryonen (C)). Der N. phrenicus (Auftrittspunkte sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet) teilt sich in primäre (Pfeile mit gefüllten Pfeilspitzen) und sekundäre Äste (Pfeile mit offenen Pfeilspitzen) auf. Die primären Äste verlaufen in dorsaler und ventraler Richtung über das Zwerchfell. Das Verzweigungsmuster ist in Wildtypen und *TGF-β2*-defizienten Embryonen vergleichbar.

(D, E) Darstellung der Faszikulation des N. phrenicus. Der Nerv ist in Wildtypen (D) und *TGF-β2*-defizienten Embryonen (E) vergleichbar gebündelt.

4.4.2 Die Deletion von TGF- β 2 führt zu keiner Veränderung des Verzweigungsmusters des N. phrenicus

Wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben wurde, kommt es in Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen zu einer Abspaltung sekundärer Fortsätze von den Hauptästen des N. phrenicus (vergleiche Abb. 9 B, C), die sich weiterhin tertiär verzweigen. Für den Vergleich des Verzweigungsmusters der Motoneuron-Axone zwischen Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Tieren wurden die Fortsätze der Neurone mit dem konfokalen Lasermikroskop in z-Bildstapeln aufgenommen (Bildgröße 770 μ m x 770 μ m), die in Maximal-Projektionen zusammengefügt wurden. In den so entstandenen Bildern wurden ausgehend vom primären Ast des N. phrenicus parallele äquidistante Linien (Abstand 20 μ m) gezogen. Es wurden die Axone gezählt, die diese Linien in medialer und lateraler Richtung überschritten (Banks et al., 2003). Die so erhaltenen Werte wurden in Abb. 10 C als Verteilung aufgetragen, um sie qualitativ vergleichen zu können. Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen wiesen ein vergleichbares Verzweigungsmuster der sekundären Äste auf, d.h. es gab auf der medialen sowie auf der lateralen Seite etwa gleich viele Äste, die den primären Ast verließen. Die Äste auf der lateralen Seite waren dabei jeweils länger als auf der medialen Seite.

Für einen quantitativen Vergleich des Verzweigungsmusters des N. phrenicus wurde die Anzahl aller vom sekundären Zweig abgehenden Fortsätze auf der medialen und der lateralen Seite des primären Zweigs bestimmt und statistisch miteinander verglichen (Anzahl mediale Abgänge *Tgf- β 2*^{+/+}: 14 ± 2 , n = 5; *Tgf- β 2*^{-/-}: 12 ± 3 , n = 4; n.s., Student t-Test; Anzahl laterale Abgänge *Tgf- β 2*^{+/+}: 15 ± 1 , n = 5; *Tgf- β 2*^{-/-}: 12 ± 2 , n = 4; n.s., Student t-Test; siehe Abb. 10 D). Zusätzlich wurde die Anzahl aller tertiären Verzweigungen auf der medialen und der lateralen Seite des primären Zweigs bestimmt (Anzahl mediale Verzweigungen *Tgf- β 2*^{+/+}: $13 \pm 2,0$, n = 5; *Tgf- β 2*^{-/-}: 14 ± 5 , n = 4; n.s., Student t-Test; Anzahl laterale Verzweigungen *Tgf- β 2*^{+/+}: 40 ± 4 , n = 5; *Tgf- β 2*^{-/-}: 40 ± 6 , n = 4; n.s., Student t-Test; siehe Abb. 10 E). Zwischen Wildtyp- und *TGF- β 2*^{-/-}-Embryonen zeigte sich weder für die Anzahl der sekundären Zweige noch für die Anzahl der Aufspaltungen in tertiäre Fortsätze ein Unterschied und das Verzweigungsmuster des N. phrenicus war daher vergleichbar.

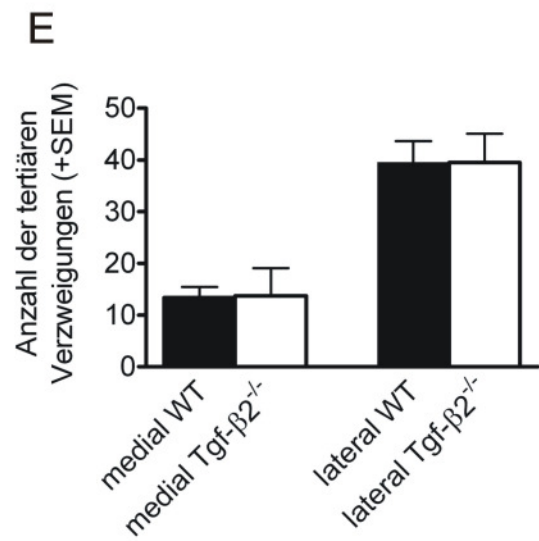
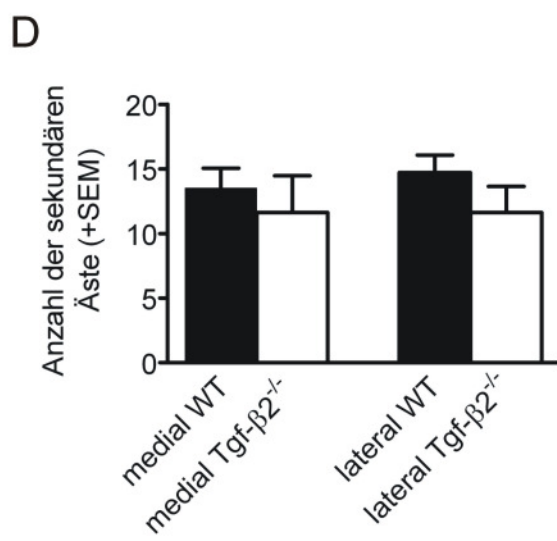
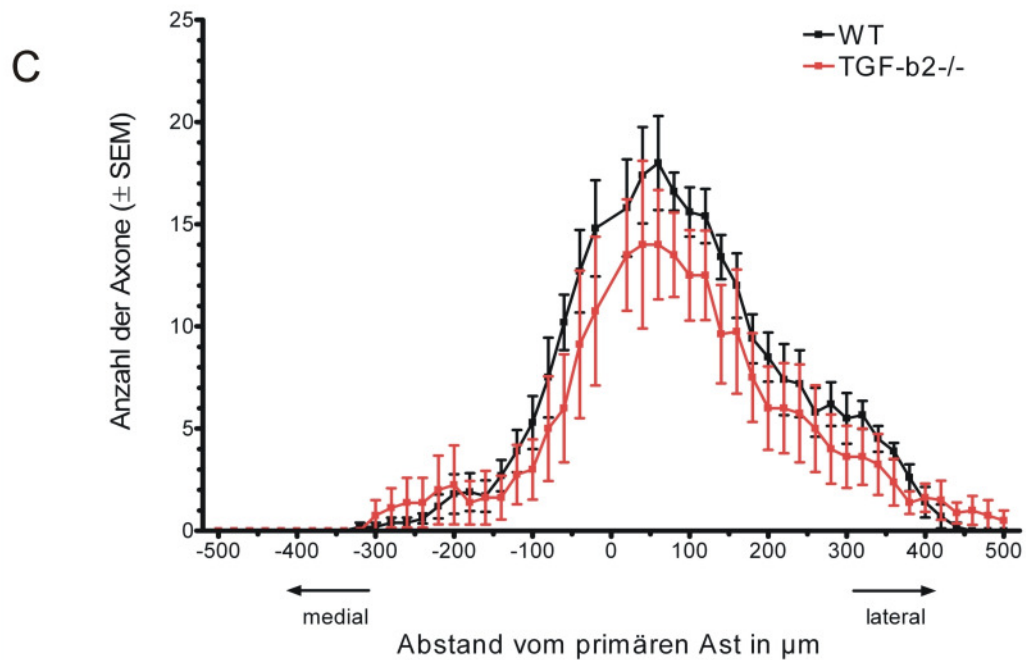
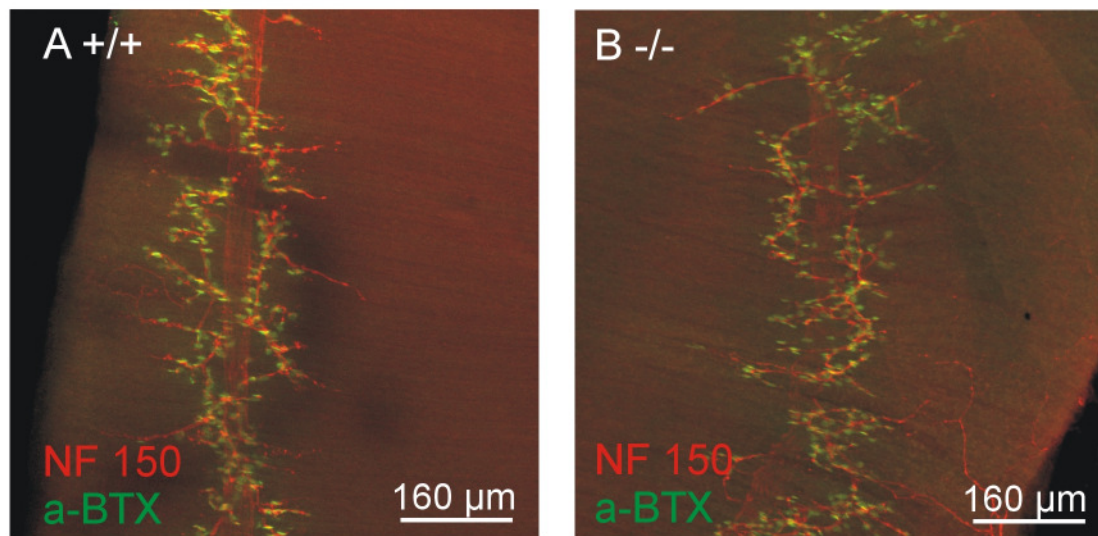
Abb. 10 Darstellung und quantitative Auswertung der Verzweigungen des N. phrenicus in Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Embryonen (E 18,5).

(A, B) Zwerchfelle von Wildtyp- (A) und *TGF- β 2*^{-/-}-Mäusen (B) mit Darstellung des N. phrenicus mittels NF 150 kD-Immunzytochemie und der AChR-Cluster mit α -BTX. Ein primärer Ast des N. phrenicus verzweigt sekundär und tertiär.

(C) Verzweigungsmuster des N. phrenicus in Wildtyp- und *TGF- β 2*^{-/-}-Embryonen. Aufgetragen ist die Anzahl von sekundären Ästen, die in einem gewissen Abstand zum primären Ast lagen.

(D) Anzahl der sekundären Äste, die sich in medialer bzw. lateraler Richtung vom primären Ast abzweigten, in Wildtyp- und *TGF- β 2*^{-/-}-Tieren.

(E) Anzahl der tertiären Verzweigungen auf der medialen bzw. lateralen Seite des primären Astes in Wildtyp und *TGF- β 2*^{-/-}.



4.4.3 In *TGF-β2*^{-/-}-Embryonen sind die Aggregation und das Clustern von AChR nicht verändert, jedoch ist die Zahl der AChR-Cluster vermindert

Wie in der Einleitung (1.2.1) beschrieben wurde, kommt es im Zuge der postsynaptischen Differenzierung am E 14,5 zum so genannten *Prepatterning* von AChR in einem zentralen Band auf der Muskeloberfläche durch einen Muskel-intrinsischen, Nerv-unabhängigen Prozess. Um den Einfluss von TGF-β2 auf dieses frühe Ereignis in der Synaptogenese zu untersuchen, wurden Zwerchfelle von Wildtypen und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen am E 14,5 analysiert.

Wie in Abb. 11 dargestellt, war eine Aggregation von AChR (dargestellt mittels Fluoreszenzgekoppeltem α-BTX) auf der Oberfläche des Muskels in einem zentralen Band in Wildtyp- und TGF-β2-defizienten Tieren zu beobachten. Dieses zentrale Band verlief in direkter Nähe zu den primären Ästen des N. phrenicus, der mittels NF 150 kD-Antikörper dargestellt wurde (Abb. 11B, D). In Wildtyp- und in *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen wurden aneurale AChR-Aggregate beobachtet.

Nachdem die AChR in frühen Embryonalstadien (E 14,5) zunächst im Zentrum der Muskelfasern lose aggregieren, kommt es im Zuge der weiteren postsynaptischen Differenzierung zu einer Ausformung so genannter Rezeptor-Cluster, d.h. der Bildung von Plaques mit scharfen Begrenzungen, deren Länge im Vergleich zu den AChR-Aggregaten kleiner ist und in denen die Dichte an AChR steigt (Sanes und Lichtman, 2001). Um zu untersuchen, ob dieser Differenzierungsprozess durch die Deletion von TGF-β2 verändert wird, wurden wie am E 14,5 am E 18,5 die AChR mit α-BTX dargestellt und in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen verglichen.

Wie Abb. 12 A zeigt, waren im Wildtyp am E 18,5 AChR-Cluster ausgebildet. Die Cluster waren scharf begrenzt und hatten eine runde oder auch ovale Form. In den *Tgf-β2*^{-/-}-Zwerchfellen waren ebenfalls solche Cluster zu beobachten (siehe Abb. 12 B). Es konnten daher weder am E 14,5 noch am E 18,5 Veränderungen in der postsynaptischen Differenzierung in TGF-β2-defizienten Embryonen festgestellt werden.

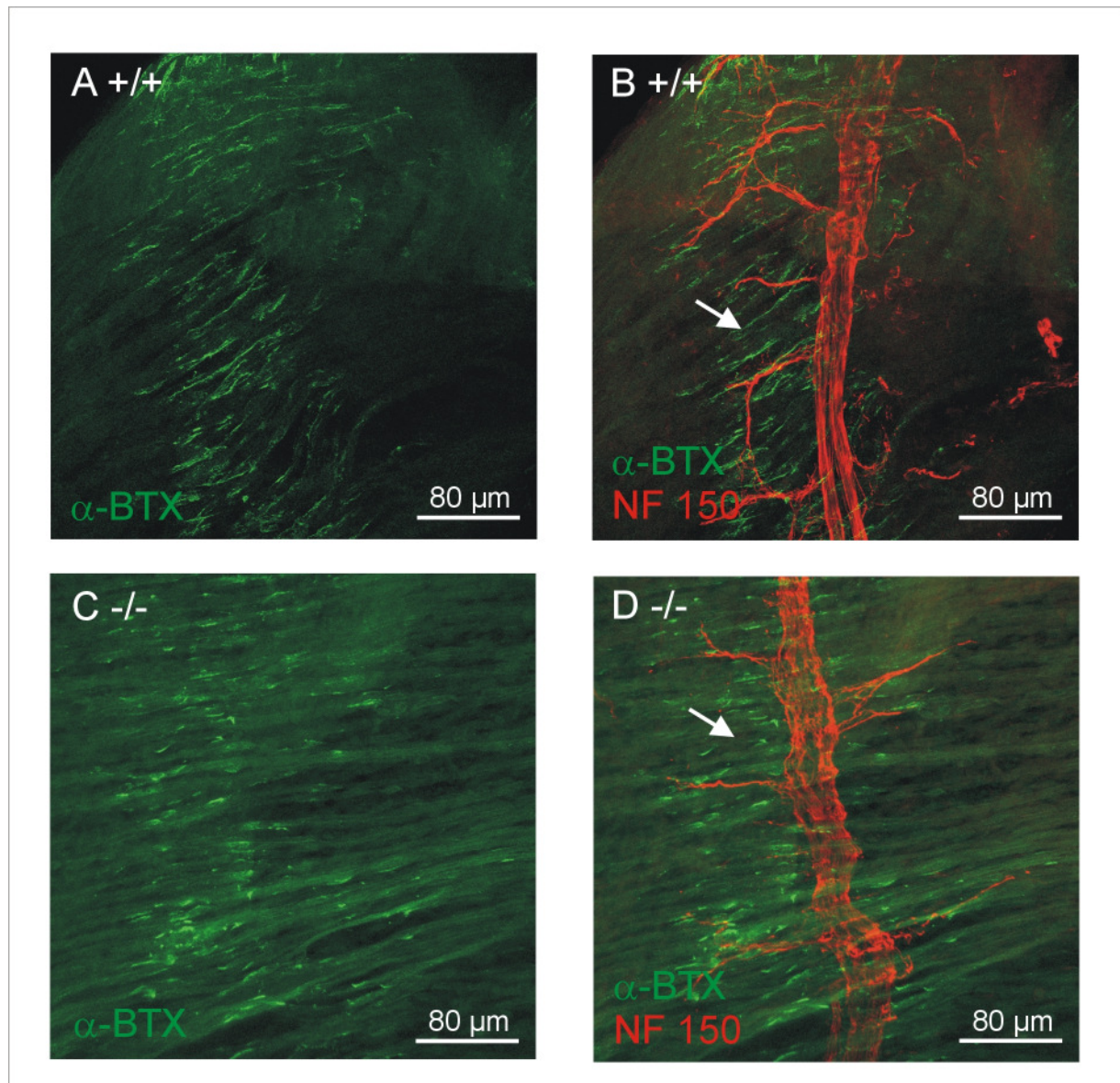


Abb. 11 Immunhistochemische Darstellung von AChR und N. phrenicus am Embryonaltag 14,5.

(A, B) Im Wildtyp aggregierten AChR im Zentrum der Muskelfasern (A) in unmittelbarer Nähe zum N. phrenicus (B). Es gab aneurale Aggregate (Pfeil in B).

(C, D) Auch in den TGF- β 2-defizienten Embryonen kam es zu solch einer Aggregation im Zentrum der Muskelfasern (C) und in der Nähe des N. phrenicus (D). Es gab ebenfalls aneurale Aggregate (Pfeil in D).

AChR sind mit α -BTX in grün, der N. phrenicus ist mit NF 150 kD in rot dargestellt.

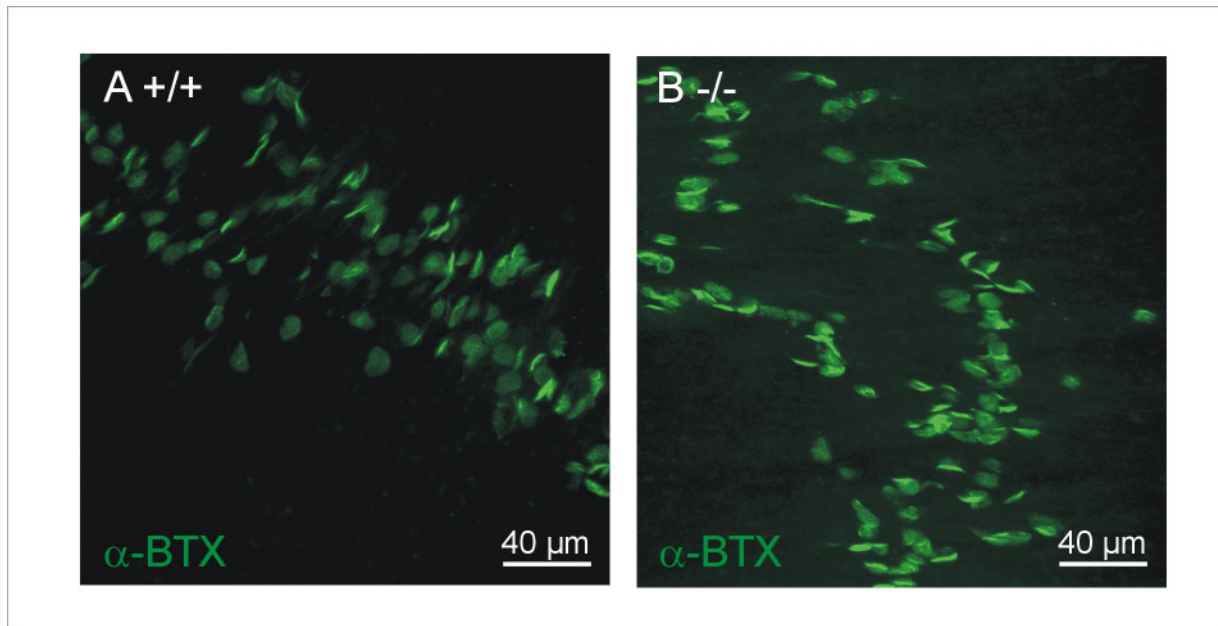


Abb. 12 Konfokale Aufnahmen von AChR-Clustern am Embryonaltag 18,5.

(A) Im Wildtyp formten AChR auf der Muskeleoberfläche Cluster mit runder bis ovaler Form und scharfen Begrenzungen.

(B) In den $TGF-\beta 2$ -defizienten Embryonen waren AChR-Cluster mit vergleichbarer Größe und Form zu beobachten.

Um die Anzahl der AChR-Cluster am E 18,5 zu untersuchen, wurden anatomisch vergleichbare Sektionen des Zwerchfells ausgewertet. Die Cluster wurden dazu in gleichgroßen Feldern ($770 \times 770 \mu m^2$) manuell ausgezählt, pro Tier gemittelt und die Anzahl der Cluster anschließend zwischen Wildtyp- und $Tgf-\beta 2^{-/-}$ -Embryonen verglichen. Die Anzahl von AChR-Clustern war in den $TGF-\beta 2$ -defizienten Embryonen signifikant um etwa 25 % verringert (Wildtyp 185 ± 9 , $n = 6$; $Tgf-\beta 2^{-/-}$ 140 ± 12 , $n = 6$, $P < 0,05$, Student t-Test, siehe Abb. 13).

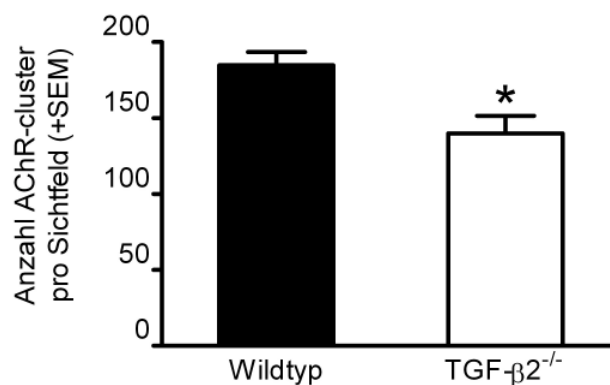


Abb. 13 Quantitativer Vergleich der Anzahl der AChR-Cluster in Zwerchfellen von Wildtyp- und $Tgf-\beta 2^{-/-}$ -Mäusen am Embryonaltag 18,5.

Die Anzahl der AChR-Cluster war in den Zwerchfellen von $Tgf-\beta 2^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert (- 25 %).

4.4.4 Die Breite des postsynaptischen zentralen Endplatten-Bandes ist nach der Deletion von TGF- β 2 nicht verändert

Um zu untersuchen, ob die Deletion von TGF- β 2 die postsynaptische Differenzierung in Form der Breite des zentralen Endplatten-Bandes beeinflusst, wurde diese Breite in Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen am E 18,5 quantitativ bestimmt und verglichen.

Dazu wurden anatomisch vergleichbare Regionen des Zwerchfells ausgewählt, wie in der Schemazeichnung in Abb. 14 F angedeutet ist. Mit dem konfokalen Lasermikroskop wurden z-Bildstapel aufgenommen, die in einer maximalen Projektion die Verteilung der AChR-Cluster zeigen (vergleiche Abb. 14 A, B).

Die Verteilung der Cluster wurde mit der Software ImageJ© gemessen (Funktion *intensity plot*). Die erhaltenen Werte wurden in die Software GraphPad Prism© importiert und anschließend mit einer Gauss-Kurve angepasst [vergleiche blaue Kurve in Abb. 14 C, D; Funktion: $y = (\text{AREA}/(\text{SD} \cdot (2 \cdot \pi)^{0,5})) \cdot \exp(-0,5((X-\text{MEAN})/\text{SD}^2))$]. Aus dieser Gauss-Kurve wurde die halb-maximale Breite des Bandes (angedeutet durch eine rote Linie, vergleiche Abb. 14 C, D) bestimmt (Koenen et al., 2005). Die halb-maximale Breite des zentralen Endplatten-Bandes unterschied sich in Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen nicht (Wildtyp $132,7 \pm 18,5 \mu\text{m}$, $n = 5$; *Tgf- β 2^{-/-}* $132,4 \pm 18,2 \mu\text{m}$, $n = 5$; $P > 0,05$ n.s., Student t-Test, siehe Abb. 14 E).

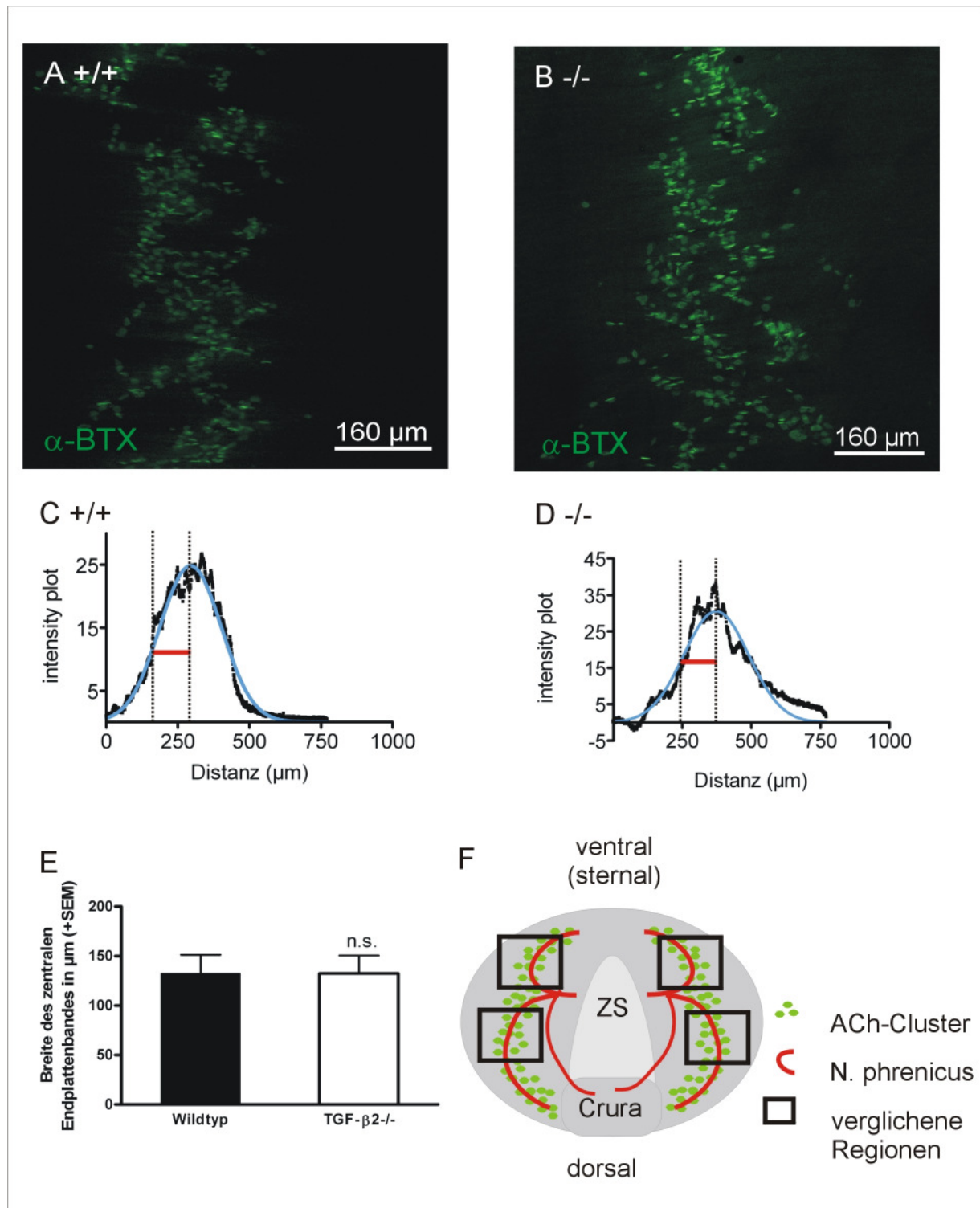


Abb. 14 Bestimmung der Breite des zentralen Endplatten-Bandes am Embryonaltag 18,5.

(A, B) Das zentrale Endplatten-Band in Zwerchfellen von Wildtyp- (A) und $Tgf\text{-}\beta 2^{-/-}$ -Embryonen (B). AChR wurden mit α -BTX dargestellt.

(C, D) Die Verteilung der AChR wurde als *intensity plot* dargestellt und mit einer Gauss-Kurve (blau) angepasst, aus der sich die halb-maximale Breite des zentralen Endplatten-Bandes (rot) in Wildtypen (C) und TGF- β 2-defizienten Tieren (D) bestimmen ließ.

(E) Der statistische Vergleich der halb-maximalen Breite des zentralen Endplatten-Bandes in Wildtyp- und $Tgf\text{-}\beta 2^{-/-}$ -Embryonen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

(F) Schematische Darstellung des Zwerchfells mit Angabe der quantitativ verglichenen Regionen, die jeweils um einen Zweig des N. phrenicus lagen (ZS: zentrale Sehne).

4.4.5 Die Innervation einzelner Endplatten ist nach der Deletion von TGF- β 2 nicht verändert

Während reife neuromuskuläre Endplatten durch ein einzelnes Motor-Axon innerviert sind, werden Endplatten während ihrer Entwicklung durch mehrere Axone innerviert (Polyinnervation) (Sanes und Lichtman, 1999). Es wurde daher untersucht, ob die Deletion von TGF- β 2 die Anzahl der Axon-Terminalien, die eine Endplatte innervieren, verändert oder zu einem verstärktem Auswachsen der Terminalien über die Endplatte hinaus führt.

In Abb. 15 sind in 630facher Vergrößerung konfokale Aufnahmen einzelner Endplatten und der sie innervierenden Axon-Terminalien in Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Embryonen dargestellt. Im Wildtyp waren mehrere Terminalien im Bereich einer Endplatte zu erkennen, jedoch nicht mehrere Axone. Die Terminalien wuchsen vereinzelt auch über die Endplatte hinaus (vergleiche Abb. 15 A). Im Vergleich dazu war die Anzahl der Terminalien im Bereich einer Endplatte in *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen nicht verändert und die Terminalien wuchsen in einem vergleichbarem Ausmaß über die Endplatte hinaus. Es wurde ebenfalls keine Polyinnervation beobachtet (vergleiche Abb. 15 B).

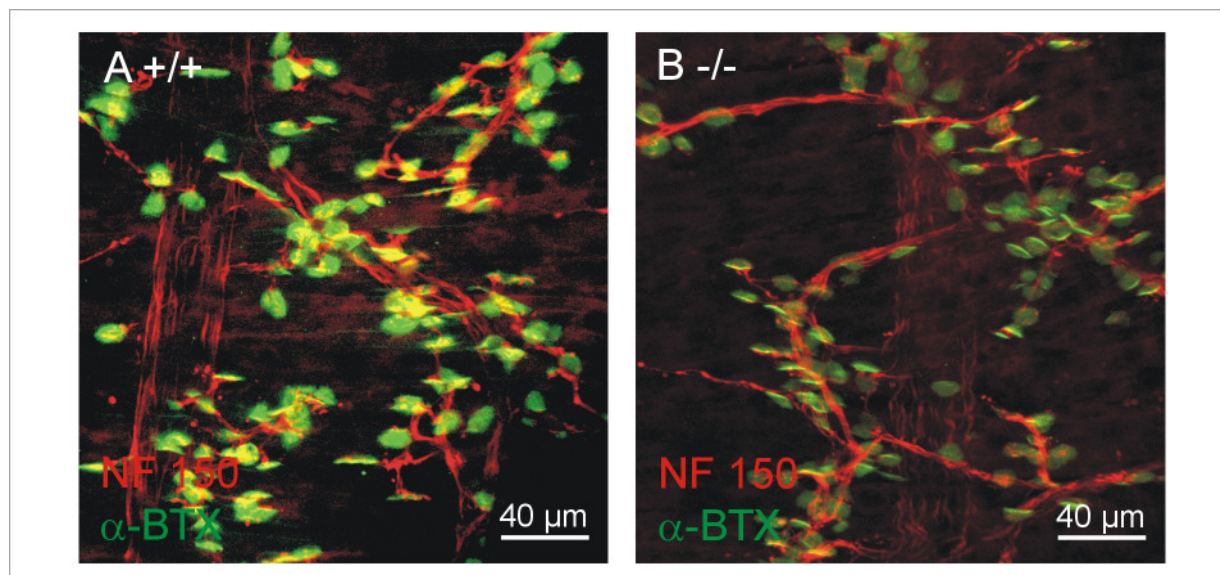


Abb. 15 Terminale Aufspaltung des N. phrenicus und Innervation einzelner Endplatten in Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Mäusen am Embryonaltag 18,5.

(A) Konfokale Aufnahmen von neuromuskulären Endplatten, die durch mehrere Motor-Axon-Terminalien innerviert wurden, in Wildtyp-Zwerchfellen. Die Terminalien wuchsen teilweise über die Endplatte hinaus.

(B) Konfokale Aufnahmen von neuromuskulären Endplatten, die ebenfalls durch mehrere Motor-Axon-Terminalien innerviert wurden, in *Tgf- β 2*^{-/-}-Zwerchfellen. Die Terminalien wuchsen in vergleichbarem Maß über die Endplatte hinaus.

4.4.6 Schwannzellen des N. phrenicus differenzieren in Abwesenheit von TGF- β 2

Schwannzellen bilden neben Motoneuron und Muskel die dritte Komponente der neuromuskulären Endplatte. Myelinisierende Schwannzellen myelinisieren den peripheren Nerv von seinem Ursprungsort bis zur terminalen Aufspaltung. Die Synapse selbst wird von so genannten terminalen Schwannzellen ummantelt (Sanes und Lichtman, 1999). Da TGF- β eine Rolle für die Proliferation und die Interaktion von Motoneuronen und Schwannzellen spielt (Einheber et al., 1995; Ridley et al., 1989), wurde untersucht, ob sich die Deletion von TGF- β 2 auf die Differenzierung von Schwannzellen auswirkt. Die Schwannzellen des N. phrenicus wurden in Zwerchfellen von Wildtypen und TGF- β 2-defizienten Mäusen mit einem Antikörper gegen das Protein S100 dargestellt, das einen verlässlichen Marker für myelinisierende und terminale Schwannzellen der Maus darstellt (Woolf et al., 1992).

Abb. 16 A und B zeigen Aufnahmen von Semi-Zwerchfellen, in denen der Verlauf des N. phrenicus anhand einer S100-Färbung der ihn begleitenden Schwannzellen zu erkennen ist. Im Wildtyp (Abb. 16 A) wie auch nach der Deletion von TGF- β 2 (Abb. 16 B) begleiteten die Schwannzellen den Nerv von seinem Auftreffen auf den Zwerchfell-Muskel über die primären bis in die sekundären Verzweigungen. Bei höherer Vergrößerung zeigte sich, dass S100-positive terminale Schwannzellen die neuromuskulären Synapsen in Wildtyp- (Abb. 16 C) und *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen (Abb. 16 D) bedeckten.

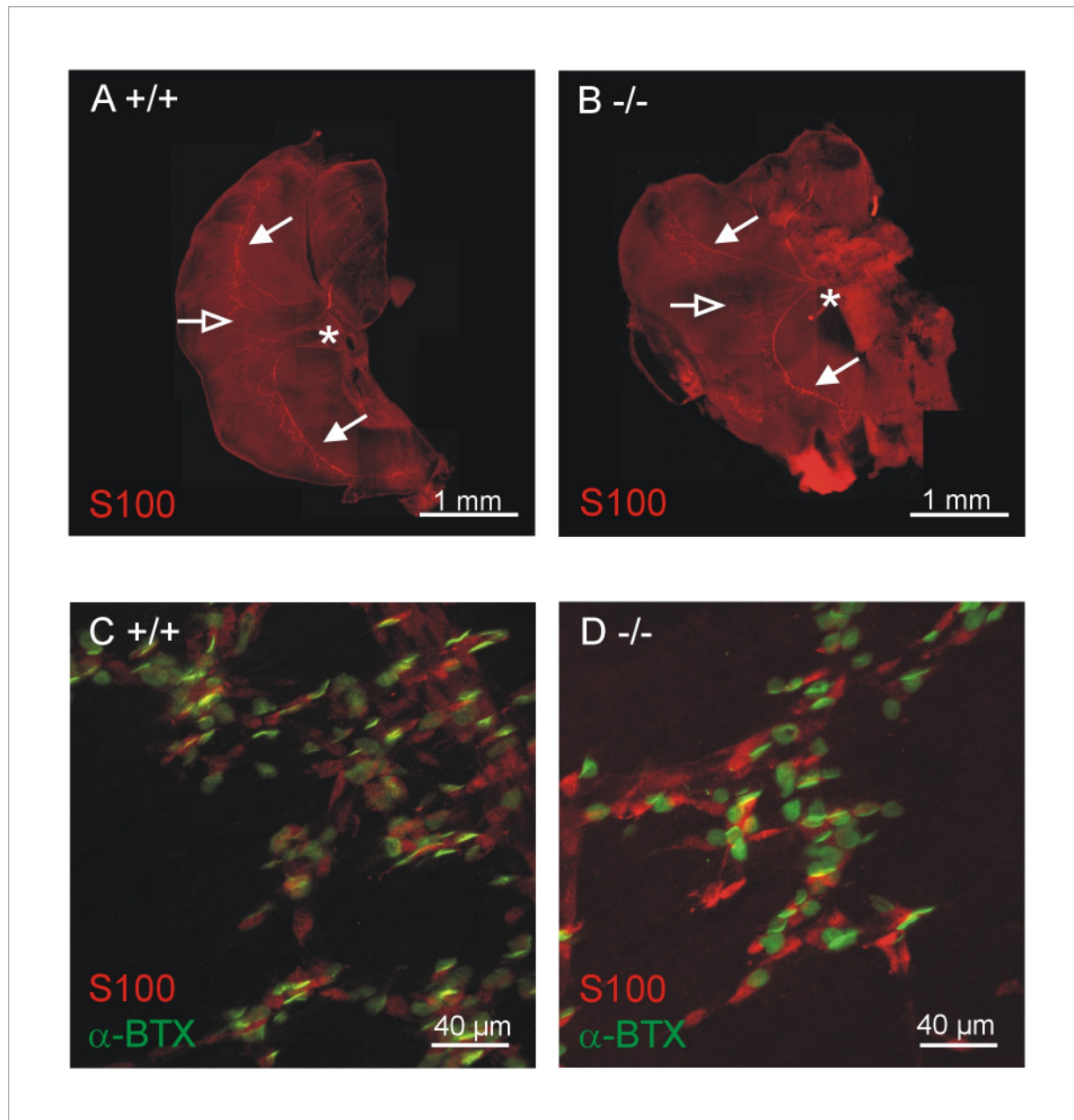


Abb. 16 Darstellung der Schwannzellen des N. phrenicus und von terminalen Schwannzellen an der neuromuskulären Endplatte in Wildtypen und TGF- β 2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5.

(A, C) Im Wildtyp begleiteten Schwannzellen die primären und sekundären Äste des N. phrenicus und bedeckten als terminale Schwannzellen die neuromuskuläre Endplatte.

(B, D) In *Tgf- β 2*^{-/-}-Zwerchfellen begleiteten Schwannzellen ebenfalls die primären und sekundären Äste des N. phrenicus und bedeckten als terminale Schwannzellen die neuromuskuläre Endplatte.

Mit einem Stern (*) sind die Auftrittspunkte des N. phrenicus auf den Zwerchfell-Muskel dargestellt. Die Pfeile mit gefüllten Pfeilspitzen markieren die primären Äste, die Pfeile mit offenen Pfeilspitzen markieren die sekundären Äste des N. phrenicus. Darstellung von S100 in rot, von α -BTX in grün.

4.4.7 Inhibition des TGF- β -Signalweges vermindert Agrin-induziertes AChR-Clustern *in vitro*

Zusätzlich zu den Untersuchungen der neuromuskulären Endplatte in Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen wurde analysiert, ob TGF- β auch *in vitro* einen Einfluss auf die Anzahl von AChR-Clustern besitzt. Für die Untersuchung wurden C2C12-Zellen verwendet, die durch Serum-Reduktion von Myoblasten zu Myotuben differenziert werden (Epstein et al., 1995). Dabei kommt es zur Fusion von Zellen, sodass schließlich langgestreckte, mehrkernige Myotuben beobachtet werden können. C2C12-Zellen exprimieren AChR diffus verteilt auf ihrer Zelloberfläche. In differenzierten C2C12-Zellen kann durch Zugabe von Agrin ein Clustern dieser AChR bewirkt werden (Bowen et al., 1996; Ferns et al., 1996).

Um zunächst zu testen, ob differenzierte C2C12-Zellen TGF- β -responsiv sind, wurde die Lokalisation von Smad-Proteinen untersucht. Nach Aktivierung der TGF- β -Rezeptoren durch die Bindung von TGF- β kann eine Smad-abhängige Signalkaskade ausgelöst werden, in deren Verlauf es zu einer Translokation von Smad2 und Smad3 vom Zytosol in den Zellkern kommt (Derynck und Zhang, 2003).

Um C2C12-Myoblasten zu Myotuben zu differenzieren, wurde eine Fusion der C2C12-Zellen durch einen Mediumwechsel (von 10 % FBS zu 2 % HS) ausgelöst. Diese differenzierten C2C12-Zellen wurden dann für 30 Minuten mit TGF- β (2 ng/ml) behandelt. Anschließend wurde die Lokalisation von Smad-Proteinen mittels eines Antikörpers gegen Smad1,2,3 immunzytochemisch untersucht. Um zu testen, ob die Responsivität durch die Inhibition des TGF- β -Rezeptor Typ I (T β RI) blockiert werden kann, wurde zusätzlich zu TGF- β allein auch in Kombination mit dem ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 (10 μ M) behandelt. SB431542 inhibiert selektiv die Typ I TGF- β -Rezeptoren ALK4, -5 und -7, ohne einen Effekt auf andere ALK-Familienmitglieder zu haben (Inman et al., 2002). Es inhibiert spezifisch TGF- β - oder Activin-stimulierte Smad-Phosphorylierung, beeinflusst die Erk-, JNK- und p 38 MAPK-Signalwege jedoch nicht.

In Abb. 17 sind die Ergebnisse des immunzytochemischen Nachweises von Smad1,2,3 (Abb. 17 A, C, E, G) mit einer DAPI-Gegenfärbung (Abb. 17 B, D, F, H) dargestellt. Es waren unter allen Bedingungen deutlich differenzierte C2C12-Zellen zu erkennen, die eine langgestreckte Form und mehrere Zellkerne besaßen. Unter Kontroll-Bedingungen war eine Lokalisation von Smad1,2,3 im Zellkern zu beobachten (siehe Pfeil in Abb. 17 A). Nach 30-minütiger Behandlung mit TGF- β 1 war diese Lokalisation verstärkt festzustellen (siehe Pfeil in Abb. 17 C). Wurden die Zellen mit SB431542 behandelt, war eine diffuse Verteilung von Smad1,2,3 in der gesamten Zelle zu beobachten (siehe Pfeil in Abb. 17 E), die auch festzustellen war, wenn SB431542 und TGF- β 1 in Kombination verwendet wurden (siehe Pfeil in Abb. 17 G).

Damit konnte einerseits gezeigt werden, dass differenzierte C2C12-Zellen unter Kontroll-Bedingungen wahrscheinlich TGF- β bilden, da ein Großteil der Zellen eine Smad-Lokalisation im Zellkern aufwies. Andererseits wurde damit gezeigt, dass differenzierte C2C12-Zellen TGF- β -responsiv sind und diese Responsivität durch Inhibition des T β RI blockiert werden kann.

Um zu untersuchen, ob TGF- β einen Einfluss auf das Agrin-induzierte Clustern von AChR hat, wurde in differenzierten C2C12-Zellen durch Zugabe von Agrin (1 ng/ml) für sechs Stunden das Clustern von AChR induziert (vergleiche Abb. 18 A). Die Differenzierung der C2C12-Zellen wurde zuvor durch Mediumwechsel (von 10 % FBS zu 2 % HS) ausgelöst. Zusammen mit der Gabe von Agrin wurde dem Medium entweder TGF- β 1 (2 ng/ml), der ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 (10 μ M) oder der neutralisierende Antikörper anti-TGF- β (1,2,3) (10 μ g/ml) zugesetzt. Durch die Verwendung des neutralisierenden Antikörpers sollte ausgeschlossen werden, dass es zu einem Effekt kommt, der nicht ALK4,5,7-abhängig ist. Die neutralisierende Wirkung des Antikörpers bei dieser Konzentration wurde zuvor bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Nach der Stimulation der Zellen wurden diese fixiert und differenzierte Zellen wurden mittels des Antikörpers MF20 dargestellt, der alle sarkomeren Myosine (genauer: schwere Myosin-Ketten) erkennt und somit Myosin-positive Zellen darstellte (Bader et al., 1982). AChR-Cluster wurden mit α -BTX visualisiert. Es wurde die Anzahl der AChR-Cluster pro differenzierter, MF20-positiver Zelle bestimmt.

Folgende Werte wurden erhalten (in % \pm SEM der Kontrolle): TGF- β 1 81 ± 16 %, $n = 3$, $P > 0,05$ n.s., Student t-Test, SB431542 80 ± 5 %, $n = 3$, $P < 0,05$, Student t-Test und anti-TGF- β (1,2,3) 76 ± 10 %, $n = 2$, $P < 0,05$, Student t-Test. Die Gabe von TGF- β 1 bewirkte also keine Veränderung der Anzahl Agrin-induzierter AChR-Cluster, während die Inhibition des TGF- β -Signalweges durch SB431542 oder anti-TGF- β (1,2,3) die Anzahl um 20 % beziehungsweise 24 % senkte (vergleiche Abb. 18 B).

Die Applikation von TGF- β 1, SB431542 oder anti-TGF- β (1,2,3) allein, d.h. in Abwesenheit von Agrin, führte nicht zu einer Induktion von AChR-Clustern (Daten nicht dargestellt). Bei Verwendung von Agrin in einer höheren Konzentration (10 ng/ml) besaßen weder TGF- β 1, noch SB431542 oder anti-TGF- β (1,2,3) einen Einfluss auf das Clustern von AChR (Daten nicht gezeigt).

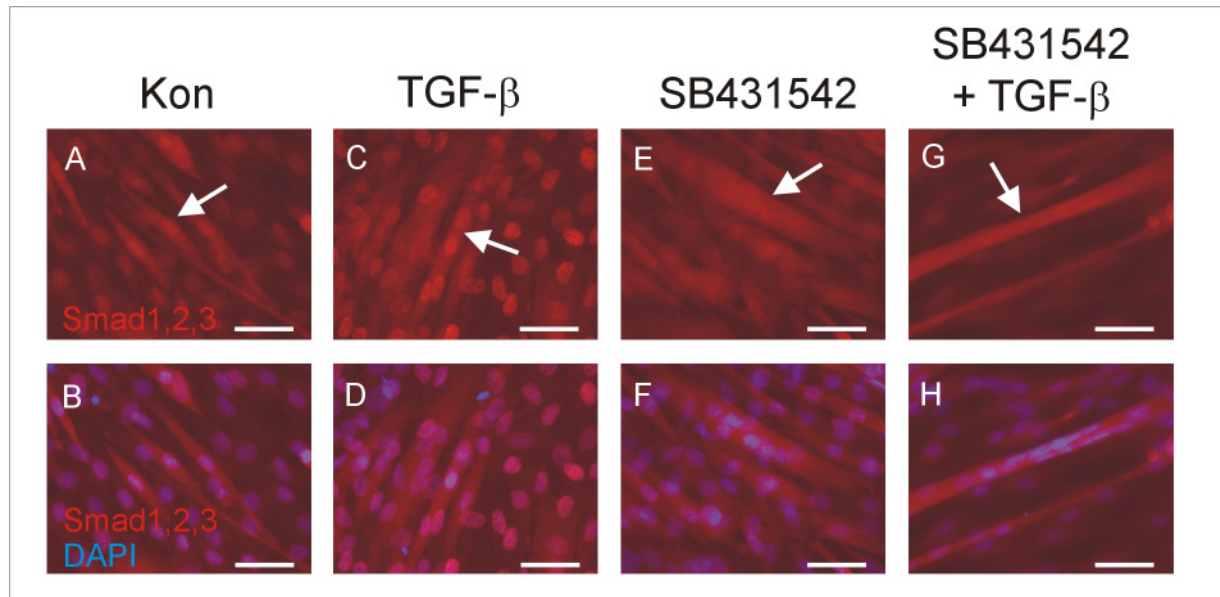


Abb. 17 Differenzierte C2C12-Zellen sind TGF-β-responsiv.

(A, C, E, G) Immunzytochemische Darstellung von Smad1,2,3. Unter Kontroll-Bedingungen war eine Lokalisation von Smad1,2,3 im Zellkern zu beobachten (A, Pfeil). Nach der Stimulation mit TGF-β1 für 30 min war diese Lokalisation im Zellkern verstärkt festzustellen (C, Pfeil). Nach Inhibition des TβRI durch SB431542 war keine Lokalisation von Smad1,2,3 im Zellkern zu erkennen (E, Pfeil). Nach kombinierter Gabe von SB431542 und TGF-β1 war ebenfalls keine Smad1,2,3-Lokalisation im Zellkern festzustellen (G, Pfeil).

(B, D, F, H) Immunzytochemische Darstellung von Smad1,2,3 und DAPI.

Differenzierte C2C12-Zellen besaßen unter allen Bedingungen eine langgestreckte Form und wiesen mehrere Zellkerne auf.

(Balken entspricht 50 µm)

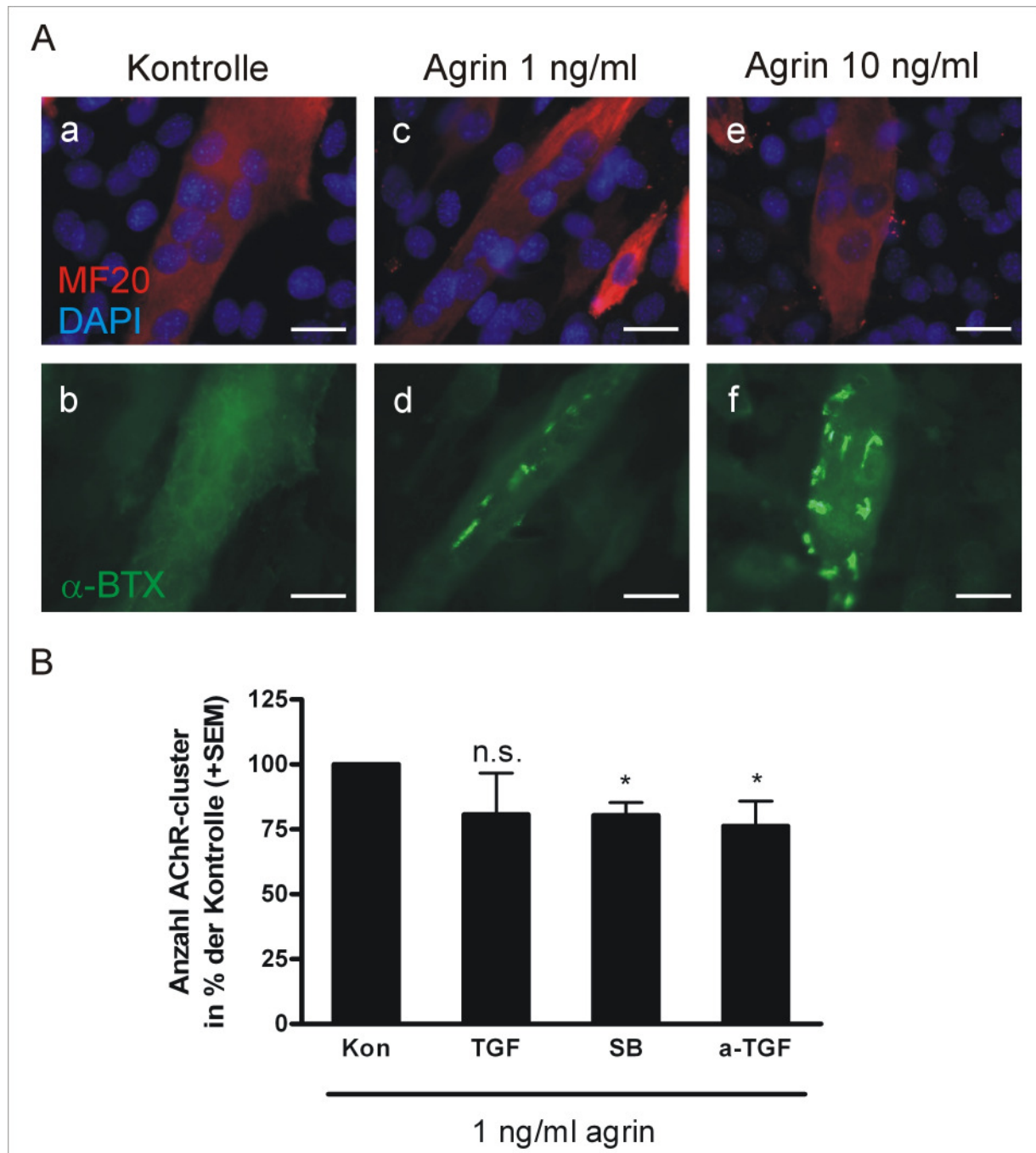


Abb. 18 Inhibition des TGF- β -Signalweges vermindert Agrin-induziertes AChR-Clustern in C2C12-Zellen.

(A) Differenzierte C2C12-Zellen waren MF20-positiv (a, c, e). Unter Kontroll-Bedingungen kam es nicht zu einem Clustern von AChR (b). Die Behandlung mit Agrin in einer Konzentration von 1 ng/ml (d) oder 10 ng/ml (f) für jeweils 6 Stunden führte konzentrationsabhängig zur Bildung von AChR-Clustern. (Balken entspricht 25 μ m)

(B) Zusätzlich zu Agrin wurde dem Medium TGF- β 1, der ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 und der neutralisierende Antikörper anti-TGF- β (1,2,3) zugesetzt und schließlich die Anzahl der AChR-Cluster pro differenzierter Zelle bestimmt und in % der Kontrolle ausgedrückt. TGF- β 1 veränderte die Anzahl nicht, SB431542 und anti-TGF- β (1,2,3) verringerten sie signifikant um 20 % bzw. 24 %.

4.5 Einfluss von TGF- β auf die Entwicklung zentraler Synapsen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von TGF- β 2 in der Synaptogenese zentraler Synapsen untersucht werden. Aufgrund der Tatsache, dass Synaptogenese im ZNS überwiegend postnatal stattfindet, jedoch zur Untersuchung der Rolle von TGF- β 2 nur embryonale TGF- β 2-defiziente Tiere zu Verfügung standen, musste für die Analyse ein Modellsystem gewählt werden, das bereits pränatal über funktionelle synaptische Verknüpfungen verfügt. Als ein solches Modell eignet sich der PreBötC in der ventralen Medulla, der Teil des zentralen respiratorischen Systems ist (Greer et al., 2006). Am Modell des PreBötC in einer akuten Hirnschnitt-Präparation wurde *in vivo* die Funktionalität der Synapsen in Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Mäusen untersucht.

4.5.1 Der Prä-Bötzinger-Komplex des zentralen respiratorischen Systems in *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen weist eine verminderte spontane Aktivität und synaptische Transmission auf (in Kollaboration mit V. Sargsyan)

Um die Funktionalität von zentralen Synapsen in Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen am E 18,5 zu untersuchen, wurden *patch-clamp*-Ableitungen im Ganzzell-Modus durchgeführt um die spontane synaptische Aktivität aufzuzeichnen. Die Ableitungen wurden von Neuronen des PreBötC in akuten koronaren Hirnschnitten der ventralen Medulla vorgenommen, die den Nkl. ambiguus und den Nkl. hypoglossus enthielten (vergleiche Abb. 19 A). Der PreBötC liegt ventro-lateral des Nkl. ambiguus.

Alle elektrophysiologischen Messungen wurden von Vardanush Sargsyan (Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Göttingen) durchgeführt.

Um die gesamte spontane Aktivität innerhalb der Schnitt-Präparation zu untersuchen, wurden spontane postsynaptische Ströme abgeleitet (*spontaneous postsynaptic currents*, sPSC). Die aufgezeichneten sPSC spiegeln die Aktivität des PreBötC-Netzwerkes wider und geben so Aufschluss über dessen Integrität. Zusätzlich wurden bei den Ableitungen pharmakologisch isolierte GABAerge/glyzinerge Ströme (*spontaneous inhibitory postsynaptic currents*, sIPSC) und glutamaterge Ströme (*spontaneous excitatory postsynaptic currents*, sEPSC) gemessen. Unter jeder Bedingung wurden auch so genannte Miniatur-Ströme aufgezeichnet, die entstehen, wenn nach Blockade aller Na⁺-Ströme durch Tetrodotoxin auf der präsynaptischen Seite des gepatchten Neurons spontan ein einzelnes synaptisches Vesikel ausgeschüttet wird (*miniature inhibitory postsynaptic currents*, mIPSC beziehungsweise *miniature excitatory postsynaptic currents*, mEPSC). Nach der Blockade der Na⁺-Ströme ist das gepatchte Neuron sozusagen vom Rest des Netzwerkes

abgeschnitten und die abgeleiteten postsynaptischen Ströme spiegeln die Vorgänge an den unmittelbar beteiligten Synapsen des Neurons wider und lassen damit Rückschlüsse auf deren Integrität zu.

In akuten Hirnschnitten von Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Mäusen wurden sPSC, sIPSC, sEPSC, mIPSC sowie mEPSC aufgezeichnet und die Frequenz und die Amplitude der Ströme bestimmt. In Abb. 19 sind für jede Art von Messung exemplarisch Spuren einer Ableitung sowie die quantitative Auswertung der Messergebnisse (Mittelwert \pm SEM) dargestellt. Die numerischen Werte sind in Tab. 4 angegeben. Im Vergleich von TGF- β 2-defizienten Embryonen mit Wildtypen zeigte sich eine signifikante Reduktion von 56 % der Frequenz der sPSC (Abb. 19 C), sowie eine signifikante Reduktion der sPSC-Amplitude um 27 % (Abb. 19 D).

Die Frequenz pharmakologisch isolierter spontaner GABAerger/glyzinerger postsynaptischer Ströme (sIPSC) war in den *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen signifikant um 75 % erniedrigt (Abb. 19 F) und ihre Amplitude war signifikant um 17 % verringert (Abb. 19 G).

Die Frequenz pharmakologisch isolierter spontaner glutamaterger postsynaptischer Ströme (sEPSC) war in den *Tgf- β 2*^{-/-}-Mäusen signifikant um 75 % vermindert (Abb. 19 I), während es zu keiner signifikanten Änderung der Amplitude kam (Abb. 19 J).

Die Ableitung pharmakologisch isolierter Miniatur-Ströme zeigte in den *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen eine signifikante Reduktion der Frequenz von mIPSC um 47 % (Abb. 19 L) bei unveränderter Amplitude (Abb. 19 M). Die Frequenz von mEPSC war signifikant um 54 % erniedrigt (Abb. 19 O) und die mEPSC-Amplitude war signifikant um 19 % vermindert (Abb. 19 P).

Zusammengefasst zeigten die funktionellen (elektrophysiologischen) Untersuchungen der synaptischen Kontakte in der Region des PreBötC von TGF- β 2-defizienten Embryonen eine deutliche Beeinträchtigung der Netzwerk-Aktivität einerseits und der synaptischen Transmission andererseits. Es war sowohl GABAerge/glyzinerge als auch glutamaterge Transmission betroffen.

Tab. 4 Zusammenfassung der abgeleiteten postsynaptischen Ströme in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen.

		Frequenz ± SEM in Hz	Amplitude ± SEM in pA
sPSC	Wildtyp	6,71 ± 0,15	137,6 ± 1,96
	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	2,94 ± 0,01	100,5 ± 1,82
sIPSC	Wildtyp	7,30 ± 0,14	121,5 ± 1,34
	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	1,83 ± 0,08	101,3 ± 2,45
sEPSC	Wildtyp	3,62 ± 0,14	41,74 ± 0,70
	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	0,91 ± 0,06	39,89 ± 0,84
mIPSC	Wildtyp	0,41 ± 0,05	63,03 ± 4,47
	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	0,22 ± 0,02	67,88 ± 0,84
mEPSC	Wildtyp	0,30 ± 0,06	45,06 ± 3,41
	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	0,14 ± 0,02	36,60 ± 2,20

Abb. 19 Patch-Clamp-Ableitungen (Ganzzell-Modus) von spontaner Gesamtaktivität sowie spontaner inhibitorischer und exzitatorischer synaptischer Transmission.

(A) Schematische Seitenansicht des Gehirns der Maus und Darstellung eines koronalen Schnittes der ventralen Medulla mit Lokalisation des PreBötC (rot), in dem die spontanen postsynaptischen Ströme in Neuronen mittels einer *Patch-clamp*-Elektrode abgeleitet wurden. Amb: Nkl. ambiguus, XII: Nkl. hypoglossus [Abbildung verändert nach Richter und Spyer (2001)]

(B, C, D) Repräsentative Aufzeichnungen (B), Frequenz (C) und Amplitude (D) spontaner postsynaptischer Ströme (sPSC) in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen.

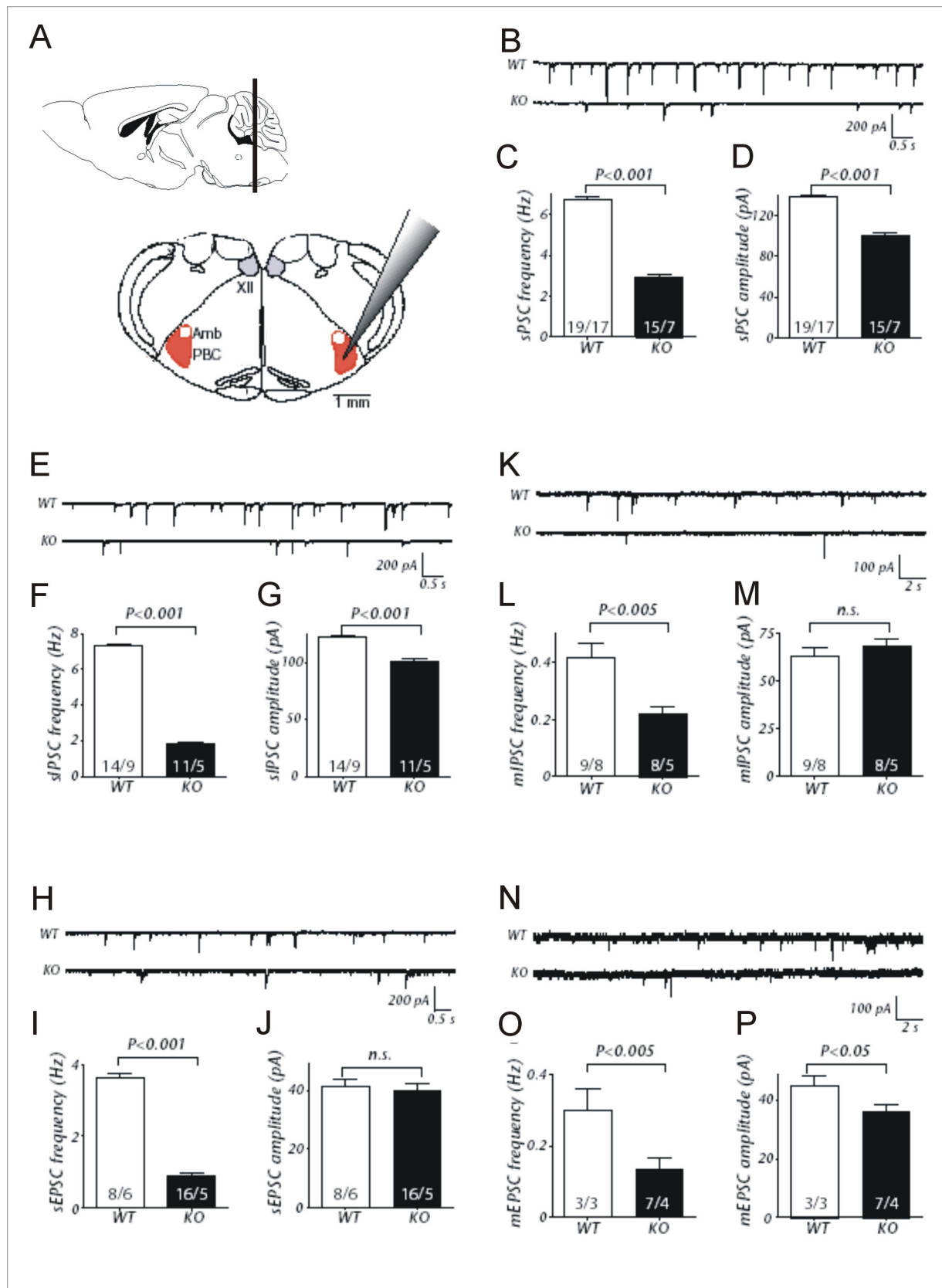
(E, F, G) Repräsentative Aufzeichnungen (E), Frequenz (F) und Amplitude (G) pharmakologisch isolierter spontaner GABAerger/glyzinerger postsynaptischer Ströme (sIPSC) in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen.

(H, I, J) Repräsentative Aufzeichnungen (H), Frequenz (I) und Amplitude (J) pharmakologisch isolierter spontaner glutamaterger postsynaptischer Ströme (sEPSC) in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen.

(K, L, M) Repräsentative Aufzeichnungen (K), Frequenz (L) und Amplitude (M) pharmakologisch isolierter spontaner GABAerger/glyzinerger postsynaptischer Miniatur-Ströme (mIPSC) in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen.

(N, O, P) Repräsentative Aufzeichnungen (N), Frequenz (O) und Amplitude (P) pharmakologisch isolierter spontaner glutamaterger postsynaptischer Miniatur-Ströme (mEPSC) in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen.

In den Balken sind die Anzahl der gepatchten Zellen und die Anzahl der untersuchten Tiere angegeben.



4.5.2 Die Struktur und Zytoarchitektur der ventralen Medulla sind in TGF- β 2-defizienten Embryonen nicht verändert

Die funktionelle Beeinträchtigung der synaptischen Transmission im PreBötC von TGF- β 2-defizienten Tieren kann mehrere Ursachen haben. So könnte einerseits eine gestörte Synaptogenese, andererseits eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Synapsen die Befunde erklären. Um auszuschließen, dass eine Veränderung der beteiligten Gehirnstrukturen zugrunde liegt, wurden Gefrier-Schnitte von Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Gehirnen angefertigt und das Gebiet des PreBötC in der ventralen Medulla wurde zunächst histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Abb. 20 A und B zeigen eine Nissl-Färbung von frontalen Schnitten durch das Gehirn von Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen am E 18,5. Die Region der ventralen Medulla wies eine vergleichbare Zytoarchitektur auf. Die Pfeile markieren den Nkl. ambiguus, der ebenfalls in der Ausschnittsvergrößerung dargestellt ist. In den Gehirnen von Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Embryonen waren dort große, dunkel gefärbte Motoneurone zu erkennen.

Eine Darstellung der Neurone mittels einer immunzytochemischen Darstellung von NF 150 kD ist Abb. 20 C und D zu entnehmen. Auch diese Darstellung zeigte keine Auffälligkeiten bei einem Vergleich von Wildtyp- und *Tgf- β 2*^{-/-}-Gehirnen.

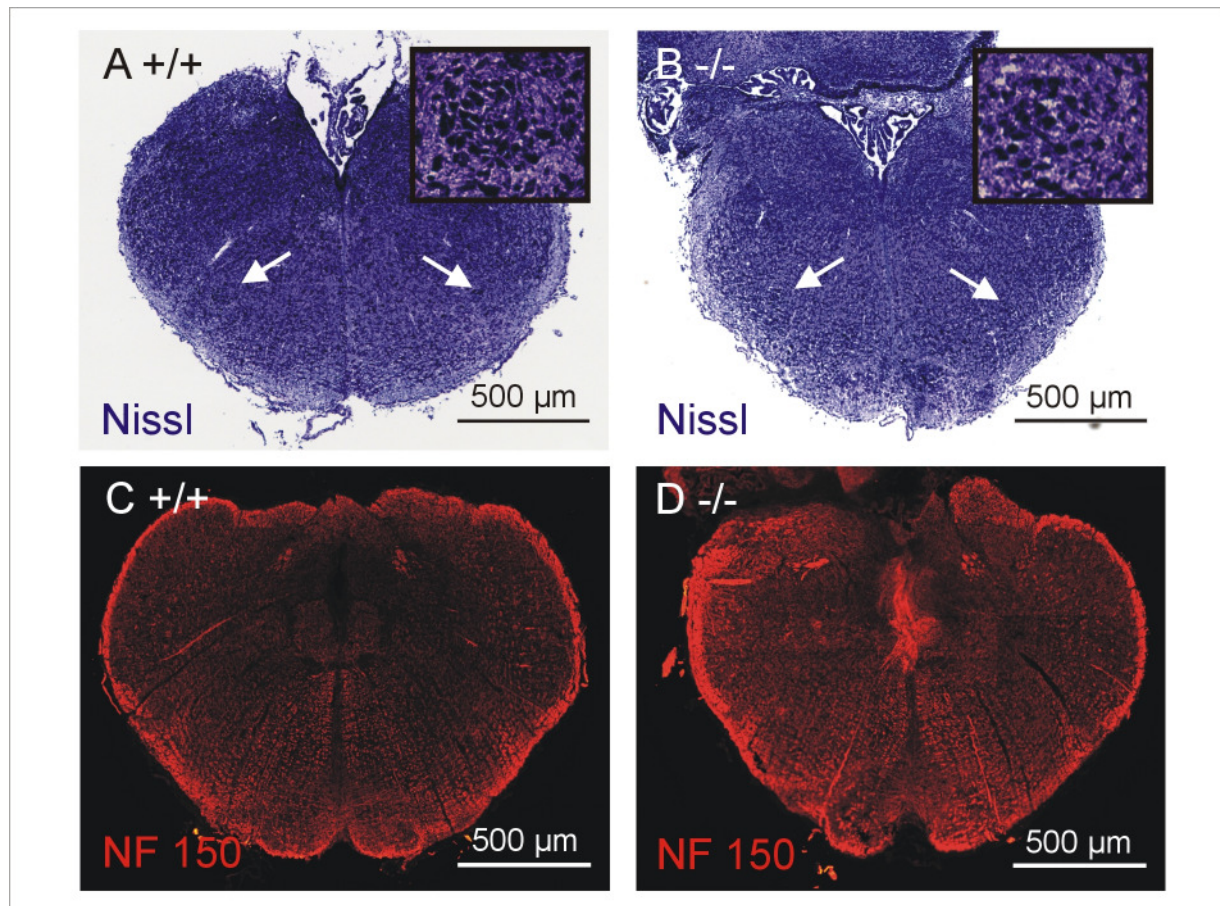


Abb. 20 Histologische Darstellung (Nissl-Färbung) und Darstellung von NF 150 kD-positiven Neuronen in der ventralen Medulla von Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5.

(A, B) Nissl-Färbung von frontalen Schnitten durch die ventrale Medulla in Wildtyp- (A) und TGF- β 2-defizienten Tieren (B). Die Gehirne zeigten eine vergleichbare Struktur und Zytoarchitektur. Das Kerngebiet des Nkl. ambiguus konnte in Wildtyp- und TGF- β 2^{-/-}-Gehirnen durch dunkel angefärbte Motoneurone (Pfeile und Ausschnittsvergrößerung) identifiziert werden.

(C, D) Die Darstellung von Neuronen in Gehirnen von Wildtyp- (C) und TGF- β 2^{-/-}-Embryonen mittels immunzytochemischem Nachweis von NF 150 kD (D) zeigte keine Unterschiede.

4.5.3 Die Anzahl von Synaptophysin-positiven Synapsen ist in TGF- β 2-defizienten Tieren erhöht

Um zu untersuchen, ob die funktionelle Beeinträchtigung der synaptischen Transmission im PreBötC in TGF- β 2-defizienten Tieren auf einen Defekt in der Synaptogenese zurückzuführen ist, wurden Synapsen durch verschiedene synaptische Proteine in Hirnschnitten von embryonalen Tieren immunhistochemisch dargestellt. Als Marker wurden Synaptophysin, Synapsin, vGlut2 (vesikulärer Glutamattransporter) und vGat (vesikulärer GABA-Transporter) verwendet. Diese Proteine sind alle auf der präsynaptischen Seite lokalisiert; vGlut2 ist spezifisch für exzitatorische, vGat für inhibitorische Synapsen.

Wie die elektrophysiologischen Ableitungen wurden auch die immunhistochemischen Untersuchungen im Gebiet des PreBötC durchgeführt. Da der PreBötC ventro-lateral des Nkl. ambiguus liegt, wurde dieser in Nissl-gefärbten Schnitten identifiziert und die immunhistochemischen Färbungen wurden in konsekutiven Schnitten durchgeführt.

Zur quantitativen Auswertung wurden pro Tier jeweils in der linken und rechten Gehirnhälfte Aufnahmen im Gebiet des PreBötC mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemacht. Die Bilder wurden zur Analyse in die ImageJ-Software importiert. Nach der manuellen Festlegung eines Schwellenwertes wurde eine Partikelanalyse durchgeführt. Anschließend wurde die Anzahl und die Größe der Partikel pro Tier gemittelt und zwischen Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen verglichen.

In Abb. 21 sind die immunhistochemischen Darstellungen der einzelnen synaptischen Proteine (Synaptophysin, Synapsin I/II, vGlut2 und vGat) wiedergegeben. Es zeigte sich, dass die untersuchten synaptischen Proteine in den Gehirnen der Wildtypen sowie der TGF-β2-defizienten Tiere am E 18,5 exprimiert waren. Die Ergebnisse der durchgeführten Partikelanalyse sind in Tab. 5 und in Abb. 22 zusammengefasst. Die Anzahl der Synaptophysin-positiven Synapsen war in den *Tgf-β2*^{-/-}-Gehirnen signifikant verdoppelt. Die Anzahl Synapsin I/II- und vGlut2-positiver Synapsen war in den *Tgf-β2*^{-/-}-Tieren tendenziell erhöht und die Anzahl vGat-positiver Synapsen unverändert. Die Größe der Synaptophysin-, Synapsin I/II- und vGlut2-positiven Synapsen war in *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen tendenziell erhöht, während die Größe vGat-positiver Synapsen nicht verändert war.

Die Bestimmung der Synapsenanzahl und -größe im PreBötC TGF-β2-defizienter Mäuse ließ daher nicht auf eine gestörte Synaptogenese im Sinne einer Verminderung dieser Parameter schließen. Tendenziell waren die Anzahl sowie die Größe der Synapsen eher erhöht.

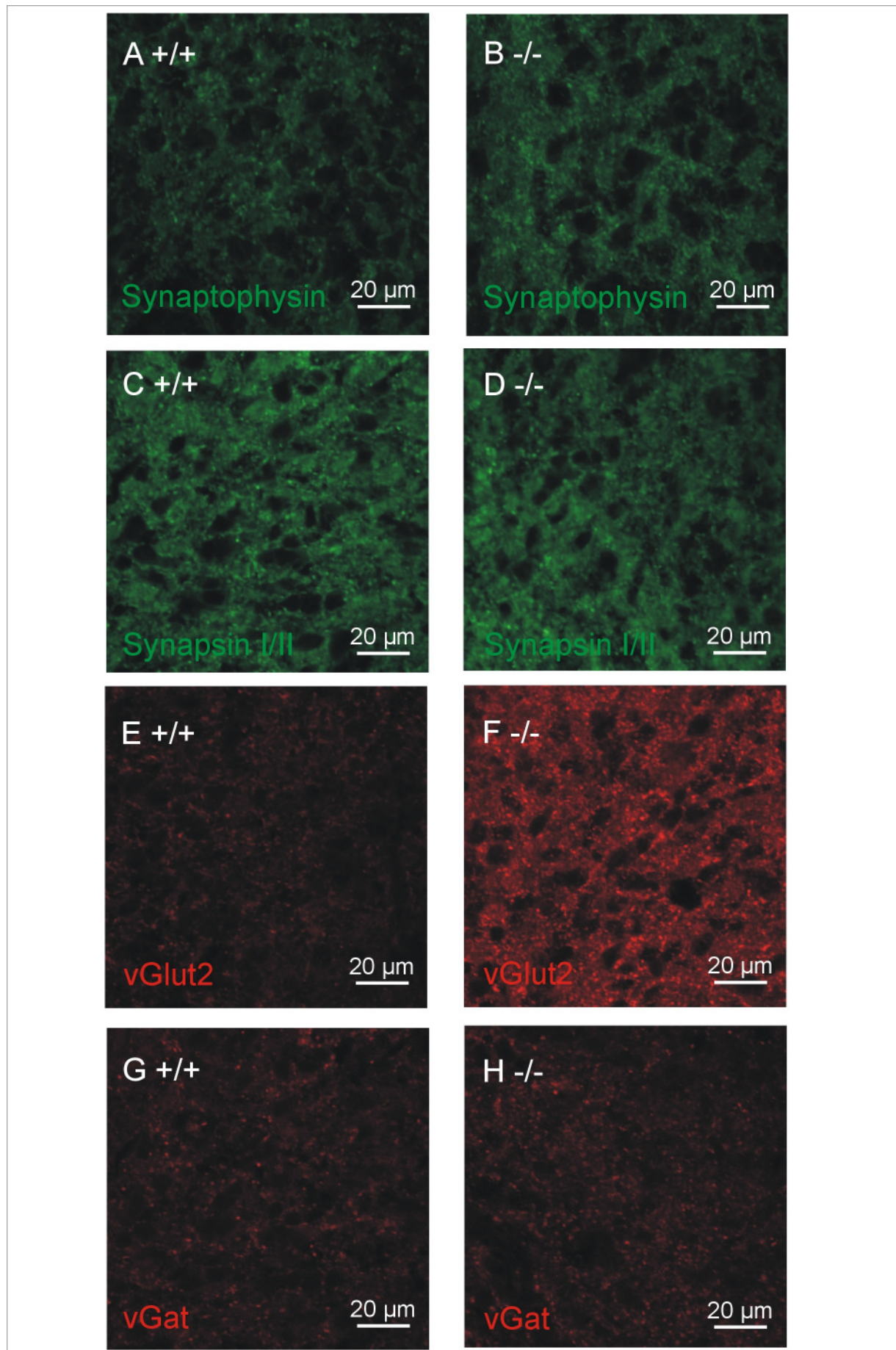
Abb. 21 Immunhistochemische Darstellung verschiedener synaptischer Proteine in der ventralen Medulla im Bereich des Prä-Bötzinger-Komplexes.

(A, B) Immunhistochemische Darstellung von Synaptophysin in Wildtyp- (A) und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen (B) im Bereich des PreBötC.

(C, D) Immunhistochemische Darstellung von Synapsin I/II in Wildtyp- (C) und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen (D) im Bereich des PreBötC.

(E, F) Immunhistochemische Darstellung von vGlut2 in Wildtyp- (E) und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen (F) im Bereich des PreBötC.

(G, H) Immunhistochemische Darstellung von vGat in Wildtyp- (G) und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen (H) im Bereich des PreBötC.



Tab. 5 **Synapsenzahl und -größe im Prä-Bötzing-Komplex in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen am Embryonaltag 18,5.**

		Synaptophysin	Synapsin I/II	vGlut2	vGat
Anzahl ± SEM	Wildtyp	196 ± 38	115 ± 37	164 ± 70	76 ± 30
	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	403 ± 33	195 ± 69	444 ± 150	77 ± 26
	n = 3	<i>P</i> < 0,05	n.s.	n.s.	n.s.
Größe ± SEM (in μm ²)	Wildtyp	0,802 ± 0,105	0,888 ± 0,091	0,548 ± 0,020	0,506 ± 0,032
	<i>Tgf-β2</i> ^{-/-}	1,217 ± 0,141	1,169 ± 0,304	0,820 ± 0,149	0,471 ± 0,029
	n = 3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

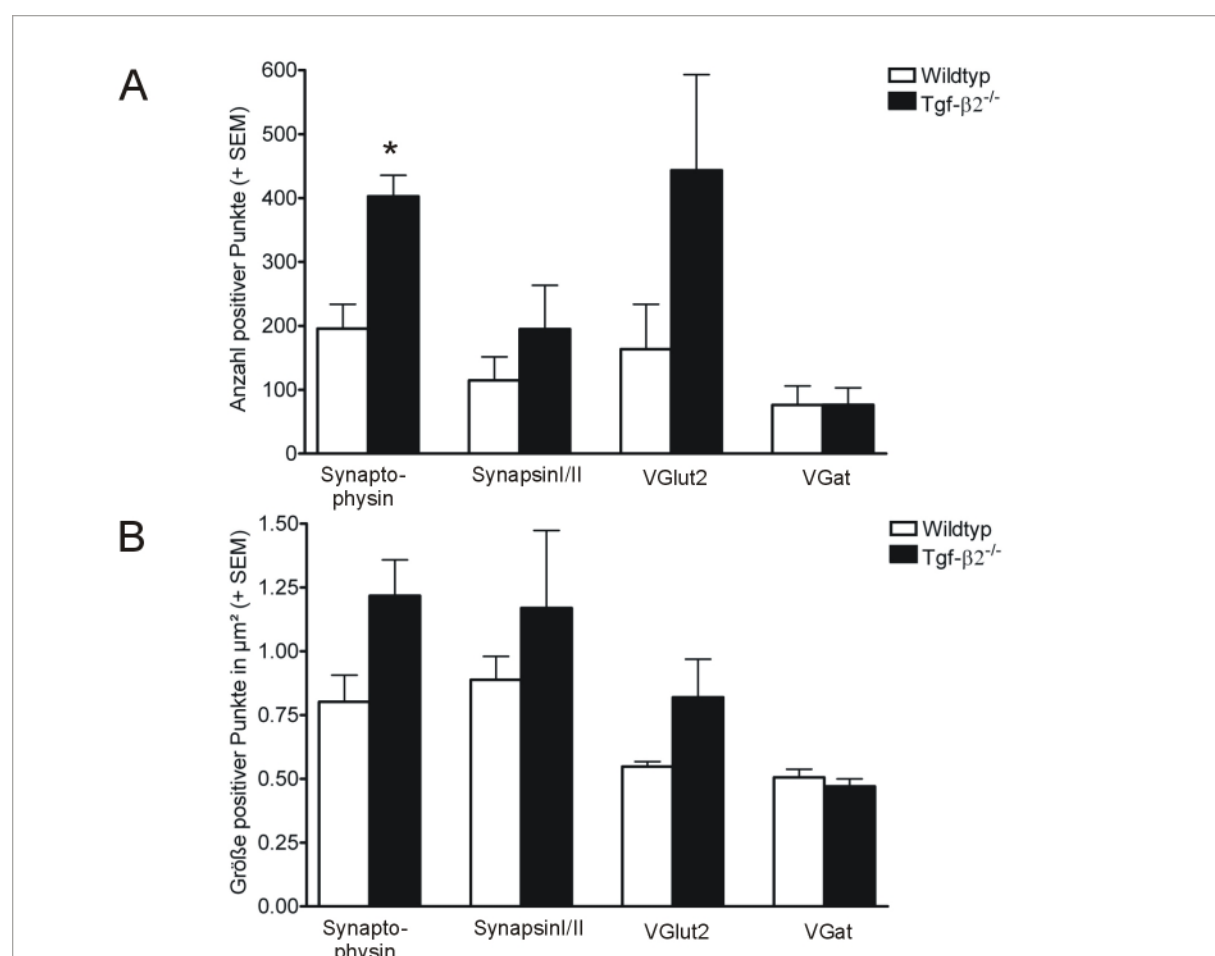


Abb. 22 **Quantitative Bestimmung der Anzahl und Größe von Synapsen, die durch verschiedene synaptischer Proteine dargestellt wurden, in der ventralen Medulla im Bereich des Prä-Bötzing-Komplexes.**

(A) Anzahl der Synapsen im PreBötC in Wildtyp- und *TGF-β2*^{-/-}-Embryonen am E 18,5.

(B) Größe der Synapsen im PreBötC in Wildtyp- und *TGF-β2*^{-/-}-Embryonen am E 18,5.

Für Synaptophysin-, Synapsin- und vGlut2-positive Synapsen zeigte sich tendenziell eine erhöhte Anzahl und Größe der Synapsen, die Erhöhung der Synaptophysin-positiven Synapsen war dabei signifikant. Die Anzahl und Größe vGat-positiver Synapsen im PreBötC embryonaler *Tgf-β2*^{-/-}-Tiere blieb im Vergleich zum Wildtyp unverändert.

4.5.4 Einfluss von TGF- β 1 und anti-TGF- β (1,2,3) auf die Anzahl und Größe von Synapsen *in vitro*

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem für die Synapsen des PreBötC beobachteten Effekt von TGF- β 2 um einen spezifischen Effekt handelt, oder ob ähnliche Ergebnisse auch in einem anderen Modell erzielt werden könnten, wurde getestet, ob die Synapsenanzahl und -größe in hippokampalen Neuronen *in vitro* durch TGF- β beeinflusst werden. Dazu wurden hippokampale Neurone während ihrer Differenzierung in Kultur alle drei Tage mit rekombinantem TGF- β oder dem neutralisierenden Antikörper anti-TGF- β (1,2,3), der endogenes TGF- β neutralisiert, behandelt.

Um die Responsivität der hippokampalen Neurone auf TGF- β zu untersuchen, wurde zunächst getestet, ob der TGF- β -Rezeptor Typ II (T β RII), der für die TGF- β -Signaltransduktion benötigt wird, in den Neuronen lokalisiert ist. Außerdem wurde untersucht, welche Smad-mRNA von den Neuronen exprimiert wird und ob es nach TGF- β -Stimulation zu einer Phosphorylierung von Smad2 kommt. Diese wird für die Translokation des Smad-Komplexes in den Nukleus benötigt.

Abb. 23 A-a zeigt, dass der T β RII in hippokampalen Neurone eine perinukleäre Lokalisation aufwies. Die Gegenfärbung (Abb. 23 A-c) mit einem Golgi-Apparat-spezifischen Antikörper (Golgi 58k, Abb. 23 A-b) zeigte, dass es sich bei dieser Lokalisation um Kompartimente des Golgi-Apparates handelte. Diese Lokalisation des T β RII im Golgi-Apparat stimmt mit den Beobachtungen anderer Autoren überein, die zeigten, dass zumindest in MLEC (*mink lung epithelial cells*)-Zellen 90 % der neu synthetisierten T β RII-Moleküle im Golgi-Apparat einer Modifizierung (N-Glykolisierung) unterzogen wurden (Wells et al., 1997).

Wie in Abb. 23 B dargestellt ist, exprimierten hippokampale Neurone die mRNA für Smad1, -2, -3, 4 und -7. Die Menge an Smad1 und Smad3 war dabei im Vergleich zu der von Smad2, -4 und -7 höher.

Abb. 23 C zeigt die Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von Smad2 in hippokampalen Neuronenkulturen nach der Stimulation mit TGF- β 1. Es war zu beobachten, dass es nach 30-minütiger Stimulation mit TGF- β 1 (2 ng/ml) zu einer Phosphorylierung von Smad2 kam. Dies wurde verhindert, wenn gleichzeitig der ALK4,5,7-Inhibitor SB431542 verwendet wurde.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die hippokampalen Neurone *in vitro* auf TGF- β 1 in der verwendeten Konzentration responsiv sind.

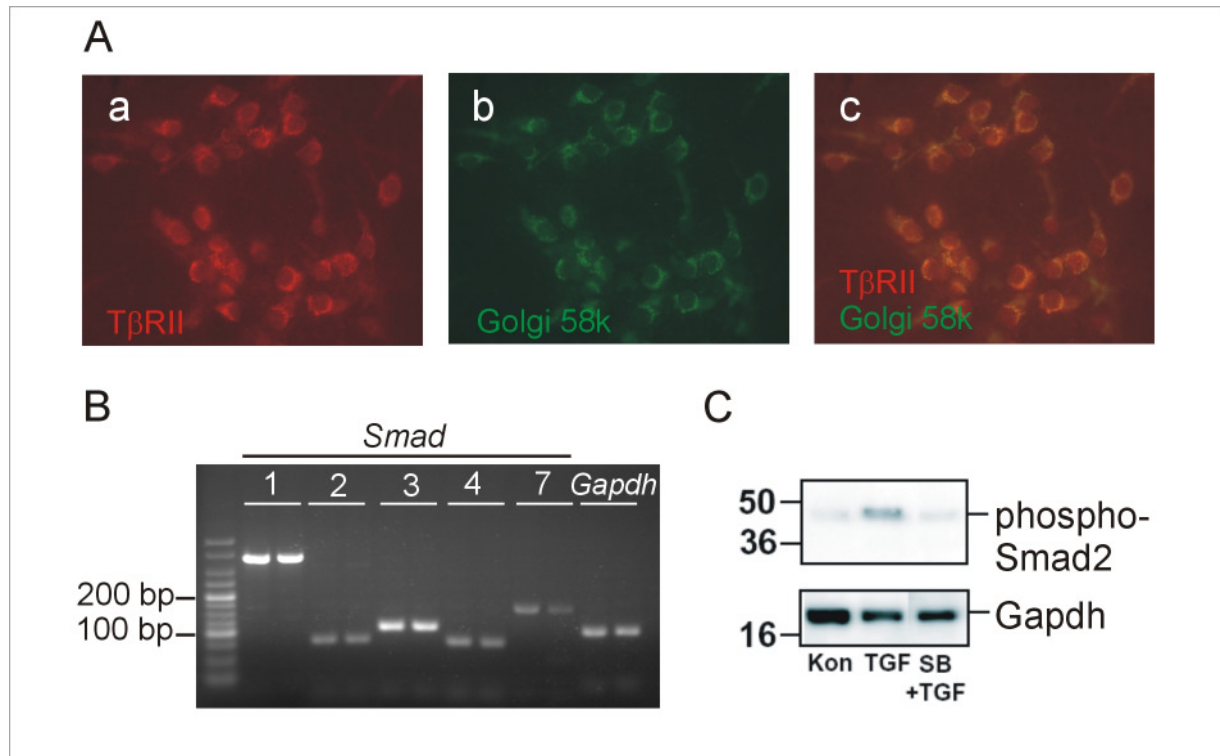


Abb. 23 Hippokampale Neurone sind mit Molekülen zur TGF- β -Signaltransduktion ausgestattet und nach TGF- β -Stimulation kommt es zur Phosphorylierung von Smad2.

(A) Der T β RII war überwiegend in Golgi-Kompartimenten lokalisiert, wie die Doppelfärbung mit dem Golgi-Marker Protein 58k zeigte.

(B) Hippokampale Neurone exprimierten die mRNA für Smad1, Smad3 und für Smad2, Smad4 und Smad7 in jeweils vergleichbaren Mengen. Es wurden jeweils Proben aus zwei unabhängigen RNA-Isolierungen verwendet.

(C) Nach 30-minütiger Stimulation mit TGF- β 1 kam es zur Phosphorylierung von Smad2. Diese konnte bei gleichzeitiger Verwendung des ALK4,5,7-Inhibitors SB431542 verhindert werden.

Zur Untersuchung von Synapsenanzahl und -größe in hippocampalen Neuronen nach der Behandlung mit TGF- β 1 und dem neutralisierenden anti-TGF- β (1,2,3)-Antikörper wurden die Neurone in geringer Dichte ausgesät um eine spätere Quantifizierung der synaptischen Proteine zu ermöglichen. Für die Behandlung wurde dem Medium mit jedem Mediumwechsel alle drei Tage TGF- β 1 (2 ng/ml) oder der anti-TGF- β (1,2,3)-Antikörper (10 μ g/ml) zugesetzt. Die neutralisierende Wirkung des Antikörpers bei dieser Konzentration wurde zuvor bestimmt (Daten nicht gezeigt).

Die Neurone aus der Kontroll-, TGF- β - und anti-TGF- β -Gruppe wurden an verschiedenen Kulturtagen (DIV 5, 8 und 11) jeweils sechs Stunden nach der Behandlung fixiert. Synapsen wurden durch den immunzytochemischen Nachweis eines präsynaptischen (vGlut1) oder eines postsynaptischen Proteins (Gephyrin) dargestellt (siehe Abb. 24 A-L).

Zur Auswertung der Synapsenanzahl und -größe wurden einzelne Neurone mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop bei gleichbleibender Belichtungszeit fotografiert. Die Bilder wurden in die AnalySIS-Software (Soft-Imaging Systems) importiert. Nach der Binarisierung der Bilder wurde für jedes Bild manuell ein Schwellenwert festgelegt. Für die quantitative Auswertung wurde bei jedem Neuron die Anzahl und Größe von Synapsen, die auf dem Abschnitt vom Beginn eines primärer Dendriten bis zu seinem ersten Verzweigungspunkt lagen, bestimmt. Diese Distanz wurde gemessen und die Anzahl der Synapsen pro 10 μm angegeben. In Abb. 24 M-P sind die Anzahl und die Größe der Synapsen, die jeweils vGlut1- oder Gephyrin-positiv waren, unter Kontroll-Bedingungen und nach Gabe von TGF- β und anti-TGF- β (1,2,3) aufgetragen. Die genauen Werte sind in Tab. 6 zusammengefaßt. Es zeigte sich an allen Kulturtagen unter den getesteten Bedingungen kein Einfluss von TGF- β 1 oder anti-TGF- β (1,2,3) auf die Anzahl oder Größe vGlut1- oder Gephyrin-positiver Synapsen.

Tab. 6 Anzahl und Größe von Synapsen in hippocampalen Neuronen in vitro nach Behandlung mit TGF- β 1 und anti-TGF- β (1,2,3) an DIV 5, 8 und 11.

Mit Ausnahme der in Klammern gesetzten Daten wurden alle Werte in drei unabhängigen Experimente ermittelt.

Mittelwert \pm SEM		vGlut1		Gephyrin	
		Anzahl pro 10 μm	Größe in μm^2	Anzahl pro 10 μm	Größe in μm^2
DIV 5	Kontrolle	1,782 \pm 0,167	0,507 \pm 0,003	(1,110)	(0,760)
	TGF- β 1	2,311 \pm 0,136	0,538 \pm 0,059	(1,124)	(0,668)
	anti-TGF- β (1,2,3)	(2,5920)	(0,5685)	(0,930)	(0,648)
DIV 8	Kontrolle	2,454 \pm 0,144	0,723 \pm 0,073	2,282 \pm 0,501	0,761 \pm 0,089
	TGF- β 1	2,386 \pm 0,243	0,482 \pm 0,037	1,997 \pm 0,305	0,799 \pm 0,112
	anti-TGF- β (1,2,3)	1,856 \pm 0,358	0,603 \pm 0,036	1,981 \pm 1,159	0,815 \pm 0,171
DIV 11	Kontrolle	3,072 \pm 0,408	0,812 \pm 0,163	2,721 \pm 0,340	0,859 \pm 0,156
	TGF- β 1	2,318 \pm 0,742	0,802 \pm 0,135	2,428 \pm 0,409	0,918 \pm 0,142
	anti-TGF- β (1,2,3)	3,358 \pm 0,307	0,732 \pm 0,112	2,721 \pm 0,940	0,752 \pm 0,051

Abb. 24 vGlut1- und Gephyrin-positive Synapsen in primären hippocampalen Neuronenkulturen an DIV 5, 8 und 11 nach der Behandlung mit TGF- β 1 und anti-TGF- β (1,2,3).

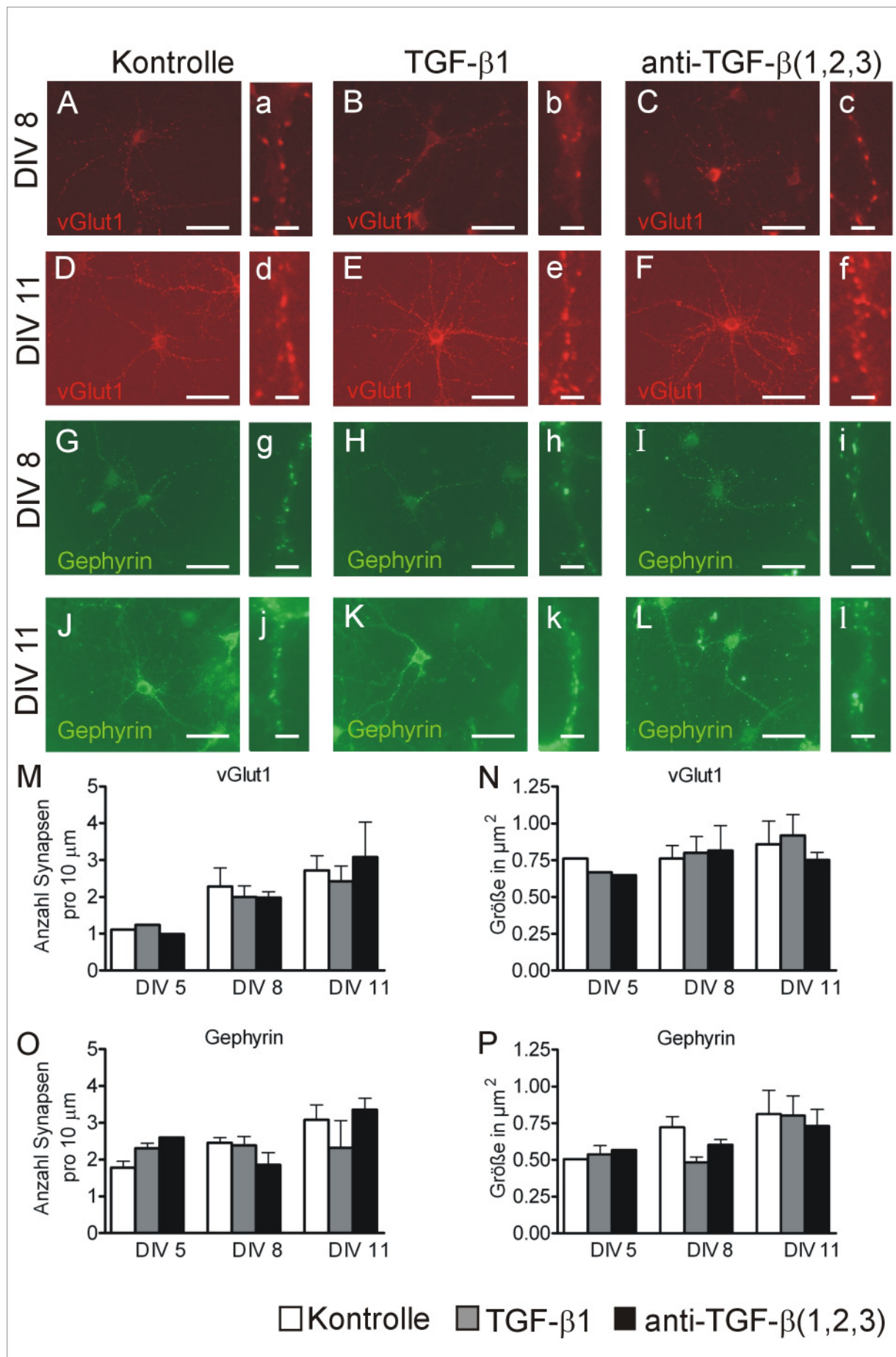
(A-F) vGlut1-positive Synapsen an DIV 8 (A-C) und an DIV 11 (D-F) unter Kontroll-Bedingungen (A, D), nach Behandlung mit TGF- β 1 (B, E) und mit anti-TGF- β (1,2,3) (C, F).

(G-L) Gephyrin-positive Synapsen an DIV 8 (G-I) und an DIV 11 (J-L) unter Kontroll-Bedingungen (G, J), nach Behandlung mit TGF- β 1 (H, K) und mit anti-TGF- β (1,2,3) (I, L).

(a-l) Ausschnittsvergrößerung eines primären Dendriten. (Balken in A-L 50 μm , in a-l 5 μm)

(M, O) Anzahl vGlut1-positiver (M) und Gephyrin-positiver (O) Synapsen an DIV 5, 8 und 11.

(N, P) Größe von vGlut1-positiven (N) und Gephyrin-positiven (P) Synapsen an DIV 5, 8 und 11.



4.6 Modulation der Funktion von Synapsen durch Phosphorylierung von Synapsin

Die beobachtete Beeinträchtigung der synaptischen Transmission im PreBötC von TGF- β 2-defizienten Embryonen (siehe Abschnitt 4.5.1) kann verschiedene Ursachen haben. So könnte einerseits eine gestörte Synaptogenese, andererseits eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Synapsen die Befunde erklären. Da nach der Untersuchung der Synaptogenese im PreBötC ein Synaptogenese-Defekt als Grundlage der funktionellen Störungen ausgeschlossen wurde, wurde die zweite Möglichkeit, d.h. eine Beeinträchtigung der Funktionalität der Synapsen untersucht.

Die Funktionalität von Synapsen hängt entscheidend von einer intakten Exo- und Endozytose der Neurotransmitter-Vesikel ab (Südhof, 2004). Ein entscheidender Faktor in der Regulation der Neurotransmitter-Freisetzung ist die Phosphorylierung und anschließende Umverteilung von Synapsin (Chi et al., 2001). Ein Einfluss von TGF- β 1 auf die Phosphorylierung und Lokalisation von Synapsin konnte in *Aplysia* bereits nachgewiesen werden (Chin et al., 2002). Es wurde daher geprüft, ob eine Stimulation mit TGF- β 1 auch in primären hippocampalen Neuronen aus Maus-Embryonen die Phosphorylierung und Lokalisation von Synapsin beeinflusst. Dazu wurden hippocampale Neurone an DIV 10 für 30 oder 60 Minuten mit TGF- β 1 (2 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen entweder fixiert um phospho-Synapsin(Ser9) immunzytochemisch darzustellen oder die Zellen wurden lysiert um phospho-Synapsin(Ser9) in Western Blot-Analysen nachzuweisen. Abb. 25 A-D zeigen die immunzytochemische Darstellung von phospho-Synapsin(Ser9). Unter Kontroll-Bedingungen wurde eine distinkte, punktförmige Lokalisation von phospho-Synapsin(Ser9) an den Dendriten beobachtet (Abb. 25 A), die nach 30-minütiger Behandlung mit TGF- β 1 ebenfalls vorlag beziehungsweise in einigen Zellen vermehrt zu beobachten war (Abb. 25 B). Da Synapsin präsynaptisch lokalisiert ist, entspricht das Signal an den Dendriten den dort endenden Axonterminalien. Nach der Behandlung mit SB431542 allein (Abb. 25 C) oder in Kombination mit TGF- β 1 (Abb. 25 D) wurde statt dem punktförmigen Signal ein diffuseres, weniger intensives Signal an den Dendriten festgestellt.

Für die Western Blot-Analysen wurden die Zellen nach der Behandlung lysiert, die Proteine isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. Diese wurden mit dem Antikörper gegen phospho-Synapsin(Ser9) inkubiert. Dieser Antikörper detektiert eine Phosphorylierung von Ser9 in allen Synapsin-Isoformen (Ia, Ib, IIa und IIb). Als Ladekontrolle diente das Enzym GAPDH. Wie Abb. 25 E zeigt, kam es nach der Stimulation mit TGF- β 1 nach 30 und nach 60 Minuten zu einer verstärkten Phosphorylierung der IIb-Isoform von Synapsin. Zusätzlich wurden weitere Isoformen, IIa und Ib, an Ser9 phosphoryliert. Eine Stimulation der Neurone mit 55 mM KCl für 30 Minuten veränderte die Menge an phosphorylierten Synapsin-Isoformen nicht.

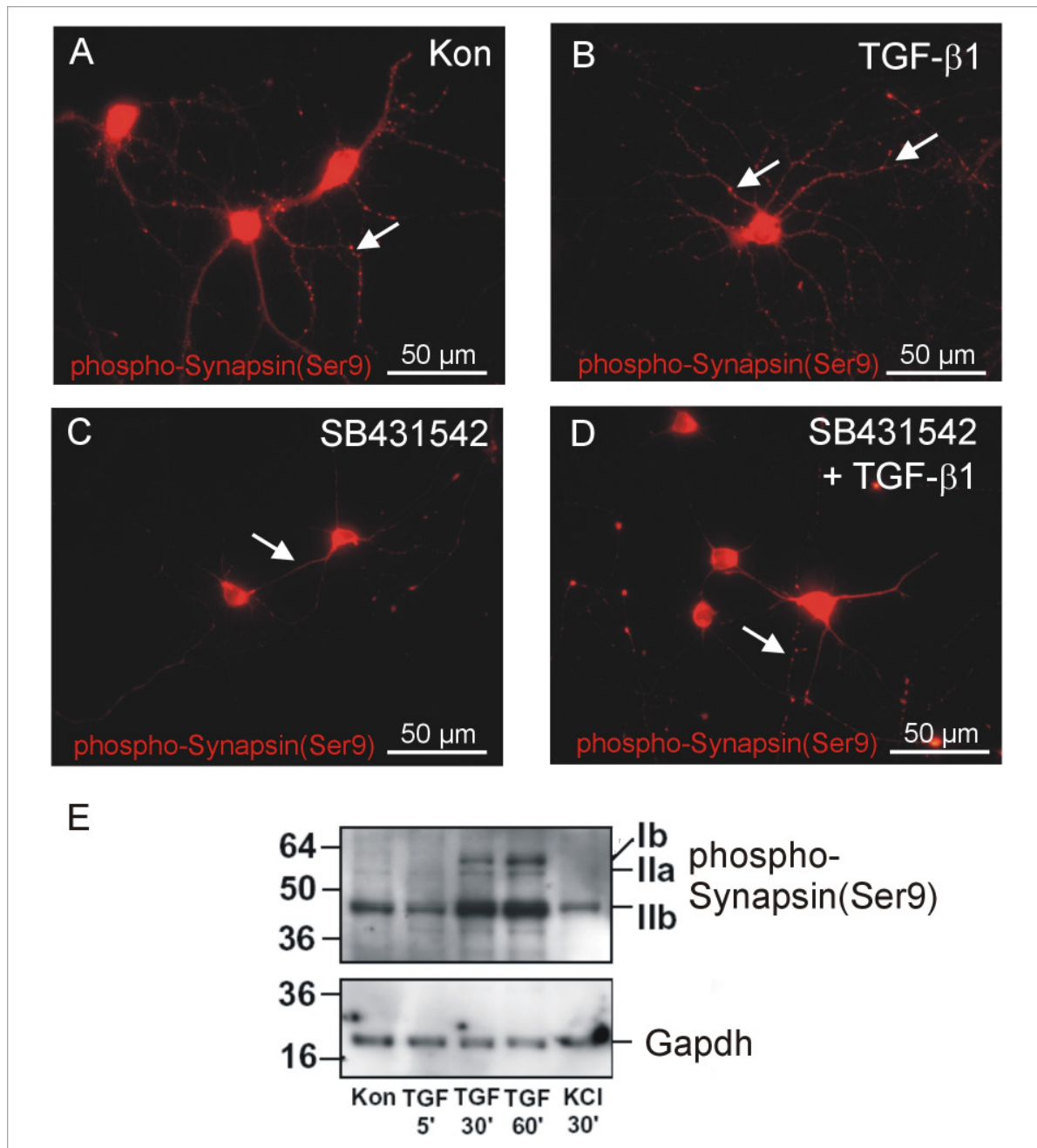


Abb. 25 Phosphorylierung von Synapsin in hippocampalen Neuronen nach Stimulation mit TGF- β .

(A, B, C, D) Immunzytochemische Darstellung von phospho-Synapsin(Ser9) in hippocampalen Neuronen. Unter Kontroll-Bedingungen wurde eine distinkte, punktförmige Lokalisation von phospho-Synapsin(Ser9) an den Dendriten beobachtet (A, Pfeil), die nach 30-minütiger Behandlung mit TGF- β 1 ebenfalls vorlag bzw. in einigen Zellen vermehrt zu beobachten war (B, Pfeile). Nach der Behandlung mit SB431542 allein (C) oder in Kombination mit TGF- β 1 (D) wurde kein punktförmiges Signal mehr beobachtet. Stattdessen war ein weniger abgegrenztes und weniger intensives Signal festzustellen (D, Pfeil).

(E) Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von Synapsin-Isoformen in hippocampalen Neuronen nach TGF- β -Behandlung für 5, 30 und 60 Minuten und nach Stimulation mit 55 mM KCl. Nach 30- und 60-minütiger Stimulation mit TGF- β 1 wurde eine verstärkte Phosphorylierung der IIb-Isoform, sowie eine zusätzliche Phosphorylierung der Isoformen Ib und IIa beobachtet. Die Stimulation mit KCl führte nicht zu einem veränderten Phosphorylierungsmuster (ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten).

5 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von TGF- β 2 in der Entstehung und Funktion von Synapsen im peripheren sowie im zentralen Nervensystem der Maus zu untersuchen.

Die für die Untersuchung gewählten TGF- β 2-defizienten Embryonen wiesen eine stark verminderte respiratorische Aktivität auf, die jedoch nicht auf eine morphologisch veränderte Innervation des Zwerchfells oder auf eine gestörte synaptische Integrität auf der Ebene einer einzelnen neuromuskulären Endplatten des Zwerchfells zurückgeführt werden konnte. Die Deletion von TGF- β 2 führte jedoch zu einer verminderten Anzahl neuromuskulärer Endplatten im Zwerchfellmuskel und zu einer beeinträchtigten Muskeldifferenzierung. Eine ebenfalls verminderte Anzahl von Agrin-induzierten AChR-Clustern wurde *in vitro* in C2C12-Zellen gefunden, nachdem der TGF- β -Signalweg blockiert wurde.

Die reduzierte Atemtätigkeit von TGF- β 2-defizienten Mäusen konnte mit einer gestörten Funktionalität des respiratorischen Netzwerkes in der ventralen Medulla und einer verminderten synaptischen Transmission zwischen den Neuronen des PreBötC in Verbindung gebracht werden. Dieser Defekt war jedoch nicht auf eine erniedrigte Anzahl der synaptischen Verbindungen dieser Neurone zurückzuführen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen TGF- β und der Funktionalität von Synapsen wurde in hippokampalen Neuronen aufgezeigt, in denen nach der Behandlung mit TGF- β eine verstärkte Phosphorylierung von Synapsin festgestellt wurde.

5.1 TGF- β 2 und die morphologische Entwicklung von Synapsen

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Deletion von TGF- β 2 zu einer veränderten Synaptogenese führt, wurden in der vorliegenden Arbeit die Morphologie der neuromuskulären Endplatte des Zwerchfells und Synapsen von Neuronen des PreBötC in der ventralen Medulla untersucht.

Am Zwerchfell sind Veränderungen des Verzweigungsmusters und der Faszikulation des N. phrenicus, der Innervation einzelner neuromuskulärer Endplatten, des Clusters von AChR und der Breite des zentralen Endplatten-Bandes Anzeichen einer veränderten Synaptogenese der neuromuskulären Endplatte. Diese Aspekte der prä- und postsynaptischen Reifung wurden daher in embryonalen Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Mäusen verglichen. Die Untersuchung erbrachte jedoch keine Unterschiede. So zeigte sich bei der Untersuchung der Zwerchfell-Innervation am E 18,5, dass der N. phrenicus in Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen eine ähnliche Faszikulation (Abb. 9) sowie ein ähnliches Verzweigungsmuster aufwies (siehe Abb. 10) und die Motoneuron-Terminalien die Endplatten in ähnlicher Weise innervierten (Abb. 15). Die Untersuchung der postsynaptischen Differenzierung wie dem *Prepatterning* von AChR am E 14,5 (Abb. 11)

sowie die AChR-Cluster-Bildung am E 18,5 erbrachte keine Unterschiede zwischen *Tgf-β2*^{-/-}- und Wildtyp- Embryonen (Abb. 12). Darüber hinaus waren die neuromuskulären Endplatten in Wildtyp- und *Tgf-β2*^{-/-}-Tieren in einem zentralen Endplatten-Band angeordnet (Abb. 14), das die gleiche halb-maximale Breite aufwies. Auch die Analyse von Schwannzellen in der Zwerchfellpräparation von *Tgf-β2*^{-/-}-Embryonen am E 18,5 erbrachte keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 16). Die Schwannzellen begleiteten den Nerv entlang seiner primären, sekundären und tertiären Aufzweigungen und bedeckten als terminale Schwannzellen den synaptischen Kontakt. Dies bedeutet, dass die Deletion von TGF-β2 nicht zu einer veränderten Morphologie der neuromuskulären Endplatte und der Innervation des Zwerchfells führt. Damit bestätigt sich die in der Einleitung beschriebene Hypothese, dass es zu einer Veränderung in der Faszikulation oder einem exzessivem Auswachsen der Motoneurone kommt, nicht. Somit kann dieser Befund einerseits dahingehend interpretiert werden, dass die Bedeutung der subsynaptischen Lokalisation von TGF-β2 nicht in einer Funktion als "Stop-Signal" liegt, das das Auswachsen der Motoneurone über die Endplatte hinaus verhindert. Dies wird durch die Beobachtung von McLennan und Mitarbeitern (2002) gestützt, die beschreiben, dass TGF-β2 an der neuromuskulären Endplatte nach einer Denervation durch eine Axotomie stark heraufreguliert wird. Denervierte Nervenenden sind bevorzugte Orte für vermehrtes Motor-Axon-Wachstum (Tornqvist und Aldskogius, 1994). Wäre TGF-β2 ein Signal, das das Auswachsen von Motoneuronen inhibiert, stünde dies nicht im Einklang mit seiner Heraufregulation nach einer Denervation (McLennan und Koishi, 2002). Andererseits kann das Ausbleiben einer Veränderung auch damit erklärt werden, dass TGF-β2 weder die Bildung von extrazellulärer Matrix noch die Morphologie der neuromuskulären Endplatte beeinflusst. Allerdings ist es ebenfalls möglich, dass die Deletion von TGF-β2 durch TGF-β1 und -β3 kompensiert werden kann und daher keine Veränderungen feststellbar sind. Eine solche Kompensation ist durchaus denkbar, da es an der neuromuskulären Endplatte mehrere Quellen für die verschiedenen Isoformen gibt (vergleiche Abb. 2), welche nach einer Beeinträchtigung des Kontaktes – wie er zum Beispiel durch eine Motoneuron-Axotomie hervorgerufen werden kann –, zusätzlich auch noch differentiell reguliert werden (McLennan und Koishi, 2002).

Obwohl in der vorliegenden Arbeit auf lichtmikroskopischer Ebene keine Anhaltspunkte für eine veränderte Morphologie der neuromuskulären Endplatte gefunden wurden, ist dennoch nicht auszuschließen, dass TGF-β2 ihre Ultrastruktur beeinflusst. Da sich auch in den *Drosophila*-Mutanten mit *Gbb*- oder *Wit*-Deletion viele Defekte erst auf ultrastruktureller Ebene zeigten, ist es möglich, dass dies auch nach der Deletion von TGF-β2 der Fall ist, falls TGF-β2 tatsächlich zu *Gbb* ortholog ist.

In der ventralen Medulla wurden als Parameter für Synaptogenese die Anzahl und Größe von Synapsen definiert. Daher wurden im Bereich des PreBötC in Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Tieren am E 18,5 diese Werte miteinander verglichen. Nach der Beobachtung, dass die Netzwerk-Aktivität und die synaptische Transmission im PreBötC von TGF- β 2-defizienten Embryonen stark vermindert ist, wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass dies auf eine verminderte Anzahl von Synapsen zurückzuführen ist. Überraschenderweise wurden jedoch bei den TGF- β 2-defizienten Embryonen signifikant mehr und größere Synaptophysin-positive, tendenziell mehr und vergrößerte Synapsin I/II- und vGlut2-positive und unverändert viele und große vGat-positive Synapsen gefunden (siehe Abb. 22 und Tab. 5). Dies bedeutet, dass die Deletion von TGF- β 2 nicht zu einer verminderten Synaptogenese führte.

Die Tatsache, dass teilweise mehr und größere Synapsen gefunden wurden, zeigt zunächst, dass es durch die Deletion von TGF- β 2 zu einem Verlust in diesem System kommt, der nicht kompensiert werden kann und daher eine Veränderung bewirkt. Dies spricht dafür, dass die Funktion, welcher Natur sie auch sein mag, wahrscheinlich TGF- β 2 zugeordnet werden kann. Im zentralen Nervensystem werden unter physiologischen Bedingungen nur die TGF- β -Isoformen - β 2 und - β 3 gebildet (Krieglstein et al., 2002). Trotz der überlappenden Expression sind die Funktionen der beiden Isoformen jedoch nicht unbedingt gleich und können sich daher nicht unbedingt kompensieren, wie beispielsweise in Untersuchungen des programmierten Zelltodes in der Retina gezeigt werden konnte (Dünker und Krieglstein, 2003). Der Verlust einer Isoform in der Retina führte nicht zu einer erhöhten Expression der jeweils anderen und der Einfluss von TGF- β 2 wirkte sich stärker auf den programmierten Zelltod aus als der von TGF- β 3.

Über mögliche Ursachen, die nach der Deletion von TGF- β 2 zu einer vermehrten Anzahl Synapsen führt, kann zur Zeit nur spekuliert werden. So könnte es sein, dass TGF- β 2 die Synapsenbildung inhibiert oder verzögert und so dem System die Möglichkeit gibt, vollständig zu differenzieren, bevor synaptische Kontakte ausgebildet werden. Ebenso ist es möglich, dass es sich um "falsche" oder "überflüssige" Synapsen handelt, deren Inaktivität bislang verhindert hat, dass sie eliminiert wurden. Während sich synaptische Aktivität nicht auf die initiale Synaptogenese auswirkt (Verhage et al., 2000), so ist sie dagegen für die Eliminierung von Synapsen von entscheidender Bedeutung (Goodman und Shatz, 1993). Die vermehrte Anzahl von Synapsen könnte jedoch auch ein Anzeichen für einen homöostatischen Effekt sein, bei dem das System versucht, die beeinträchtigte Funktionalität der Synapsen mit mehr Kontakten auszugleichen.

Um zu testen, ob TGF- β in einer weiteren Neuronenpopulation die Entstehung von Synapsen beeinflusst, wurde untersucht, ob eine TGF- β -Behandlung *in vitro* die Anzahl von Synapsen in primären hippocampalen Neuronenkulturen verändert. Dieses System bot den Vorteil,

dass die Synaptogenese über einen Zeitraum von mehreren Tagen verfolgt werden konnte, sodass geprüft werden konnte, ob sich die Wirkung von TGF- β zu einem frühen Differenzierungszeitpunkt von der zu einem späteren unterscheidet.

Dazu wurden die Synapsen von primären hippocampalen Neuronen untersucht, die während der Kulturzeit (5, 8 oder 11 Tage) alle drei Tage mit rekombinantem TGF- β 1 oder anti-TGF- β (1,2,3) behandelt worden waren. Jeweils sechs Stunden nach der letzten Zugabe der Faktoren wurden die Neurone fixiert und es wurden vGlut1 und Gephyrin immunzytochemisch nachgewiesen. Die Analyse zeigte, dass die Neurone diese synaptischen Marker unter allen drei Bedingungen an den jeweiligen Kulturtagen exprimierten. Ein Vergleich der Anzahl und Größe der Synapsen erbrachte jedoch keine Unterschiede zwischen den mit TGF- β oder anti-TGF- β (1,2,3) behandelten Neuronen und der unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 24).

Ein ausbleibender Effekt der TGF- β -Stimulation könnte damit begründet werden, dass die Neurone nicht für TGF- β responsiv sind. Diese Möglichkeit kann jedoch ausgeschlossen werden, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass die hippocampalen Neurone in Kultur einerseits T β RII-Protein und die mRNA für verschiedene Smad-Proteine exprimierten. Andererseits kam es nach der Stimulation mit TGF- β in den Neuronenkulturen zur einer Phosphorylierung von Smad2 (siehe Abb. 23). Dies zeigt, dass hippocampale Neurone *in vitro* die Fähigkeit zur Weiterleitung des TGF- β -Signals besitzen.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass TGF- β *in vitro* die Zahl von synaptischen Kontakten tatsächlich nicht beeinflusst und insofern die Aktivitäts-abhängige Ausschüttung von TGF- β 2 und - β 3 dieser Neurone nicht im Zusammenhang mit einer fördernden Wirkung auf die Synaptogenese steht. Genauso ist es allerdings denkbar, dass andere Faktoren einen stärkeren Einfluss haben und die Wirkung des exogenen TGF- β s oder die Neutralisation des endogenen TGF- β s überlagern. In dem *in vitro*-System können die Neurone relativ frei differenzieren und sind im Gegensatz zu den Bedingungen *in vivo* nicht durch die strenge räumliche und zeitliche Regulation von Faktoren und Interaktionspartnern limitiert. Die Kultur der hippocampalen Neuronen bestand nur zu einem geringen Anteil (5-20 %) aus nicht-neuronalen Zellen, die aufgrund ihrer Immunpositivität für das saure Gliafaserprotein (GFAP) überwiegend als Astrozyten identifiziert wurden. *In vivo* besteht das Gehirn jedoch aus bis zu zehnmal mehr Gliazellen als Neuronen (He und Sun, 2007) und es ist wahrscheinlich, dass sich das Milieu von Wachstumsfaktoren und weiteren löslichen Faktoren *in vitro* deutlich von dem *in vivo* unterscheidet. Dazu kommt, dass aufgrund der Auswertbarkeit der Synapsenzahl und -größe die Neuronen in sehr geringer Dichte ausgesät wurden und es nicht auszuschließen ist, dass dies dazu führte, dass zum Beispiel Ko-Faktoren nicht in ausreichender Menge produziert werden konnten.

So ist es schwierig aus den Befunden der Neuronenkultur Hinweise auf die physiologische Rolle von TGF- β abzuleiten und es bleibt weiter ungeklärt, in welchem zeitlichen Rahmen TGF- β die Entstehung von zentralen Synapsen beeinflussen könnte. Zudem ist unklar, ob es grundlegend verschiedene Wirkmechanismen von TGF- β in unterschiedlichen Neuronenpopulation geben könnte.

5.2 Kooperation von TGF- β 2 mit anderen Faktoren

Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob es an der neuromuskulären Endplatte Faktoren gibt, deren Wirkung durch TGF- β 2 moduliert oder sogar optimiert werden könnte. In diesem Zusammenhang war die Beobachtung von Interesse, dass in den Zwerchfellen von *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen eine um 25 % verringerte Anzahl von AChR-Clustern festgestellt wurde (siehe Abb. 13). Die Tatsache, dass die postsynaptische Differenzierung in TGF- β 2-defizienten Embryonen auf der Ebene eines einzelnen synaptischen Kontakts nicht gestört zu sein scheint, sich jedoch insgesamt eine Reduktion von AChR-Clustern zeigte, spricht dafür, dass TGF- β 2 das Ausmaß der gesamten Nerv-Muskel-Interaktion beeinflussen oder modulieren könnte. Wie ein solcher Einfluss zu einer verminderten Anzahl von AChR-Clustern führen könnte, ist in Abb. 26 angedeutet: Nach dem derzeitigen Verständnis der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte (Lin et al., 2001; Witzemann, 2006) kann eine Reduktion der AChR-Cluster durch eine verringerte Transkription oder Translation von AChR-Molekülen, durch eine verminderte Fähigkeit zum Clustern oder durch eine verminderte Agrin-abhängige Stabilisierung der gebildeten AChR-Cluster und einer daraus folgenden Nerv-abhängigen Auflösung hervorgerufen werden.

Eine Beteiligung von TGF- β 2 an den verschiedenen oben genannten möglichen Ursachen für eine Reduktion der AChR-Cluster ist möglich und wird im Folgenden diskutiert. TGF- β beeinflusst die Differenzierung von Muskelzellen (Cusella-De Angelis et al., 1994) und es kommt wahrscheinlich deshalb in den TGF- β 2-defizienten Embryonen zu einem ausgeprägten Zwerchfell-Muskel-Phänotyp (siehe Abb. 7 und Abb. 8), der in Abschnitt 5.5 eingehender diskutiert wird. Es könnte daher sein, dass insgesamt weniger Muskelzellen soweit differenzieren, dass sie in ausreichendem Maße AChR-Aggregate bilden. Damit wäre die Menge an AChR-Aggregaten, die sich schließlich in Cluster umwandeln, von Anfang an reduziert. Ein direkter Einfluss von TGF- β 2 auf die Transkription von AChR-Molekülen, wie er beispielsweise für β -Neuregulin gezeigt wurde (Falls et al., 1993; Fischbach und Cohen, 1973; Jessell et al., 1979), ist ebenso denkbar.

Es könnte auch sein, dass TGF- β 2 die Agrin/MuSK-abhängige Stabilisierung von AChR-Clustern durch einen Einfluss auf Agrin moduliert. Ein solcher Einfluss wurde für die Neurotrophine BDNF, NT3 und NT4/5 sowie für GDNF bereits nachgewiesen (Peng et al., 2003). Sowohl einzeln als auch in Kombination verringerten diese Faktoren in Nerv-Muskel-

Kulturen einerseits die Anzahl von synaptischen Kontakten und andererseits die Expression von Agrin-mRNA.

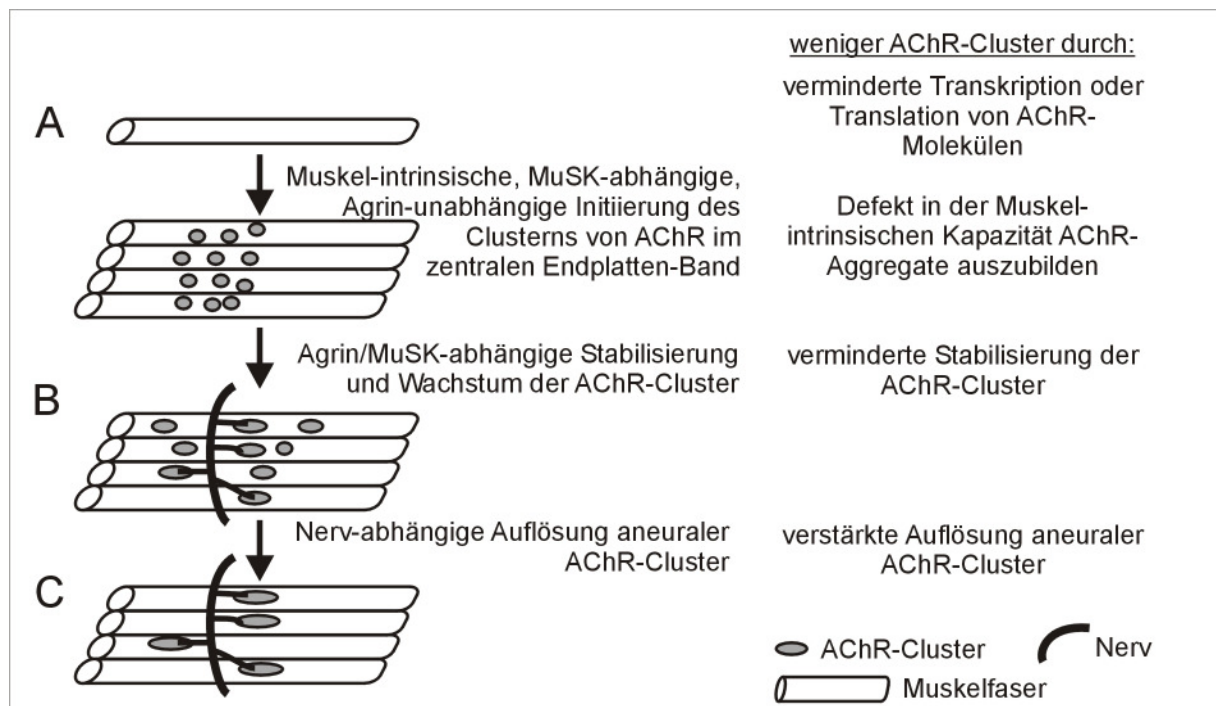


Abb. 26 Darstellung der verschiedenen Aspekte der postsynaptischen Differenzierung und von möglichen Erklärungen für eine verminderte Anzahl von AChR-Clustern.

(A) Initiierung des Clusters von AChR durch einen Muskel-intrinsischen, MuSK-abhängigen und Agrin-unabhängigen Mechanismus.

(B) Agrin/MuSK-abhängige Stabilisierung und Wachstum der AChR-Cluster.

(C) Nerv-abhängige Auflösung aneuraler AChR-Cluster.

Darstellung von Muskelfasern (weiß), Nerv (schwarz) und von AChR-Clustern (grau).

[verändert nach Lin et al., 2001]

Dieser Effekt wurde durch Verwendung von Schwannzellen-konditioniertem Medium wieder aufgehoben. Interessanterweise wurde in Schwannzellen-konditioniertem Medium TGF- β 1 als ein Faktor identifiziert, der die neuronale Agrin-Expression förderte und damit den Anteil der Nerv-Muskel-Kontakte, die mit AChR assoziiert waren, erhöhte (Feng und Ko, 2004). Es könnte daher angenommen werden, dass TGF- β 2 einen ähnlichen Einfluss hat und dass es durch die Deletion von TGF- β 2 zu einer verminderten Expression oder Sezernierung von Agrin kommt und somit weniger AChR-Cluster stabilisiert werden können. Dies könnte zu einer vermehrten Nerv-abhängigen Auflösung der AChR-Cluster führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde untersucht, ob TGF- β das durch Agrin induzierte Clustern von AChR beeinflusst. Für diese Untersuchungen wurde ausgenutzt, dass Agrin, das *in vivo* die Stabilität von AChR bewirkt, auch *in vitro* das Clustern von AChR induzieren kann (Bowen et al., 1996; Ferns et al., 1996). Um zu untersuchen, ob dieser Vorgang durch TGF- β

beeinflusst wird, wurden in differenzierten C2C12-Zellen AChR-Cluster durch Agrin in Anwesenheit von TGF- β sowie unter Inhibition des TGF- β -Signalweges induziert. Bei der Analyse der AChR-Cluster-Bildung zeigte sich kein Cluster-induzierender Effekt von TGF- β selbst und auch keine erhöhte Anzahl von Clustern bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- β und Agrin. Jedoch kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl von Agrin-induzierten AChR-Clustern, wenn der TGF- β -Signalweg durch den ALK4,5,7-Inhibitor unterbrochen war beziehungsweise wenn endogen produziertes TGF- β durch einen Antikörper neutralisiert wurde (siehe Abb. 18). Dieser Befund weist auf einen kooperierenden Effekt von Agrin und TGF- β hin, wie er laut der Hypothese angenommen wurde. Somit liefert das Ergebnis des *in vitro*-Experiments einen Hinweis darauf, dass die Ursache der verringerten Anzahl von AChR-Clustern in den TGF- β 2-defizienten Mäusen eine verminderte Agrin-Stabilisierung und eine daraus resultierende Aktivitäts-abhängige Auflösung sein könnte.

Bei der *in vitro*-Untersuchung der C2C12-Zellen wurde kein Isoform-spezifischer Effekt analysiert, da T β RI an der Signalkaskade aller drei TGF- β -Isoformen beteiligt ist und der Antikörper die Wirkung aller drei Isoformen neutralisiert. Die Analyse der TGF- β 2-defizienten Embryonen zeigte jedoch, dass bereits der Verlust einer einzigen Isoform einen Effekt auf die Stabilisierung der AChR-Cluster hat. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass es keinen Unterschied macht, welche der Isoformen fehlt, weil zum Beispiel ein Ungleichgewicht der drei Isoformen eine Destabilisierung der Cluster bewirkt. Jedoch ist es aufgrund der in der Einleitung beschriebenen, besonderen und differenziell regulierten Lokalisation TGF- β 2 wahrscheinlich, dass es sich tatsächlich um einen TGF- β 2-spezifischen Effekt handelt. Da TGF- β 2 insbesondere in adulten neuromuskulären Synapsen eine subsynaptische Lokalisation aufweist (McLennan und Koishi, 1994), könnte weiter vermutet werden, dass es besonders postnatal zur Stabilisierung der Kontakte beiträgt. Es wäre daher interessant, die postnatale Entwicklung der neuromuskulären Endplatte zu untersuchen um zu prüfen, ob es nach dem Verlust von TGF- β zu einer weiteren Destabilisierung der Endplatten kommt. Hierfür ist jedoch das Modell der TGF- β 2-defizienten Maus aufgrund der perinatalen Letalität ungeeignet. Vielmehr ist die Analyse von Mäusen mit einer gewebsspezifischen Deletion, mit der die Tiere die Geburt überleben können, von Interesse. Auf welcher Ebene die mögliche Interaktion von Agrin und TGF- β 2 besteht, ist nicht geklärt. Es ist denkbar, dass die Signalwege von Agrin und TGF- β ein gemeinsames Ereignis aufweisen und Agrin seine volle Wirkung in Abwesenheit des TGF- β -Signals nicht entfalten kann. Genauso erscheint aber auch eine direkte Interaktion der beiden Moleküle möglich, da die Untersuchung der molekularen Struktur der Agrin-Domänen erbrachte, dass es mehrere Follistatin-ähnliche Module in der N-terminale Region von Agrin gibt (Patthy und Nikolics, 1993). Diese vermögen Wachstumsfaktoren der TGF- β - oder PDGF-Familie zu binden, was zu einer lokalen Anreicherung der Wachstumsfaktoren an der Synapse führen könnte.

Ebenso ist vorstellbar, dass diese Protein-Interaktion umgekehrt die lokale Anreicherung von Agrin an den Stellen bewirkt, an denen TGF- β zu finden ist.

Die beschriebene mögliche Kooperation von TGF- β 2 und Agrin ist ein weiteres Beispiel für die modulierende Wirkung von TGF- β auf Moleküle, die in einem bestimmten Entwicklungsprozess eine entscheidende Bedeutung haben. Es stellt damit TGF- β als kontextuellen Partner in einem wichtigen Entwicklungsprozess, der Entstehung neuromuskulärer Endplatten, dar.

TGF- β ist insbesondere für die neurotrophe Wirkung von GDNF ein essentieller Faktor (Unsicker und Kriegstein, 2000). GDNF induzierte in kultivierten Rückenmarksneuronen ein verstärktes Auswachsen der Motor-Axone, während TGF- β 1, Nodal und Persephin keinen Effekt bewirkten (Ho et al., 2000). Der Effekt von GDNF wurde über den Ret/GFR α -Rezeptor-Komplex vermittelt (Bilak et al., 1999). Da jedoch GDNF in Abwesenheit von TGF- β seine volle Wirkung in peripheren und zentralen Neuronen nicht entfalten kann (Kriegstein et al., 1998b), da erst die Stimulation mit TGF- β eine Rekrutierung des GDNF-Rezeptors GFR α an die Plasmamembran bewirkt (Peterziel et al., 2002), war es theoretisch möglich, dass es aufgrund einer möglichen Kooperation dieser Faktoren zu einem veränderten Auswachsen der Motoneurone auf der Zwerchfell-Muskeloberfläche kommen könnte. Dies war jedoch wie bereits oben beschrieben nicht der Fall, was bedeuten könnte, dass bei diesem Prozess keine kooperative Wirkung von TGF- β 2 und GDNF benötigt wird, dass GDNF mit einem anderen Faktor kooperiert oder dass das Auswachsen des N. phrenicus gänzlich unabhängig von beiden Faktoren ist. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine TGF- β 2/GDNF-doppelt-defiziente Maus generiert (Rahhal, 2006). Eine Untersuchung der *Tgf- β 2^{-/-}/Gdnf^{-/-}*-Embryonen im Vergleich zu den jeweiligen einfach-defizienten Tieren im Hinblick auf das Neuriten-Wachstum sowie die Nerv-Faszikulation könnte daher weitere Aufschlüsse über eine mögliche kooperative Wirkung von GDNF und TGF- β 2 in diesen Vorgängen bringen.

5.3 TGF- β 2 und synaptische Funktion

Neben der Untersuchung eines Einflusses von TGF- β 2 auf die morphologische Entwicklung von Synapsen sollte in der vorliegenden Arbeit auch eine mögliche Rolle in der Funktion von Synapsen untersucht werden. Ein System, das sich für die Untersuchung von funktionellen Synapsen im ZNS in pränatalen Stadien eignet, ist der PreBötC in der ventralen Medulla. (Richter und Spyer, 2001). Um zu untersuchen, ob die Deletion von TGF- β 2 die Aktivität des PreBötC beeinträchtigt, wurde die Aktivität des Netzwerkes am E 18,5 durch *patch-clamp*-Ableitungen im Ganzzell-Modus analysiert. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zeigte sich in den TGF- β 2-defizienten Embryonen eine signifikante Beeinträchtigung der Netzwerk-Funktion des PreBötC, die sich auch in der pharmakologisch isolierten inhibitorischen und

exzitatorischen Aktivität widerspiegelte. So nahmen die Frequenz und Amplitude der gesamten spontanen postsynaptischen Ströme (Abb. 19 C und D) und die Frequenz inhibitorischer und exzitatorischer spontaner Ströme signifikant ab (siehe Abb. 19 F und I). Zusätzlich war die Amplitude der sIPSC in *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen signifikant reduziert (Abb. 19 G). Um zu prüfen, ob diesem Befund eine Beeinträchtigung der synaptischen Funktion auf der Ebene einzelner Synapsen zugrunde lag, wurden postsynaptische Miniatur-Ströme aufgezeichnet. Diese zeigten eine signifikant verminderte Frequenz der mIPSC und mEPSC (Abb. 19 L und O) und eine signifikant verringerte Amplitude der mEPSC (Abb. 19 P). Damit wurde bestätigt, dass der Netzwerk-Beeinträchtigung in TGF- β 2-defizienten Mäusen eine Störung der synaptischen Transmission auf Synapsen-Ebene zugrunde liegt. Ein mögliches Ungleichgewicht der bestehenden inhibitorischen und exzitatorischen Verbindungen als Ursache für die beeinträchtigte Netzwerk-Funktion konnte damit ausgeschlossen werden. Weitere Ursachen wie ein Strukturdefizit oder der Verlust faseriger Verbindungen wurden ebenfalls ausgeschlossen (siehe Abb. 20). Ebenso war die erniedrigte synaptische Transmission nicht auf einen Verlust von synaptischen Verbindungen und damit auf eine gestörte Synaptogenese zurückzuführen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass der verminderten synaptischen Transmission eine Störung in der synaptischen Funktion zugrunde liegt. Dies bedeutet, dass die Deletion von TGF- β 2 direkt die Funktion von Synapsen beeinträchtigt und dies nicht kompensiert werden kann. Dies ist das erste Mal, dass eine solche Funktion von TGF- β 2 in Säugetieren beschrieben wurde. Die Tatsache, dass die verminderte synaptische Funktion nicht mit einem Verlust an Synapsen einhergeht, stellt keinen Widerspruch dar. Obwohl synaptische Aktivität im PNS eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Synapsen spielt, wird angenommen, dass die Synaptogenese im ZNS einem Entwicklungsprogramm folgt, das durch synaptische Aktivität nur moduliert, stabilisiert und verbessert wird (Kasthuri und Lichtman, 2003).

Um ein Modell aufzustellen, wie TGF- β die Funktion von Synapsen beeinflussen könnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die verminderte synaptische Transmission in TGF- β 2-defizienten Embryonen auf eine weniger effiziente Exo- und Endozytose der Neurotransmitter-Vesikel zurückzuführen ist. An der Aktivitäts-abhängigen Regulation von Neurotransmitter-Ausschüttung sind Synapsin-Proteine beteiligt (Rosahl et al., 1995), die an der Membran der Vesikel lokalisiert sind (Valtorta et al., 1992). Sie werden in Folge synaptischer Aktivität phosphoryliert, werden jedoch nicht für den eigentlichen Exozytose-Prozess benötigt (Nestler und Greengard, 1983; Rosahl et al., 1995). Alle Synapsin-Proteine (Synapsin Ia, Ib, IIa, IIb und IIIa) besitzen eine N-terminale Domäne (Domäne A) mit einer hochkonservierten Phosphorylierungsstelle an Serin-Rest 9 (Ser9, auch: *phospho-site 1*), deren Phosphorylierung für das Abdocken von Synapsin von synaptischen Vesikeln während der synaptischen Aktivität verantwortlich gemacht wird (Chi et al., 2001; Hosaka et al., 1999).

Der Ser9-Rest kann durch die Proteinkinase A (PKA) sowie die Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase (CaMK) I/IV phosphoryliert werden, jedoch wird die Umverteilung von Synapsin während der neuronalen Aktivität hauptsächlich durch eine Phosphorylierung durch die PKA vermittelt (Menegon et al., 2006). Ein Einfluss von TGF- β auf die Phosphorylierung und Lokalisation von Synapsin konnte in *Aplysia* bereits nachgewiesen werden (Chin et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde daher in Anlehnung an die Versuche in *Aplysia* die Hypothese geprüft, ob eine Stimulation mit TGF- β die Phosphorylierung und die Lokalisation von Synapsin auch in Säugetieren beeinflusst. Dazu wurden primäre hippocampale Neurone mit TGF- β stimuliert und die Lysate anschließend mittels Western-Blot-Analysen auf die Phosphorylierung von Synapsin(Ser9) untersucht. Es zeigte sich, dass es nach der Stimulation mit TGF- β zu einer verstärkten Ser9-Phosphorylierung der IIb-Isoform von Synapsin und zusätzlich zur Ser9-Phosphorylierung weiterer Isoformen (IIa und Ib) kam (Abb. 25 E). Eine Stimulation mit 55 mM KCl resultierte im Vergleich zur Kontrolle nicht in einer veränderten Phosphorylierung von Synapsin(Ser9). Dies ist im Einklang mit Jovanovic et al. (1996), die zeigten, dass eine KCl-Stimulation die Phosphorylierung an Ser62 (*site 4*) und Ser67 (*site 5*) beeinflusste. Mittels immunzytochemischer Darstellung von phospho-Synapsin(Ser9) (Abb. 25) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass unter Kontroll-Bedingungen eine punktförmige Lokalisation von phospho-Synapsin(Ser9) vorliegt. Diese entspricht der Lokalisation von Synapsin-Isoformen an den synaptischen Neurotransmitter-Vesikeln der Nerv-Terminalien (Valtorta et al., 1992). Die Behandlung mit TGF- β 1 für 30 Minuten veränderte die punktförmige Lokalisation von Phospho-Synapsin nicht, jedoch führte die Behandlung mit dem ALK-4,5,7 Inhibitor SB431542 allein oder in Kombination mit TGF- β 1 zu einer Auflösung der punktförmigen Lokalisation von phospho-Synapsin. Dies kann als ein Verlust an phosphoryliertem Synapsin(Ser9) oder einer Dephosphorylierung von Synapsin nach der Blockierung des TGF- β -Signalweges interpretiert werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungen in *Aplysia*, in denen ebenfalls gezeigt wurde, dass TGF- β die Phosphorylierung von Synapsin verstärkte, und dies wiederum zu einer Umverteilung von Synapsin führte (Chin et al., 2002). Aufgrund der Ergebnisse wurde ein Modell aufgestellt (siehe Abb. 27), das erklärt, wie durch TGF- β die Vesikel-Mobilität in synaptischen Terminalien durch die Phosphorylierung der verschiedenen Synapsin-Isoformen erhöht beziehungsweise durch die Inhibition des TGF- β -Signalweges vermindert wird. Die Mobilität der Vesikel bildet die Grundlage für das Auffüllen des Reserve-Pools und des *readily-releasable*-Pools von synaptischen Vesikeln während und nach synaptischer Aktivität – ein Vorgang, der grundlegend für eine normale synaptische Funktion ist (Südhof, 2004). Da TGF- β die Phosphorylierung erhöht, ist es wahrscheinlich, dass es zumindest in hippocampalen Neuronenkulturen direkt die Funktionalität von

Synapsen von Säuger-Neuronen modulieren kann, indem es einen Einfluss auf die Mobilität der Vesikel zwischen den jeweiligen Vesikel-Pools hat.

Auch Neurotrophine haben einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Synapsin I. Eine Stimulation mit BDNF bewirkte in primären cerebro-kortikalen Neuronen eine MAPK-abhängige Erhöhung des basalen Phosphorylierungslevels von Synapsin I-Ser62/Ser67 (*sites 4/5*) und NGF-Behandlung führte in PC12-Zellen ebenfalls zu einer MAPK-abhängigen Phosphorylierung von Synapsin I-Ser62/Ser67 (Jovanovic et al., 1996). Im Fall der BDNF-stimulierten Neurone führte die erhöhte Synapsin-Phosphorylierung direkt zu einer vermehrten evozierten Glutamat-Ausschüttung, die umgekehrt durch einen MAPK-Inhibitor reduziert werden konnte (Jovanovic et al., 2000).

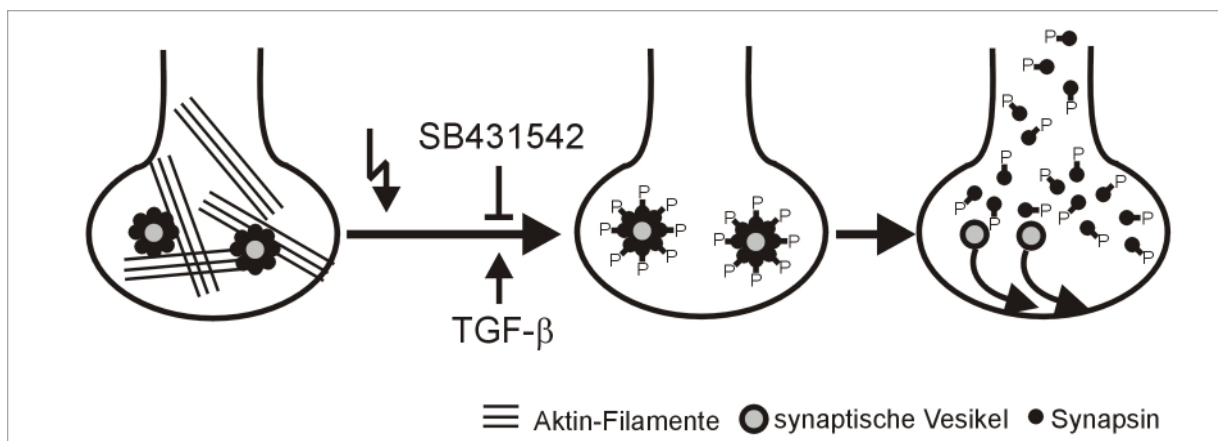


Abb. 27 Hypothetisches Modell für den Einfluss von TGF- β auf die Phosphorylierung von Synapsin.

Synapsin ist an synaptischen Vesikeln lokalisiert und verankert sie so an Aktin-Filamenten in präsynaptischen Terminalien. Während der synaptischen Aktivität kommt es zur Phosphorylierung von Synapsin, was zu einer Umverteilung der Synapsin-Moleküle führt. "Freie" Vesikel sind dadurch mobil und können sich zwischen den Vesikel-Pools bewegen. TGF- β verstärkt die Phosphorylierung, eine Inhibition des TGF- β -Signalweges durch SB431542 vermindert sie.

Mit TGF- β konnte in der vorliegenden Arbeit ein weiterer neurotropher Faktor identifiziert werden, der in zentralen Säuger-Neuronen *in vitro* einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Synapsin besitzt und damit auch *in vivo* an der effizienten synaptischen Transmission beteiligt sein könnte, indem er die Mobilität von Transmitter-Vesikeln beeinflusst.

Es ist daher möglich, dass auch in den TGF- β 2-defizienten Tieren eine verminderte Vesikel-Mobilität aufgrund einer Hypophosphorylierung von Synapsin vorliegt. Wäre dies der Fall, so würde man erwarten, dass Neurone in TGF- β 2-defizienten Tieren "schneller ermüden", wenn sie mit anhaltender Stimulation konfrontiert werden. Um diese Hypothese zu testen, könnten zum Beispiel *paired-pulse*-Stimulationen vorgenommen werden, bei denen Neurone in

definierten Zeit-Abständen zwei gleich starke Stimuli erhalten. Kommt es zu einer verstärkten Antwort nach dem zweiten Reiz, so spricht man von *paired-pulse-facilitation* (Paar-Puls-Fazilitation). Läge in den TGF- β 2-defizienten Neuronen tatsächlich ein Defekt in der Vesikel-Mobilität vor, so würden sie in diesen Experimenten eine verminderte *paired-pulse-facilitation* aufweisen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige Stimulation mit TGF- β 2 in hippocampalen Neuronen die Fazilitation evozierter postsynaptischer Ströme (ePSC) erhöhte (Fukushima et al., 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Fazilitation mit einer reduzierten synaptischen Depression der ePSC und einer Erhöhung der Amplitude und der Frequenz von mPSC einherging. Dies stützt die Annahme, dass der Einfluss auf die Vesikel-Mobilität einen Mechanismus darstellt, wie TGF- β 2 die Funktion von Synapsen steuern kann.

Dennoch ist nicht auszuschließen, dass TGF- β die synaptische Funktion auf eine andere Art beeinflussen könnte und beispielsweise auf die Expression spezifischer Rezeptoren Einfluss nimmt oder die Expression und Aktivität von Ionenkanälen modulieren könnte. So zeigten Studien am Ganglion ciliare des Huhns, dass TGF- β 1 (beziehungsweise das Huhn-Homolog TGF- β 4) posttranslational auf K_{Ca} -Kanäle wirkt (Cameron et al., 1998). TGF- β 1 bewirkt dabei in einem Ras/Erk-MAPK/PI3-Kinase-abhängigen Prozess die Translokation von K_{Ca} -Kanälen von intrazellulären Speichern an die Plasmamembran (Dryer et al., 2003). Neben der akuten posttranslationalen Wirkung gibt es eine zusätzliche Langzeit-Wirkung von TGF- β 1 auf die K_{Ca} -Kanäle, die die Transkription und Synthese von Protein benötigt (Lhuillier und Dryer, 2000). TGF- β 3 dagegen inhibiert die funktionelle Expression von K_{Ca} (Cameron et al., 1999). Eine detaillierte Analyse der Expression und Aktivität von Ionenkanälen und insbesondere des K_{Ca} -Kanals in den TGF- β 2-defizienten Embryonen könnte zeigen, ob diese durch die Deletion beeinträchtigt werden, oder ob dadurch mögliche Einflüsse von TGF- β 3 verstärkt hervortreten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität der neuromuskulären Endplatten zwar nicht explizit getestet, jedoch lässt sich aus dem beobachteten Phänotyp indirekt schließen, dass sie über eine funktionelle synaptische Transmission verfügen. Verschiedene Beispiele aus der Literatur zeigen, dass der vollständige oder teilweise Verlust von synaptischer Transmission immer mit morphologischen Veränderungen einhergeht beziehungsweise die synaptische Aktivität für die Bildung und Reifung der neuromuskulären Endplatte benötigt wird. So bewirkten AChR-Antagonisten eine erhöhte Anzahl von neuromuskulären Endplatten und ein verstärktes Verzweigen von Motor-Axonon (Oppenheim et al., 2000). Der vollständige Verlust von synaptischer Transmission nach der Deletion des Gens für ChAT resultierte ebenfalls in einer Reihe von Veränderungen in der synaptischen Differenzierung

(Misgeld et al., 2002). Dazu gehörten eine vermehrte Anzahl von Motorneuron-Axonon und Schwannzellen, exzessives sekundäres Verzweigen des N. phrenicus, ein verbreitertes zentrales Endplatten-Band, kleinere AChR-Cluster am E 13,5, eine vermehrte Anzahl von Motor-Axon-Terminalien, die eine einzelne Endplatte innervierten sowie ein vermehrtes Auswachsen der Terminalien über die Endplatte hinaus. Die Deletion von *munc13*, einem Protein, das in glutamatergen und GABAergen Synapsen an der Ausschüttung synaptischer Vesikel beteiligt ist, führte im Vergleich zur ChAT-defizienten Maus zu einem ähnlichen Phänotyp, obwohl die synaptische Transmission nicht vollständig sondern nur teilweise unterbunden war (Varoqueaux et al., 2005). Da die Deletion des TGF- β 2-Gens im Vergleich mit den beschriebenen Maus-Mutanten in einem deutlich milderen Phänotyp resultiert, bei dem es lediglich zu einer Verminderung der Anzahl der AChR-Clustern und einer ausgeprägten Muskel-Disorganisation kommt, kann daraus geschlossen werden, dass es in den TGF- β 2-defizienten Embryonen ein gewisses Maß an synaptischer Aktivität gibt. Dies zeigt, dass die Deletion von TGF- β 2 die Funktion von Synapsen nicht prinzipiell beeinflusst. Dies könnte bedeuten, dass TGF- β 2 tatsächlich nur die Funktion von interneuronalen Synapsen beeinflusst oder dass sein Verlust an der neuromuskulären Endplatte besser kompensiert werden kann.

5.4 Der *Tgf- β 2^{-/-}*-Phänotyp

Um Aspekte der biologischen Funktion von TGF- β 2 an Synapsen zu analysieren, wurde ein Großteil der oben beschriebenen Untersuchungen an TGF- β 2-defizienten Mäusen durchgeführt. Aus Verpaarungen, die terminiert für die Analyse embryonaler Tiere angesetzt wurden, wurden an verschiedenen Embryontagen 29 % Wildtypen, 56 % *Tgf- β 2^{+/-}*- und 13 % *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen erhalten (siehe Tab. 3). Dies zeigt, dass die Verteilung der Genotypen nicht den Erwartungen nach dem Mendel'schen Gesetz entsprach, was auf eine frühe embryonale Sterblichkeit der *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen (deutlich vor E 14) oder Implantations-Probleme bei *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen hindeutet. Neun der Embryonen waren bei der Analyse bereits tot. Bei diesen Embryonen handelte es sich zwar überwiegend um *Tgf- β 2^{-/-}*-Tiere, allerdings waren sie in späteren Embryonalstadien (ca. E 14-17) gestorben. Sanford und Mitarbeiter (1997) beschrieben in der Originalarbeit über die Generierung der TGF- β 2-defizienten Maus, dass Fehlbildungen des Sternums mit einer Penetranz von 25 % beobachtet wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Phänotyp bei 100 % der analysierten TGF- β 2-defizienten Tiere beobachtet. Die unterschiedliche Penetranz kann mit einem anderen genetischen Hintergrund erklärt werden.

Sanford und Mitarbeiter (1997) beschrieben, dass in ihren Untersuchungen zwei Drittel der analysierten Tiere kurz vor oder während der Geburt starben und ein Drittel zyanotisch

geboren wurde und schwere respiratorische Defizite aufwies. Als mögliche Ursachen für die kongenitale Zyanose kommen pulmonale, kardiovaskuläre oder neuromuskuläre Defekte in Frage. Die Autoren untersuchten die Lungenentwicklung und konnten keinen Phänotyp finden, der die Zyanose eindeutig erklärte, sodass pulmonale Ursachen ausgeschlossen werden konnten. Die Autoren beschrieben darüber hinaus Defekte in der Herzentwicklung und machten diese für die Sterblichkeit verantwortlich, auch wenn die Defekte keine 100 %ige Penetranz aufwiesen. Sie gingen jedoch nicht auf Störungen in der neuromuskulären Entwicklung ein (Sanford et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Atemtätigkeit von *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen im Vergleich zu Wildtypen und heterozygoten Geschwistertieren am E 18,5 untersucht. Die Atemtätigkeit wurde mittels Ganzkörper-Plethysmografie aufgezeichnet. Es zeigte sich, dass etwa die Hälfte der Wildtyp- und *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen eine rhythmische respiratorische Aktivität aufwies (vergleiche Abb. 6 A). Bei den TGF- β 2-defizienten Embryonen wurde jedoch in keinem Fall ein Atemzug oder eine vergleichbare Aktivität beobachtet (vergleiche Abb. 6 B). Dies zeigte, dass es in TGF- β 2-defizienten Tieren tatsächlich zu einem vollständigen Ausbleiben jeglicher Atemtätigkeit kommt, das unweigerlich zu einer Zyanose führt.

Die vorliegende Arbeit untersuchte des Weiteren periphere und zentrale Anteile des respiratorischen Systems, d.h. das Zwerchfell und den PreBötC, in TGF- β 2-defizienten Embryonen. Wie oben beschrieben, zeigte die anatomische Untersuchung der Innervation des Zwerchfells durch den N. phrenicus keine Auffälligkeiten (vergleiche Abschnitte 4.4 und 5.1), die auf eine Insuffizienz des Zwerchfells schließen ließe und dadurch die mangelnde Atemtätigkeit der TGF- β 2-defizienten Embryonen erklären könnte. Es ist nicht anzunehmen, dass eine um 25 % verminderte Anzahl von neuromuskulären Endplatten zu einem Verlust jeglicher Atemtätigkeit führt. Es bleibt zu klären, ob die vorhandenen Endplatten ausreichend funktionell innerviert werden und ob die Disorganisation des Zwerchfell-Muskels (siehe Abb. 7 und Abb. 8) eine ausreichende Kontraktion des Zwerchfell-Muskels zulässt.

Eine interessante Beobachtung war, dass es zu einer Störung der synaptischen Transmission in den Neuronen des PreBötC kommt (dargestellt in Abb. 19). Dieses Netzwerk muss sich pränatal entwickeln und mit dem Zeitpunkt der Geburt ausgebildet sein. Es muss einen Atemrhythmus generieren, der entsprechend der Bedürfnisse einen Gasaustausch ermöglicht, sowie die Integration von Atmung und weiteren Vorgängen wie Schlucken erlauben (Greer et al., 2006). Störungen in der Ausbildung des Netzwerkes führen zu einer mangelnden respiratorischen Rhythmogenese. Da in den *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen eine beeinträchtigte synaptische Transmission in diesem Netzwerk festgestellt wurde, könnte der letale Phänotyp der TGF- β 2-defizienten Neugeborenen daher letztlich mit einer Störung der synaptischen Funktion der Neurone erklärt werden.

5.5 TGF- β 2 und Muskelentwicklung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle von TGF- β 2 in der Synaptogenese u. a. am Modell der neuromuskulären Endplatte des Zwerchfells TGF- β 2-defizienter Mäuse. Bei der Analyse der Zwerchfelle von Wildtyp und TGF- β 2^{-/-}-Embryonen wurde eine Disorganisation des Zwerchfell-Muskels in den TGF- β 2-defizienten Tieren festgestellt (Abschnitt 4.3). Es wurde einerseits ein Übereinanderlaufen der Muskelfasern (Abb. 7 C und Abb. 8), andererseits wurden Muskelzellen mit größerem Durchmesser und mittelständigen Zellkernen beobachtet. Dieser Phänotyp weist auf ein verändertes Differenzierungsverhalten der Muskelzellen nach der Deletion von TGF- β 2 hin.

Muskel-Vorläuferzellen werden in den Somiten auf eine von mehreren myogenen Linien festgelegt. Danach migrieren sie zum Muskel-Primordium, wo sie entweder in frühe (embryonale), späte (fötale) oder adulte (Satelliten-)Myoblasten differenzieren, die die unmittelbaren Vorläufer von Muskelfasern sind. Abhängig von Signalen aus ihrer Umgebung können sie sich entweder teilen oder mit anderen Myoblasten oder Myotuben verschmelzen (McLennan und Koishi, 2002). Während der Muskelentwicklung verschmelzen frühe Myoblasten mit anderen frühen Myoblasten um primäre Myotuben zu formen. Dies geschieht *in vivo* nur innerhalb von zwei kurzen Zeitperioden und in der synaptischen Region des Muskels. Werden keine Myotuben mehr gebildet, verschmelzen die restlichen frühen Myoblasten mit den vorhandenen primären Myotuben. Dies ist ein kontinuierlicher Prozess, der anhält, bis der Muskel ausgereift ist. Späte Myoblasten verschmelzen miteinander in der synaptischen Region (innerviert durch Motoneurone) zu sekundären Myotuben. In der extra-synaptischen Region verschmelzen späte Myoblasten mit primären und sekundären Myotuben. Primäre und sekundäre Myotuben reifen schließlich zu Muskelfasern, die adulte Myoblasten aufnehmen können.

Die Literatur zur Rolle von TGF- β in der Bildung und Differenzierung von Muskelzellen erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich. Einerseits sind TGF- β s potente Inhibitoren der Proliferation und Fusion von Myoblasten und myogenen Zelllinien (Olson et al., 1986). In Verbindung mit niedrigen Serum-Konzentrationen inhibieren sie die terminale Differenzierung (Massagué et al., 1986) und inhibieren die Expression und Funktion von zwei Muskel-spezifischen Transkriptionsfaktoren, MyoD (Vaidya et al., 1989) und Myogenin (Brennan et al., 1991). Andererseits induziert TGF- β in Verbindung mit normalen Serumkonzentrationen die Differenzierung von Myoblasten (Zentella und Massagué, 1992). Werden embryonale Stammzellen mit TGF- β behandelt, so bewirkt dies bevorzugt eine Differenzierung in Muskelzellen (Slager et al., 1993). Nach der Inhibition des T β RI differenzieren C2C12-Zellen nicht mehr in Myoblasten, sondern in Osteoblasten (Maeda et al., 2004). TGF- β s sind ebenfalls wichtige Promotoren der Myoblasten-Fusion, da gezeigt werden konnte, dass C2C12-Myoblasten, die einen trunkierten T β RII exprimieren, *in vivo* nicht verschmelzen

können (Filvaroff et al., 1994). Endogenes TGF- β ist notwendig und ausreichend um die Differenzierung von fötalen Myoblasten (isoliert aus Maus E 17) zu verhindern, es aber keinen Einfluß auf die Differenzierung von embryonalen Myoblasten (isoliert aus Maus am E 11) hat (Cusella-De Angelis et al., 1994). Eine mögliche Erklärung für diese scheinbaren Widersprüche in der fördernden oder hemmenden Wirkung von TGF- β liefert die Tatsache, dass die Wirkung von TGF- β auf die Proliferation von adulten Myoblasten stark von der Anwesenheit weiterer Faktoren abhängt: Es kann sie entweder inhibieren, stimulieren oder gar nicht beeinflussen, je nachdem ob dem Kulturmedium gleichzeitig PDGF, FGF oder IGF zugesetzt wurden (Cook et al., 1993). TGF- β 2 ist in sich entwickelnden Muskelfasern hauptsächlich in Myoblasten und Myotuben lokalisiert (McLennan und Koishi, 2002). Dabei verändert sich das Lokalisationsmuster im Laufe der Muskelentwicklung parallel zur Verschmelzung von Myoblasten zu Myotuben, d.h. die TGF- β 2-Konzentration ist zum Beispiel an den äußeren Enden der Myotuben höher als in ihrer Mitte, wo die Verschmelzung von Myoblasten stattfindet. Ist die Bildung der Myotuben abgeschlossen, ist eine gleichförmige Lokalisation von TGF- β 2 entlang der Myotuben zu beobachten. Es ist jedoch unklar, ob eine Expression von TGF- β 2 durch die Myoblasten oder die subsynaptische Lokalisation von TGF- β 2, die zumindest in adulten Tieren auch von einer Sezernierung durch das Motoneuron stammen kann (Jiang et al., 2000), eine Verschmelzung von Myoblasten untereinander fördert (McLennan und Koishi, 2002). Im Gegensatz dazu variiert die Lokalisation von TGF- β 1 und - β 3 zeitlich und räumlich nicht (McLennan und Koishi, 2002). Vor dem Hintergrund der beschriebenen Literatur kann daher angenommen werden, dass es in den TGF- β 2-defizienten Tieren zu Störungen in der Differenzierung fötaler Myoblasten kommt, die den ungeordneten Verlauf der Muskelfasern erklären könnte. Damit würde sich die Hypothese bestätigen, dass eine primäre Funktion von TGF- β 2 im neuromuskulären System die Stimulation der sekundären Myotuben-Formation ist (Jiang et al., 2000). Es wurde nicht näher untersucht, inwieweit eine mangelnde Differenzierung der Muskelzellen in den TGF- β 2-defizienten Embryonen die Bildung von AChR-Clustern oder weitere Muskel-intrinsische Prozesse während der Bildung der neuromuskulären Endplatte beeinträchtigen könnte. So kann ein Muskel-intrinsischer Defekt als Ursache der verminderten Anzahl von AChR-Clustern in *Tgf- β 2^{-/-}*-Embryonen nicht ausgeschlossen werden.

5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die biologische Bedeutung von TGF- β 2 in der morphologischen Entwicklung und Funktion von Synapsen in Säugetieren zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere geklärt werden, ob TGF- β 2 eher die Morphologie von Synapsen oder die Funktion der synaptischen Kontakte beeinflusst, und ob TGF- β 2 im PNS und im ZNS gleichermaßen an diesen Vorgängen beteiligt ist. Weiterhin sollte eine mögliche

Kooperation von TGF- β 2 mit anderen Faktoren untersucht werden. Es sollten ebenfalls mögliche Hinweise auf den zeitlichen Rahmen der Wirkung von TGF- β gefunden und geprüft werden, unter welchen Umständen TGF- β 2 ein essentieller Faktor sein könnte, dessen Deletion nicht durch andere Isoformen oder weitere Faktoren kompensiert werden kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde tragen zu einem erweiterten Verständnis der umfassenden Funktionen von TGF- β beziehungsweise TGF- β 2 bei. So wurde gezeigt, dass TGF- β 2 die Morphologie von peripheren und zentralen Synapsen nicht verändert, aber im PNS durch eine Kooperation mit Agrin die Anzahl synaptischer Kontakte steuern könnte. TGF- β 2 hat dagegen im ZNS eine deutliche Wirkung auf die synaptische Transmission. Mit den Untersuchungen zur Synapsin-Phosphorylierung wird ein Mechanismus vorgeschlagen, wie TGF- β 2 die Mobilität von Neurotransmitter-Vesikeln und damit ihre effiziente Endo- und Exozytose beeinflussen könnte.

Aus Sicht der bestehenden Modelle zur Synaptogenese und zur synaptischen Funktion wurde damit die Auswahl sezernierter neurotropher Faktoren, die die reziproke Interaktion von prä- und postsynaptischer Seite in Säugetieren vermitteln, um TGF- β 2 erweitert. Im Vergleich mit der Funktion von Gbb an der neuromuskulären Endplatte bei *Drosophila*, die keine cholinerge, sondern eine glutamaterge Synapse darstellt, lassen sich Teilaspekte auf die Funktion von TGF- β 2 bei Säugetieren übertragen: An den neuromuskulären Endplatten des Zwerchfells ließ sich eine Abnahme der Anzahl synaptischer Kontakte feststellen; in zentralen glutamatergen und GABAergen/glyzinergen Synapsen kam es zu einem Verlust der synaptischen Transmission. Damit ist die Annahme, dass TGF- β 2 ortholog zu Gbb sein könnte, sehr wahrscheinlich.

Aus den aufgestellten Hypothesen ergeben sich weitere Fragen, die in zukünftigen Arbeiten untersucht werden sollten. So muss die Ultrastruktur der neuromuskulären Endplatten untersucht werden, um mögliche Veränderungen auf dieser Ebene zu identifizieren. Darüberhinaus müssen mögliche Interaktionen der Agrin- und TGF- β -Signalwege analysiert werden. Weitere Experimente müssen auch zeigen, ob in TGF- β 2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp auf ultrastruktureller Ebene die Anzahl der Vesikel in den verschiedenen Vesikel-Pools, d.h. dem Reserve-Pool und dem *readily-releasable*-Pool, verändert ist. Außerdem könnte durch Verwendung des Farbstoffes FM 1-43 *in vitro* geprüft werden, welchen Einfluss TGF- β 2 auf das Recycling-Verhalten der synaptischen Vesikel und die Größe der Vesikel-Pools hat. Zusätzliche Untersuchungen müssen zeigen, welche Signalwege bei der TGF- β -abhängigen Synapsin-Phosphorylierung beteiligt sind beziehungsweise ob der Einfluss von einer PKA- oder CaMK I/IV-Aktivierung abhängt.

Für alle Effekte, die TGF- β 2 zugeordnet wurden, muss darüberhinaus in künftigen Untersuchungen geprüft werden, ob sie tatsächlich spezifisch TGF- β 2 zugewiesen werden können und dementsprechend in TGF- β 3-defizienten Tieren nicht gefunden werden können.

6 Literatur

- Aberle, H., A. P. Haghighi, R. D. Fetter, B. D. McCabe, T. R. Magalhaes und C. S. Goodman (2002): Wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*, 33 (4):545-558.
- Akins, M. R. und T. Biederer (2006): Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 16 (1):83-89.
- Assoian, R. K., A. Komoriya, C. A. Meyers, D. M. Miller und M. B. Sporn (1983): Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 258 (11):7155-7160.
- Bader, D., T. Masaki und D. A. Fischman (1982): Immunochemical analysis of myosin heavy chain during avian myogenesis in vivo and in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 95 (3):763-770.
- Baines, R. A. (2004): Synaptic strengthening mediated by bone morphogenetic protein-dependent retrograde signaling in the *Drosophila* CNS. *The Journal of Neuroscience*, 24 (31):6904-6911.
- Banks, G. B., P. T. Choy, N. A. Lavidis und P. G. Noakes (2003): Neuromuscular synapses mediate motor axon branching and motoneuron survival during the embryonic period of programmed cell death. *Developmental Biology*, 257 (1):71-84.
- Banks, G. B., R. Kanjhan, S. Wiese, M. Kneussel, L. M. Wong, G. O'Sullivan, M. Sendtner, M. C. Bellingham, H. Betz und P. G. Noakes (2005): Glycinergic and GABAergic synaptic activity differentially regulate motoneuron survival and skeletal muscle innervation. *The Journal of Neuroscience*, 25 (5):1249-1259.
- Bibel, M. und Y.-A. Barde (2000): Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes and Development*, 14 (23):2919-2937.
- Biederer, T., Y. Sara, M. Mozhayeva, D. Atasoy, X. Liu, E. T. Kavalali und T. C. Südhof (2002): SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*, 297 (5586):1525-1531.
- Bilak, M. M., D. A. Shifrin, A. M. Corse, S. R. Bilak und R. W. Kuncl (1999): Neuroprotective utility and neurotrophic action of neurturin in postnatal motor neurons: comparison with GDNF and persephin. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (2):326-336.
- Blau, H. M., G. K. Pavlath, E. C. Hardeman, C. P. Chiu, L. Silberstein, S. G. Webster, S. C. Miller und C. Webster (1985): Plasticity of the differentiated state. *Science*, 230 (4727):758-766.
- Böttner, M., K. Kriegstein und K. Unsicker (2000): The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *Journal of Neurochemistry*, 75 (6):2227-2240.
- Böttner, M., K. Unsicker und C. Suter-Crazzolara (1996): Expression of TGF- β type II receptor mRNA in the CNS. *NeuroReport*, 7 (18):2903-2907.
- Boulanger, L. und M. M. Poo (1993): Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nature Neuroscience*, 2 (4):346-351.

- Bowen, D. C., J. Sugiyama, M. Ferns und Z. W. Hall (1996): Neural agrin activates a high-affinity receptor in C2 muscle cells that is unresponsive to muscle agrin. *The Journal of Neuroscience*, 16 (12):3791-3797.
- Brachya, G., C. Yanay und M. Linial (2006): Synaptic proteins as multi-sensor devices of neurotransmission. *BMC Neuroscience*, 7 (Suppl. 1):S4.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (2):248-254.
- Brennan, T. J., D. G. Edmondson, L. Li und E. N. Olson (1991): Transforming growth factor β represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 88 (9):3822-3826.
- Brewer, G. J., J. R. Torricelli, E. K. Evege und P. J. Price (1993): Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal^(C), a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, 35 (5):567-576.
- Brown, P. D., L. M. Wakefield, A. D. Levinson und M. B. Sporn (1990): Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors*, 3 (1):35-43.
- Burgess, R. W., Q. T. Nguyen, Y. J. Son, J. W. Lichtman und J. R. Sanes (1999): Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction. *Neuron*, 23 (1):33-44.
- Byrne, J. H. und E. R. Kandel (1996): Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *The Journal of Neuroscience*, 16 (2):425-435.
- Cameron, J. S., L. Dryer und S. E. Dryer (1999): Regulation of neuronal K⁺ currents by target-derived factors: opposing actions of two different isoforms of TGF β . *Development*, 126 (18):4157-4164.
- Cameron, J. S., L. Lhuillier, P. Subramony und S. E. Dryer (1998): Developmental regulation of neuronal K⁺ channels by target-derived TGF β in vivo and in vitro. *Neuron*, 21 (5):1045-1053.
- Causing, C. G., A. Gloster, R. Aloyz, S. X. Bamji, E. Chang, J. Fawcett, G. Kuchel und F. D. Miller (1997): Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron*, 18 (2):257-267.
- Cazac, B. B. und J. Roes (2000): TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*, 13 (4):443-451.
- Cheifetz, S., T. Bellon, C. Cales, S. Vera, C. Bernabeu, J. Massagué und M. Letarte (1992): Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (27):19027-19030.
- Chi, P., P. Greengard und T. A. Ryan (2001): Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. *Nature Neuroscience*, 4 (12):1187-1193.
- Chin, J., A. Angers, L. J. Cleary, A. Eskin und J. H. Byrne (1999): TGF-beta1 in Aplysia: role in long-term changes in the excitability of sensory neurons and distribution of T β R-II-like immunoreactivity. *Learning & Memory*, 6 (3):317-330.

- Chin, J., A. Angers, L. J. Cleary, A. Eskin und J. H. Byrne (2002): Transforming Growth Factor β 1 alters synapsin distribution and modulates synaptic depression in *Aplysia*. *The Journal of Neuroscience*, 22 (9):RC 220.
- Chu, G. C., L. M. Moscoso, M. X. Sliwowski und J. P. Merlie (1995): Regulation of the acetylcholine receptor epsilon subunit gene by recombinant ARIA: an in vitro model for transynaptic gene regulation. *Neuron*, 14 (2):329-339.
- Chytil, A., M. A. Magnuson, C. V. E. Wright und H. L. Moses (2002): Conditional inactivation of the TGF- β type II receptor using cre:lox. *Genesis*, 32 (2):73-75.
- Cook, D. R., M. E. Doumit und R. A. Merkel (1993): Transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor-BB interact to affect proliferation of clonally derived porcine satellite cells. *Journal of Cellular Physiology*, 157 (2):307-312.
- Cusella-De Angelis, M. G., S. Molinari, A. Le Donne, M. Coletta, E. Vivarelli, M. Bouche, M. Molinaro, S. Ferrari und G. Cossu (1994): Differential response of embryonic and fetal myoblasts to TGF β : a possible regulatory mechanism of skeletal muscle histogenesis. *Development*, 120 (4):925-933.
- D'Antonio, M., A. Droggiti, M. L. Feltri, J. Roes, L. Wrabetz, R. Mirsky und K. R. Jessen (2006): TGF β type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *The Journal of Neuroscience*, 26 (33):8417-8427.
- Dai, Z. und H. B. Peng (1996): From neurite to nerve terminal: induction of presynaptic differentiation by target-derived signals. *Seminars in Neuroscience*, 8 (2):97-106.
- Day, W. A., K. Koishi und I. S. McLennan (2003): Transforming growth factor beta 1 may regulate the stability of mature myelin sheaths. *Experimental Neurology*, 184 (2):857-864.
- DeChiara, T. M., D. C. Bowen, D. M. Valenzuela, M. V. Simmons, W. T. Poueymirou, S. Thomas, E. Kinetz, D. L. Compton, E. Rojas, J. S. Park, C. Smith, P. S. DiStefano, D. J. Glass, S. J. Burden und G. D. Yancopoulos (1996): The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*, 85 (4):501-512.
- Derynck, R., P. B. Lindquist, A. Lee, D. Wen, J. Tamm, J. L. Graycar, L. Rhee, A. J. Mason, D. A. Miller, R. J. Coffey, H. L. Moses und E. Y. Chen (1988): A new type of transforming growth factor- β , TGF- β 3. *The EMBO Journal*, 7 (12):3737-3743.
- Derynck, R. und Y. E. Zhang (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*, 425 (6958):577-584.
- Dotti, C. G., C. A. Sullivan und G. A. Banker (1988): The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*, 8 (4):1454-1468.
- Dryer, S. E., L. Lhuillier, J. S. Cameron und M. Martin-Carabello (2003): Expression of K(Ca) channels in identified populations of developing vertebrate neurons: role of neurotrophic factors and activity. *Journal of Physiology (Paris)*, 97 (1):49-58.
- Dudu, V., T. Bittig, E. Entchev, A. Kicheva, F. Julicher und M. Gonzalez-Gaitan (2006): Postsynaptic mad signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Current Biology*, 16 (7):625-635.

- Dünker, N. und K. Krieglstein (2003): Reduced programmed cell death in the retina and defects in lens and cornea of Tgfbeta2(-/-) Tgfbeta3(-/-) double-deficient mice. *Cell and Tissue Research*, 313 (1):1-10.
- Einheber, S., M.-J. Hannocks, C. N. Metz, D. B. Rifkin und J. L. Salzer (1995): Transforming growth factor- β 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *The Journal of Cell Biology*, 129 (2):443-458.
- Epstein, J. A., P. Lam, L. Jepeal, R. L. Maas und D. N. Shapiro (1995): Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (20):11719-11722.
- Escher, P., E. Lacazette, M. Courtet, A. Blindenbacher, L. Landmann, G. Bezakova, K. C. Lloyd, U. Mueller und H. R. Brenner (2005): Synapses form in skeletal muscles lacking neuregulin receptors. *Science*, 308 (5730):1920-1923.
- Essrich, C., M. Lorez, J. A. Benson, J. M. Fritschy und B. Luscher (1998): Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nature Neuroscience*, 1 (7):563-571.
- Falls, D. L., K. M. Rosen, G. Corfas, W. S. Lane und G. D. Fischbach (1993): ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the Neu ligand family. *Cell*, 72 (5):801-815.
- Farkas, L. M., N. Dünker, E. Roussa, K. Unsicker und K. Krieglstein (2003): Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *The Journal of Neuroscience*, 23 (12):5178-5186.
- Farr, M., J. Mathews, D. F. Zhu und R. T. Ambron (1999): Inflammation causes a long-term hyperexcitability in the nociceptive sensory neurons of Aplysia. *Learning & Memory*, 6 (3):331-340.
- Feng, G., H. Tintrup, J. Kirsch, M. C. Nichol, J. Kuhse, H. Betz und J. R. Sanes (1998): Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science*, 282 (5392):1321-1324.
- Feng, Z. und C. P. Ko (2004): Transforming growth factor (TGF-) beta1 mediates Schwann cell-induced synaptogenesis at the neuromuscular junction *in vitro*. *Society of Neuroscience Abstracts*: session number 385.18.
- Feng, Z., S. Koirala und C.-P. Ko (2005): Synapse-glia interactions at the vertebrate neuromuscular junction. *The Neuroscientist*, 11 (5):503-513.
- Ferns, M., M. Deiner und Z. W. Hall (1996): Agrin-induced acetylcholine receptor clustering in mammalian muscle requires tyrosine phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 132 (5):937-944.
- Filvaroff, E. H., R. Ebner und R. Derynck (1994): Inhibition of myogenic differentiation in myoblasts expressing a truncated type II TGF-beta receptor. *Development*, 120 (5):1085-1095.
- Fischbach, G. D. und S. A. Cohen (1973): The distribution of acetylcholine sensitivity over uninnervated and innervated muscle fibers grown in cell culture. *Developmental Biology*, 31 (1):147-162.

- Flanders, K. C., G. Lüdecke, S. Engels, D. S. Cissel, A. B. Roberts, P. Kondaiah, R. Lafyatis, M. B. Sporn und K. Unsicker (1991): Localization and actions of transforming growth factor- β s in the embryonic nervous system. *Development*, 113 (1):183-191.
- Flanders, K. C., G. Lüdecke, J. Renzing, C. Hamm, D. S. Cissel und K. Unsicker (1993): Effects of TGF β s and bFGF on astroglial growth and gene expression in vitro. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 4 (5):406-417.
- Freeman, M. R. (2006): Sculpting the nervous system: glial control of neuronal development. *Current Opinion in Neurobiology*, 16 (1):119–125.
- Fu, A. K. Y., F. C. F. Ip, W.-Y. Fu, J. Cheung, J. H. Wang, W.-H. Yung und N. Y. Ip (2005): Aberrant motor axon projection, acetylcholine receptor clustering, and neurotransmission in cyclin-dependent kinase 5 null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 102 (42):15224–15229.
- Fukushima, T., R.-Y. Liu und J. H. Byrne (2007): Transforming Growth Factor-2 modulates synaptic efficacy and plasticity and induces phosphorylation of CREB in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 17 (1):5-9.
- Gautam, M., P. G. Noakes, L. Moscoso, F. Rupp, R. H. Scheller, J. P. Merlie und J. R. Sanes (1996): Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, 85 (4):525-535.
- Gautam, M., P. G. Noakes, J. Mudd, M. Nichol, G. C. Chu, J. R. Sanes und J. P. Merlie (1995): Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, 377 (6546):232-236.
- Goodman, C. S. und C. J. Shatz (1993): Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72/Neuron 10, (Suppl.):77-98.
- Gottschall, J. (1981): The diaphragm of the rat and its innervation. Muscle fibre composition; perikarya and axons of efferent and afferent neurons. *Anatomy and Embryology (Berlin)*, 161 (4):405-417.
- Greer, J. J., D. W. Allan, M. Martin-Carabello und R. P. Lemke (1999): An overview of phrenic nerve and diaphragm muscle development in the perinatal rat. *Journal of Applied Physiology*, 86 (3):779-786.
- Greer, J. J., G. D. Funk und K. Ballanyi (2006): Preparing for the first breath: prenatal maturation of respiratory neural control. *Journal of Physiology*, 570 (Pt 3):437-444.
- Greer, J. J., J. C. Smith und J. L. Feldman (1992): Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brain-stem spinal cord in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 67 (4):996-999.
- Grinnell, A. D. (1995): Dynamics of nerve-muscle interaction in developing and mature neuromuscular junctions. *Physiological Reviews*, 75 (4):789-834.
- Haghighi, A. P., B. D. McCabe, R. D. Fetter, J. E. Palmer, S. Hom und C. S. Goodman (2003): Retrograde control of synaptic transmission by postsynaptic CaMKII at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron*, 39 (2):255-267.
- Hall, Z. W. und J. R. Sanes (1993): Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. *Cell*, 72 Suppl:99-121.

-
- Hartmann, M., R. Heumann und V. Lessmann (2001): Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *The EMBO Journal*, 20 (21):5887-5897.
- He, F. und Y. E. Sun (2007): Glial cells more than support cells? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (4):661-665.
- Hefti, F. (1997): Pharmacology of neurotrophic factors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37:239-267.
- Ho, T. W., L. A. Bristol, C. Coccia, Y. Li, J. Milbrandt, E. Johnson, L. Jin, O. Bar-Peled, J. W. Griffin und J. D. Rothstein (2000): TGFbeta trophic factors differentially modulate motor axon outgrowth and protection from excitotoxicity. *Experimental Neurology*, 161 (2):664-675.
- Holley, R. W., P. Bohlen, R. Fava, J. H. Baldwin, G. Kleemann und R. Armour (1980): Purification of kidney epithelial cell growth inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 77 (10):5989-5992.
- Hosaka, M., R. E. Hammer und T. C. Südhof (1999): A phospho-switch controls the dynamic association of synapsins with synaptic vesicles. *Neuron*, 24 (2):377-387.
- Huang, E. J. und L. F. Reichardt (2001): Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience*, 24:677-736.
- Inman, G. J., F. J. Nicolás, J. F. Callahan, J. D. Harling, L. M. Gaster, A. D. Reith, N. Laping, J. und C. S. Hill (2002): SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular Pharmacology*, 62 (1):65-74.
- Jakowlew, S. B., P. J. Dillard, P. Kondaiah, M. B. Sporn und A. B. Roberts (1988): Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a novel transforming growth factor-beta messenger ribonucleic acid from chick embryo chondrocytes. *Molecular Endocrinology*, 2 (8):747-755.
- Jessell, T. M., R. E. Siegel und G. D. Fischbach (1979): Induction of acetylcholine receptors on cultured skeletal muscle by a factor extracted from brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 76 (10):5397-5401.
- Jiang, Y., I. S. McLennan, K. Koishi und I. A. Hendry (2000): TGF-beta2 is anterogradely and retrogradely transported in motoneurons and up-regulated after nerve-injury. *Neuroscience*, 97 (4):735-742.
- Jovanovic, J. N., F. Benfenati, Y. L. Siow, T. S. Sihra, J. S. Sanghera, S. L. Pelech, P. Greengard und A. J. Czernik (1996): Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 93 (8):3679-3683.
- Jovanovic, J. N., A. J. Czernik, A. A. Fienberg, P. Greengard und T. S. Sihra (2000): Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nature Neuroscience*, 3 (4):323-329.
- Kandel, E. R. und S. A. Siegelbaum (2000): Synaptic Integration. Kapitel 12, S. 207-228, in: *Principles of neural science*, E. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell (eds.); 4., internationale Auflage, McGraw Hill.
-

- Kasthuri, N. und J. W. Lichtman (2003): The role of neuronal identity in synaptic competition. *Nature*, 424 (6947):426-430.
- Koenen, M., C. Peter, A. Villarroel, V. Witzemann und B. Sakmann (2005): Acetylcholine receptor channel subtype directs the innervation pattern of skeletal muscle. *EMBO Reports*, 6 (6):570-576.
- Koenig, J., S. De La Porte und J. Chapron (1998): The Schwann cell at the neuromuscular junction. *Journal of Physiology (Paris)*, 92 (3-4):153-155.
- Koirala, S., L. V. Reddy und C.-P. Ko (2003): Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology*, 32 (5-8):987-1002.
- Koli, K., J. Saharinen, M. Hyytiäinen, C. Penttinen und J. Keski-Oja (2001): Latency, activation, and binding proteins of TGF- β . *Microscopy Research and Technique*, 52 (4):354-362.
- Kondaiah, P., M. J. Sands, J. M. Smith, A. Fields, A. B. Roberts, M. B. Sporn und D. A. Melton (1990): Identification of a novel transforming growth factor- β (TGF- β 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (2):1089-1093.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, M. B. Kennedy und P. H. Seeburg (1995): Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269 (5231):1737-1740.
- Krieglstein, K. (2004): Factors promoting survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *Cell and Tissue Research*, 318 (1):73-80.
- Krieglstein, K. (2006): Cell death in the nervous system. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 557:1-10.
- Krieglstein, K., L. Farkas und K. Unsicker (1998a): TGF- β regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *Journal of Neurobiology*, 37 (4):563-572.
- Krieglstein, K., P. Henheik, L. Farkas, J. Jaszai, D. Galter, K. Krohn und K. Unsicker (1998b): Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *The Journal of Neuroscience*, 18 (23):9822-9834.
- Krieglstein, K., S. Richter, L. Farkas, N. Schuster, N. Dünker, R. W. Oppenheim und K. Unsicker (2000): Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death. *Nature Neuroscience*, 3 (11):1085-1090.
- Krieglstein, K., M. Rufer, C. Suter-Crazzolara und K. Unsicker (1995a): Neural functions of the transforming growth factors beta. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 13 (3-4):301-315.
- Krieglstein, K., J. Strelau, A. Schober, A. Sullivan und K. Unsicker (2002): TGF- β and the regulation of neuron survival and death. *Journal of Physiology (Paris)*, 96 (1-2):25-30.
- Krieglstein, K., C. Suter-Crazzolara, W. H. Fischer und K. Unsicker (1995b): TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *The EMBO Journal*, 14 (4):736-742.

- Krieglstein, K., C. Suter-Crazzolara und K. Unsicker (1995c): Development of mesencephalic dopaminergic neurons and the transforming growth factor-beta superfamily. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 46:209-216.
- Krieglstein, K. und K. Unsicker (1994): Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience*, 63 (4):1189-1196.
- Krieglstein, K. und K. Unsicker (1996): Distinct modulatory actions of TGF-beta and LIF on neurotrophin-mediated survival of developing sensory neurons. *Neurochemical Research*, 21 (7):843-850.
- Kummer, T. T., T. Misgeld und J. R. Sanes (2006): Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Current Opinion in Neurobiology*, 16 (1):74-82.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- Lee, K. J. und T. M. Jessell (1999): The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 22:261-294.
- Lessmann, V. (1998): Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *General pharmacology*, 31 (5):667-674.
- Lhuillier, L. und S. E. Dryer (2000): Developmental regulation of neuronal K_{Ca} channels by TGF β 1: transcriptional and posttranscriptional effects mediated by Erk MAP Kinase. *The Journal of Neuroscience*, 20 (15):5616-5622.
- Li, Z. und M. Sheng (2003): Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (11):833-841.
- Lin, W., R. W. Burgess, B. Dominguez, S. L. Pfaff, J. R. Sanes und K. F. Lee (2001): Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature*, 410 (6832):1057-1064.
- Lin, W., H. B. Sanchez, T. Deerinck, J. K. Morris, M. Ellisman und K. F. Lee (2000): Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 97 (3):1299-1304.
- Lohof, A. M., N. Y. Ip und M. M. Poo (1993): Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*, 363 (6427):350-353.
- Lopez-Casillas, F., J. L. Wrana und J. Massagué (1993): Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell*, 73 (7):1435-1444.
- López-Coviella, I., B. Berse, R. Krauss, R. S. Thies und J. K. Blusztajn (2000): Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science*, 289 (5477):313-316.
- Lu, B. und H. S. Je (2003): Neurotrophic regulation of the development and function of the neuromuscular synapses. *Journal of Neurocytology*, 32 (5-8):931-941.
- Maeda, S., M. Hayashi, S. Komiya, T. Imamura und K. Miyazono (2004): Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *The EMBO Journal*, 23 (3):552-563.

- Marqués, G., H. Bao, T. E. Haerry, M. J. Shimell, P. Duchek, B. Zhang und M. B. O'Connor (2002): The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron*, 33 (4):529-543.
- Marqués, G., T. E. Haerry, M. L. Crotty, M. Xue, B. Zhang und M. B. O'Connor (2003): Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development*, 130 (22):5457-5470.
- Massagué, J. (1990): The Transforming Growth Factor- β family. *Annual Review of Cell Biology*, 6:597-641.
- Massagué, J., S. Cheifetz, T. Endo und B. Nadal-Ginard (1986): Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 83 (21):8206-8210.
- McCabe, B. D., S. Hom, H. Aberle, R. D. Fetter, G. Marques, T. E. Haerry, H. Wan, M. B. O'Connor, C. S. Goodman und A. P. Haghighi (2004): Highwire regulates presynaptic BMP signaling essential for synaptic growth. *Neuron*, 41 (6):891-905.
- McCabe, B. D., G. Marques, A. P. Haghighi, R. D. Fetter, M. L. Crotty, T. E. Haerry, C. S. Goodman und M. B. O'Connor (2003): The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron*, 39 (2):241-254.
- McLennan, I. S. und K. Koishi (1994): Transforming growth factor-beta-2 (TGF-beta 2) is associated with mature rat neuromuscular junctions. *Neuroscience Letters*, 177 (1-2):151-154.
- McLennan, I. S. und K. Koishi (2002): The transforming growth factor-betas: multifaceted regulators of the development and maintenance of skeletal muscles, motoneurons and Schwann cells. *International Journal of Developmental Biology*, 46 (4):559-567.
- McLennan, I. S., K. Koishi, M. Zhang und N. Murakami (1998): The non-synaptic expression of transforming growth factor-beta 2 is neurally regulated and varies between skeletal muscle fibre types. *Neuroscience*, 87 (4):845-853.
- Menegon, A., D. Bonanomi, C. Albertinazzi, F. Lotti, G. Ferrari, H.-T. Kao, F. Benfenati, P. Baldelli und F. Valtorta (2006): Protein Kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca^{2+} -dependent synaptic activity. *The Journal of Neuroscience*, 26 (45):11670-11681.
- Mirsky, R. und K. R. Jessen (1996): Schwann cell development, differentiation and myelination. *Current Opinion in Neurobiology*, 6 (1):89-96.
- Misgeld, T., R. W. Burgess, R. M. Lewis, J. M. Cunningham, J. W. Lichtman und J. R. Sanes (2002): Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron*, 36 (4):635-648.
- Mishina, M., T. Takai, K. Imoto, M. Noda, T. Takahashi, S. Numa, C. Methfessel und B. Sakmann (1986): Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature*, 321 (6068):406-411.
- Nathan, C. und M. B. Sporn (1991): Cytokines in context. *The Journal of Cell Biology*, 113 (5):981-986.

- Nestler, E. J. und P. Greengard (1983): Protein phosphorylation in the brain. *Nature*, 305 (5935):583-588.
- Niethammer, M., E. Kim und M. Sheng (1996): Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *The Journal of Neuroscience*, 16 (7):2157-2163.
- Noakes, P. G., M. Gautam, J. Mudd, J. R. Sanes und J. P. Merlie (1995): Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature*, 374 (6519):258-262.
- Olson, E. N., E. Sternberg, J. S. Hu, G. Spizz und C. Wilcox (1986): Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *The Journal of Cell Biology*, 103 (5):1799-1805.
- Oppenheim, R. W. (1991): Cell death during development of the nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 14:453-501.
- Oppenheim, R. W., D. Prevet, A. D'Costa, S. Wang, L. J. Houenou und J. M. McIntosh (2000): Reduction of neuromuscular activity is required for the rescue of motoneurons from naturally occurring cell death by nicotinic-blocking agents. *The Journal of Neuroscience*, 20 (16):6117-6124.
- Oshima, M., H. Oshima und M. M. Taketo (1996): TGFbeta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Developmental Biology*, 179 (1):297-302.
- Packard, M., D. Mathew und V. Budnik (2003): Wnts and TGF beta in synaptogenesis: old friends signalling at new places. *Nature Reviews Neuroscience*, 4 (2):113-120.
- Parkinson, D. B., Z. Dong, H. Bunting, J. Whitfield, C. Meier, H. Marie, R. Mirsky und K. R. Jessen (2001): Transforming growth factor β (TGF β) mediates Schwann cell death *in vitro* and *in vivo*: examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGF β -mediated death to Schwann cell differentiation. *The Journal of Neuroscience*, 21 (21):8572-8585.
- Pathy, L. und K. Nikolics (1993): Functions of agrin and agrin-related proteins. *Trends in Neurosciences*, 16 (2):76-81.
- Peng, H. B., J. F. Yang, Z. Dai, C. W. Lee, H. W. Hung, Z. H. Feng und C. P. Ko (2003): Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 23 (12):5050-5060.
- Peterziel, H., K. Unsicker und K. Kriegstein (2002): TGFbeta induces GDNF responsiveness in neurons by recruitment of GFRalpha1 to the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology*, 159 (1):157-167.
- Poo, M. M. (2001): Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (1):389-442.
- Pozzo-Miller, L. D., W. Gottschalk, L. Zhang, K. McDermott, J. Du, R. Gopalakrishnan, C. Oho, Z.-H. Sheng und B. Lu (1999): Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *The Journal of Neuroscience*, 19 (12):4972-4983.

- Prehn, J. H., B. Peruche, K. Unsicker und K. Krieglstein (1993): Isoform-specific effects of transforming growth factors- β on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *Journal of Neurochemistry*, 60 (5):1665-1672.
- Proetzel, G., S. A. Pawlowski, M. V. Wiles, M. Yin, G. P. Boivin, P. N. Howles, J. Ding, M. W. Ferguson und T. Doetschman (1995): Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nature Genetics*, 11 (4):409-414.
- Rahhal, B. (2006): Functions of TGF- β 2 and GDNF in the development of the mouse nervous system: evidence from double mutant mice. Dissertation, Universität Göttingen.
- Rawson, J. M., M. Lee, E. L. Kennedy und S. B. Selleck (2003): Drosophila neuromuscular synapse assembly and function require the TGF-beta type I receptor saxophone and the transcription factor Mad. *Journal of Neurobiology*, 55 (2):134-150.
- Reissmann, E., U. Ernsberger, P. H. Francis-West, D. Rueger, P. M. Brickell und H. Rohrer (1996): Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development*, 122 (7):2079-2088.
- Ribchester, R. R., D. Thomson, L. J. Haddow und Y. A. Ushkaryov (1998): Enhancement of spontaneous transmitter release at neonatal mouse neuromuscular junctions by the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Journal of Physiology*, 512 (3):625-641.
- Richter, D. W. und K. M. Spyer (2001): Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of *in vivo* and *in vitro* models. *Trends in Neurosciences*, 24 (8):464-472.
- Ridley, A. J., J. B. Davis, P. Stroobant und H. Land (1989): Transforming growth factors- β 1 and β 2 are mitogens for rat Schwann cells. *The Journal of Cell Biology*, 109 (6 Pt 2):3419-3424.
- Roberts, A. B. und M. B. Sporn (1990): The transforming growth factor- β s. in: *Peptide growth factors and their receptors*, Volume 95/1, S. 419-472, Sporn, M. B. und Roberts, A. B. (eds.), Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York).
- Rosahl, T. W., D. Spillane, M. Missler, J. Herz, D. K. Selig, J. R. Wolff, R. E. Hammer, R. C. Malenka und T. C. Südhof (1995): Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature*, 375 (6531):488-493.
- Roussa, E., L. M. Farkas und K. Krieglstein (2004): TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8. *Neurobiology of Disease*, 16 (2):300-310.
- Salinas, P. C. (2003): Synaptogenesis: Wnt and TGF-beta take centre stage. *Current Biology*, 13 (2):R60-62.
- Sanes, J. R. und T. M. Jessel (2000): The formation and regeneration of synapses. Kapitel 55, S. 1087-1114, in: *Principles of neural science*, E. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell (eds.); 4., internationale Auflage, McGraw Hill.
- Sanes, J. R. und J. W. Lichtman (1999): Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annual Review of Neuroscience*, 22:389-442.
- Sanes, J. R. und J. W. Lichtman (2001): Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nature Reviews Neuroscience*, 2 (11):791-805.

- Sanford, L. P., I. Ormsby, A. C. Gittenberger-de Groot, H. Sariola, R. Friedman, G. P. Boivin, E. L. Cardell und T. Doetschman (1997): TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, 124 (13):2659-2670.
- Scheiffele, P. (2003): Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 26:485-508.
- Schinder, A. F. und M.-m. Poo (2000): The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences*, 23 (12):639-645.
- Schubert, D. (1992): Synergistic interactions between transforming growth factor beta and fibroblast growth factor regulate Schwann cell mitosis. *Journal of Neurobiology*, 23 (2):143-148.
- Schuster, N. und K. Kriegstein (2002): Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 307 (1):1-14.
- Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin und et al. (1992): Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359 (6397):693-699.
- Slager, H. G., W. van Inzen, E. Freund, A. J. M. van den Eijnden-van Raaij und C. L. Mummery (1993): Transforming growth factor- β in the early mouse embryo: implications for the regulation of muscle formation and implantation. *Developmental Genetics*, 14 (3):212-224.
- Snider, W. D. und J. W. Lichtman (1996): Are neurotrophins synaptotrophins? *Molecular and Cellular Neurosciences*, 7 (6):433-442.
- Solovyan, V. T. und J. Keski-Oja (2005): Apoptosis of human endothelial cells is accompanied by proteolytic processing of latent TGF- β binding proteins and activation of TGF- β . *Cell Death and Differentiation*, 12 (7):815-826.
- Südhof, T. C. (2004): The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 27:509-547.
- ten Dijke, P., P. Hansen, K. K. Iwata, C. Pieler und J. G. Foulkes (1988): Identification of another member of the transforming growth factor type β gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 85 (13):4715-4719.
- Thoenen, H., C. Bandtlow und R. Heumann (1987): The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology*, 109:145-178.
- Tornqvist, E. und H. Aldskogius (1994): Motoneurone survival is not affected by the proximo-distal level of axotomy but by the possibility of regenerating axons to gain access to the distal stump. *Journal of Neuroscience Research*, 39 (2):159-165.
- Tyler, W. J. und L. D. Pozzo-Miller (2001): BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience*, 21 (12):4249-4258.

- Unsicker, K. und K. Kriegstein (2000): Co-activation of TGF- β and cytokine signaling pathways are required for neurotrophic functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 11 (1-2):97-102.
- Vaidya, T. B., S. J. Rhodes, E. J. Taparowsky und S. F. Konieczny (1989): Fibroblast growth factor and transforming growth factor β repress transcription of the myogenic regulatory gene MyoD1. *Molecular and Cellular Biology*, 9 (8):3576-3579.
- Valtorta, F., F. Benfenati und P. Greengard (1992): Structure and function of the Synapsins. *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (11):7195-7198.
- Varoqueaux, F., M. S. Son, J. J. Plomp und N. Brose (2005): Aberrant morphology and residual transmitter release at the munc13-deficient mouse neuromuscular synapse. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (14):5973-5984.
- Verhage, M., A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze und T. C. Südhof (2000): Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*, 287 (5454):864-869.
- Waites, C. L., A. M. Craig und C. C. Garner (2005): Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annual Review of Neuroscience*, 28:251-274.
- Wang, C. Y., F. Yang, X. P. He, H. S. Je, J. Z. Zhou, K. Eckermann, D. Kawamura, L. Feng, L. Shen und B. Lu (2002): Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (12):10614-10625.
- Wang, X. H. und M. M. Poo (1997): Potentiation of developing synapses by postsynaptic release of neurotrophin-4. *Neuron*, 19 (4):825-835.
- Wells, R. G., H. Yankelev, L. H. Y. und H. F. Lodish (1997): Biosynthesis of the type I and type II TGF- β receptors. Implications for complex formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (17):11444-11451.
- Williams, R. W. und K. Herrup (1988): The control of neuron number. *Annual Review of Neuroscience*, 11:423-453.
- Witzemann, V. (2006): Development of the neuromuscular junction. *Cell and Tissue Research*, 326 (2):263-271.
- Woolf, C. J., M. L. Reynolds, M. S. Chong, P. Emson, N. Irwin und L. I. Benowitz (1992): Denervation of the motor endplate results in the rapid expression by terminal Schwann cells of the growth-associated protein GAP-43. *The Journal of Neuroscience*, 12 (10):3999-4010.
- Wrann, M., S. Bodmer, R. de Martin, C. Siepl, R. Hofer-Warbinek, K. Frei, E. Hofer und A. Fontana (1987): T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5 kd protein closely related to transforming growth factor- β . *The EMBO Journal*, 6 (6):1633-1636.
- Yaffe, D. und O. Saxel (1977): Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270 (5639):725-727.
- Yamagata, M., J. R. Sanes und J. A. Weiner (2003): Synaptic adhesion molecules. *Current Opinion in Cell Biology*, 15 (5):621-632.

- Zentella, A. und J. Massagué (1992): Transforming growth factor β induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 89 (11):5176-5180.
- Zhang, F., S. Endo, L. J. Cleary, A. Eskin und J. H. Byrne (1997): Role of Transforming Growth Factor- β in long-term synaptic facilitation in *Aplysia*. *Science*, 275 (5304):1277-1289.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	TGF- β -Signalwege.	3
Abb. 2	Schematische Darstellung der Lokalisation der TGF- β -Isoformen im reifen neuromuskulären System und nach Motoneuron-Axotomie.	5
Abb. 3	Repräsentatives Ergebnis einer Genotypisierung für <i>Tgf-β2^{+/-}</i> -, <i>Tgf-β2^{+/-}</i> - und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Tiere.	42
Abb. 4	Gewicht der TGF- β 2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5.	43
Abb. 5	Phänotyp von Wildtyp- und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Embryonen am Embryonaltag 18,5.	43
Abb. 6	Repräsentatives Respirationsverhalten von Wildtyp und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> am Embryonaltag 18,5.	44
Abb. 7	Sagittale Schnitte durch das Zwerchfell von <i>Tgf-β2^{+/-}</i> - und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Mäusen am Embryonaltag 18,5 (HE-Färbung).	46
Abb. 8	Zwerchfelle von Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5: Phasenkontrast, Kernfärbung (DAPI) und immunzytochemische Darstellung von Aktin.	47
Abb. 9	Verzweigung und Faszikulation des N. phrenicus in Wildtyp- und <i>TGF-β2^{-/-}</i> -Embryonen am Embryonaltag 18,5.	50
Abb. 10	Darstellung und quantitative Auswertung der Verzweigungen des N. phrenicus in Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Embryonen (E 18,5).	51
Abb. 11	Immunhistochemische Darstellung von AChR und N. phrenicus am Embryonaltag 14,5.	54
Abb. 12	Konfokale Aufnahmen von AChR-Clustern am Embryonaltag 18,5.	55
Abb. 13	Quantitativer Vergleich der Anzahl der AChR-Cluster in Zwerchfellen von Wildtyp- und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Mäusen am Embryonaltag 18,5.	55
Abb. 14	Bestimmung der Breite des zentralen Endplatten-Bandes am Embryonaltag 18,5.	57
Abb. 15	Terminale Aufspaltung des N. phrenicus und Innervation einzelner Endplatten in Wildtyp- und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Mäusen am Embryonaltag 18,5.	58
Abb. 16	Darstellung der Schwannzellen des N. phrenicus und von terminalen Schwannzellen an der neuromuskulären Endplatte in Wildtypen und TGF- β 2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5.	60
Abb. 17	Differenzierte C2C12-Zellen sind TGF- β -responsiv.	63
Abb. 18	Inhibition des TGF- β -Signalweges vermindert Agrin-induziertes AChR-Clustern in C2C12-Zellen.	64
Abb. 19	<i>Patch-Clamp</i> -Ableitungen (Ganzzell-Modus) von spontaner Gesamtaktivität sowie spontaner inhibitorischer und exzitatorischer synaptischer Transmission.	67
Abb. 20	Histologische Darstellung (Nissl-Färbung) und Darstellung von NF 150 kD-positiven Neuronen in der ventralen Medulla von Wildtyp- und TGF- β 2-defizienten Embryonen am Embryonaltag 18,5.	70
Abb. 21	Immunhistochemische Darstellung verschiedener synaptischer Proteine in der ventralen Medulla im Bereich des Prä-Bötzing-Komplexes.	71

Abb. 22	Quantitative Bestimmung der Anzahl und Größe von Synapsen, die durch verschiedene synaptischer Proteine dargestellt wurden, in der ventralen Medulla im Bereich des Prä-Bötzing-Komplexes.	73
Abb. 23	Hippokampale Neurone sind mit Molekülen zur TGF- β -Signaltransduktion ausgestattet und nach TGF- β -Stimulation kommt es zur Phosphorylierung von Smad2.	75
Abb. 24	vGlut1- und Gephyrin-positive Synapsen in primären hippocampalen Neuronenkulturen an DIV 5, 8 und 11 nach der Behandlung mit TGF- β 1 und anti-TGF- β (1,2,3).	76
Abb. 25	Phosphorylierung von Synapsin in hippocampalen Neuronen nach Stimulation mit TGF- β .	79
Abb. 26	Darstellung der verschiedenen Aspekte der postsynaptischen Differenzierung und von möglichen Erklärungen für eine verminderte Anzahl von AChR-Clustern.	85
Abb. 27	Hypothetisches Modell für den Einfluss von TGF- β auf die Phosphorylierung von Synapsin.	90

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über homologe TGF- β -Liganden, TGF- β -Rezeptoren und Smad-Proteine in Drosophila und Säugetieren.	16
Tab. 2	Verwendete Primer-Paare mit Angabe der jeweiligen Hybridisierungstemperatur und der erwarteten Fragmentgröße.	26
Tab. 3	Übersicht über die Genotypen aller analysierten <i>Tgf-β2^{+/-}</i> , <i>Tgf-β2^{+/-}</i> und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Tiere.	42
Tab. 4	Zusammenfassung der abgeleiteten postsynaptischen Ströme in Wildtyp- und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Embryonen.	67
Tab. 5	Synapsenzahl und -größe im Prä-Bötzing-Komplex in Wildtyp- und <i>Tgf-β2^{-/-}</i> -Embryonen am Embryonaltag 18,5.	73
Tab. 6	Anzahl und Größe von Synapsen in hippocampalen Neuronen in vitro nach Behandlung mit TGF- β 1 und anti-TGF- β (1,2,3) an DIV 5, 8 und 11.	76

7.3 Veröffentlichungen

1. Hinkerohe, D., D. Smikalla, A. Haghighia, **K. Heupel**, C. G. Haase, R. Dermietzel, P. M. Faustmann: *Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model*. *Glia* 2005, 52 (2): 85-97.
2. Rickmann, M., B. Orlowski, **K. Heupel**, E. Roussa (2007): *Expression and subcellular localization of Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (SLC4A4) variants NBCe1-A and NBCe1-B in mouse brain*. *Neuroscience* 2007, 146 (3): 1220-1231.
3. **Heupel, K.**, V. Sargsyan, M. Rickmann, F. Varoqueaux, W. Zhang, K. Kriegstein (2007): *Transforming growth factor- β 2 is not involved in synaptogenesis but is required for efficient synaptic transmission*. (in Vorbereitung)

Vorträge

1. **Heupel, K.** (2006): *Transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) is required for the development of functional synapses*. 23. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, September 2006, Würzburg.

Posterbeiträge

1. **K. Heupel** and K. Kriegstein (2005): *Absence of transforming growth factor- β (TGF- β) causes changes in acetylcholine receptor clustering at the neuromuscular junction of the mouse diaphragm*. 30. Göttinger Neurobiologen-Tagung /6th Meeting of the German Neuroscience Society, Februar 2005, Göttingen.
2. **K. Heupel**, V. Sargsyan, F. Varoqueaux, W. Zhang, K. Kriegstein (2007): *Transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) is required for the development of functional synapses*. 31. Göttinger Neurobiologen-Tagung /7th Meeting of the German Neuroscience Society, März 2007, Göttingen.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Katharina Heupel
Wohnort: Lichtenbergstrasse 3, 37075 Göttingen
Geburtsdatum/-ort: 9. Oktober 1978 in Frankfurt am Main

Schulbildung

Zeitraum: 1989 - 1998
Schule: Carl-Schurz-Schule, Frankfurt am Main
Abschluss: Abitur (Note: sehr gut)

Studium

Zeitraum: Okt. 1998 - Juli 2003
Hochschule: Ruhr-Universität Bochum
Abschluss: Diplom in Biochemie (Note: sehr gut)
Titel der Diplomarbeit: Einfluss entzündlicher Milieuveränderungen auf astrogliale Kopplung und Connexin43-Expression (Note: sehr gut)
Institut für Neuroanatomie und Molekulare Hirnforschung der Ruhr-Universität Bochum
(PD Dr. Pedro. M. Faustmann)

Promotion

Zeitraum: Okt. 2003 - Dez. 2004 und Aug. 2005 - März 2007
Abteilung: Neuroanatomie, Georg-August-Universität Göttingen
(Prof. Dr. Kerstin Kriegelstein)
Titel: Die Rolle von transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β) in der Entwicklung von Synapsen
Zeitraum: Jan. 2005 - Juli 2005
Abteilung: Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, GB
(Prof. Dr. Rhona Mirsky und Prof. Dr. Kristján Jessen)

Stipendium

Zeitraum: Okt. 2003 - Aug. 2006
Förderung: Doktoranden-Stipendium des Europäischen DFG-Graduiertenkollegs 632: „Neuroplasticity - From Molecules to Systems“