

Aus dem Institut für Physiologische Chemie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Oliver Hantschel  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# Die Bedeutung der Interaktion vom Cyclase- assoziierten Protein 1 und Cofilin 1 in Wachstumskegeln hippocampaler Neurone

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Humanmedizin

aus dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Thuy-An Duong, geboren in Göttingen

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
22.06.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Marco B. Rust

Korreferent: Prof. Dr. Pagenstecher

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Entwicklung hippocampaler Neurone.....	1
1.2 Wachstumskegel als Voraussetzung für Axonmigration.....	2
1.3 Das Aktinzytoskelett.....	6
1.4 Cyclase-assoziierte Proteine (CAPs).....	7
1.5 Aktin-depolymerisierende Faktoren (ADF)/Cofilin.....	12
1.6 Zielsetzung.....	14
2. Materialien und Methoden.....	16
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	17
2.1.3 Primäre Antikörper.....	18
2.1.4 Sekundäre Antikörper.....	18
2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe für Immunzytochemie.....	19
2.1.6 Plasmide.....	19
2.1.7 Labormaterialien.....	19
2.1.8 Geräte.....	20
2.1.9 Software.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Mausmodelle.....	21
2.2.2 Beschichtung der Wellplatten.....	21
2.2.3 Präparation der Hippocampi.....	22
2.2.4 Dissoziation des hippocampalen Gewebes.....	22
2.2.5 Nukleofektion.....	23
2.2.6 Erneutes Ausplattieren der Neurone.....	23
2.2.7 Immunzytochemie.....	24
2.2.8 Konfokale Mikroskopie.....	24
2.2.9 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP).....	24
2.2.10 Auswertung und statistische Analysen.....	25
3. Ergebnisse.....	26

3.1 Nachweis der CAP1-Deletion durch Transfektion mit mC-Cre.....	26
3.2 Die Rolle von CAP 1 und Cofilin 1 in der Aufrechterhaltung der Aktindynamik .....	27
3.3 Veränderte Größe von Wachstumskegeln in CAP1- und/oder Cofilin1-defizienten hippocampalen Neuronen .....	32
3.4 Regulation der Größe von Wachstumskegeln durch CAP1 und Cofilin1.....	35
4. Diskussion.....	40
4.1 Die Rolle von CAP1 und Cofilin1 in der Neurogenese .....	40
4.2 Die Rolle von Cofilin1 in Wachstumskegeln.....	41
4.3 Die Rolle von CAP1 in Wachstumskegeln.....	42
4.4 Die Rolle der Interaktion von CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln .....	44
4.5 Ausblick .....	49
5. Zusammenfassung.....	51
6. Summary .....	53
7. Literaturverzeichnis.....	55
8. Verzeichnis der akademischen Lehrer/innen.....	64
9. Danksagung .....	66

## Abkürzungsverzeichnis

ABP	Aktin-bindendes Protein
ADF	Aktin-depolymerisierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ca.	circa
CAP	Cyclase-assoziiertes Protein
CARP	CAPs und X-gebundenes Retinitis pigmentosa 2 Protein
Cfl1	Cofilin 1 (Gen)
CLS	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cof1	Cofilin 1 (Protein)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dKO	Doppelknockout
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBS	Fetales bovines Serum
flx	mit LoxP flankiert
FRAP	Fluoreszenzwiederkehr nach Photoausbleichung (Fluorescence recovery after photobleaching)
G-Aktin	globuläres Aktin
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde (hour)
HBS	HEPES-buffered saline
HeNe	Helium-Neon
HFD	helikal gefaltete Domäne (helical folded domain)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

KO	Knockout
l	Liter
L-15	Leibovitz's L15-Medium
LIMK	LIM-Kinase
μ	mikro-
M	mol/l
mC-Cre	mit m-Cherry gekoppelte Cre-Rekombinase
mC-Cre-mut	mit m-Cherry gekoppelte, inaktive Cre-Rekombinase
m	milli-
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NB	Neurobasales Medium
P1/2	Prolinreiche Region 1/2
PBS	Phosphate-buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
P-Domäne	Periphere Domäne
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
rel.	relative
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minutes)
s	Sekunde
T-Zone	Transitionale Zone
TES	testikuläres Protein
TIV	Tage in vitro
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WH2	WASP-Homologie 2
Z-Domäne	Zentrale Domäne

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> – Entwicklungsstadien muriner hippocampaler Neurone in Kultur .....	1
<b>Abbildung 2</b> – Struktur von Wachstumskegeln .....	3
<b>Abbildung 3</b> - Schematische Darstellung der Fortbewegung von Wachstumskegeln in Abhängigkeit des Integrin-abhängigen „molecular clutch“ .....	5
<b>Abbildung 4</b> – Die Regulation des Aktin-Tretmühlenmechanismus durch die aktinbindenden Proteine CAP, ADF/Cofilin und Profilin .....	7
<b>Abbildung 5</b> – Struktur von CAP .....	9
<b>Abbildung 6</b> – Nachweis der CAP1-Deletion in hippocampalen Neuronen an TIV 2.....	27
<b>Abbildung 7</b> – Die Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität ist nach KO von CAP1 und/oder Cofilin beeinträchtigt.....	29
<b>Abbildung 8</b> – Der KO von CAP1 und/oder Cofilin1 führt zu einer verminderten Aktindynamik in hippocampalen Wachstumskegeln .....	31
<b>Abbildung 9</b> – Sowohl der KO von CAP1 bzw. Cofilin1 allein als auch der dKO von CAP1 und Cofilin1 führen zu einer Vergrößerung der Wachstumskegel.....	34
<b>Abbildung 10</b> – CAP1 und Cofilin1 zusammen können die Wachstumskegel-Größe normalisieren .....	38
<b>Abbildung 11</b> – CAP1 und Cofilin1 zusammen werden für die Regulation der Wachstumskegel-Größe benötigt.....	39

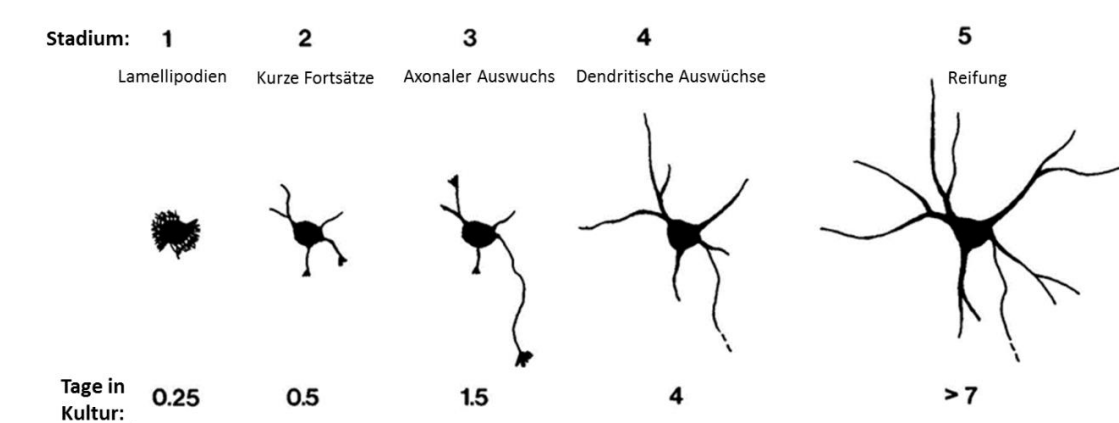
## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> – Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	16
<b>Tabelle 2</b> – Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzungen.....	17
<b>Tabelle 3</b> – Verwendete primäre Antikörper mit ihren entsprechenden Verdünnungen für die immunzytochemischen Untersuchungen .....	18
<b>Tabelle 4</b> - Verwendete sekundäre Antikörper mit ihren entsprechenden Verdünnungen für die immunzytochemischen Untersuchungen .....	18
<b>Tabelle 5</b> - Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren entsprechenden Verdünnungen für die immunzytochemischen Untersuchungen .....	19
<b>Tabelle 6</b> – Verwendete Plasmide für die Transfektion.....	19
<b>Tabelle 7</b> – Verwendete Labormaterialien .....	19
<b>Tabelle 8</b> – Verwendete Geräte .....	20
<b>Tabelle 9</b> – Verwendete Software .....	20

## 1. Einleitung

### 1.1 Entwicklung hippocampaler Neurone

Während der Embryogenese durchlaufen sich entwickelnde hippocampale Neurone verschiedene Stadien, welche sich *in vitro* in fünf Stadien einteilen lassen (Abbildung 1). Eine initial rundförmige Zelle mit beweglichen Lamellipodien (Stadium 1) bildet Neuriten aus (Stadium 2) und weist im Verlauf eine Polarisierung durch die Entwicklung eines Axons (Stadium 3) und eines Dendritenbaumes (Stadium 4) auf. Im letzten Stadium (5) erfolgt die Reifung der Axone und Dendriten (Dotti et al., 1988). Diese strukturelle Plastizität der Neurone wird neben Mikrotubuli vor allem durch das Aktinzytoskelett reguliert (Luo, 2002). Das dynamische Aktinzytoskelett ist für die strukturelle und morphologische Entwicklung von Neuronen von besonderer Bedeutung. Über extrazelluläre Signale wird die Aktindynamik, welche das Wachstum, die Navigation und Verzweigung der Neurone steuert, reguliert (Luo, 2002; Da Silva und Dotti, 2002).



**Abbildung 1: Entwicklungsstadien muriner hippocampaler Neurone in Kultur.** Im Stadium 1 bilden sich in der Peripherie der initial runden Zelle Lamellipodien aus. Im nächsten Stadium bilden sich kurze Neuritenfortsätze mit Wachstumskegeln an der Spitze. Einer der Neuriten wächst schneller als die anderen und formt sich zum Axon (Stadium 3). Aus den restlichen Neuriten entwickeln sich die Dendriten (Stadium 4). Die Reifung des Axons und Dendritenbaumes kennzeichnet das letzte Entwicklungsstadium. Die ungefähre Zeit (in Tagen) zum Erreichen des jeweiligen Stadiums ist unten angegeben (modifiziert nach Dotti et al., 1988).



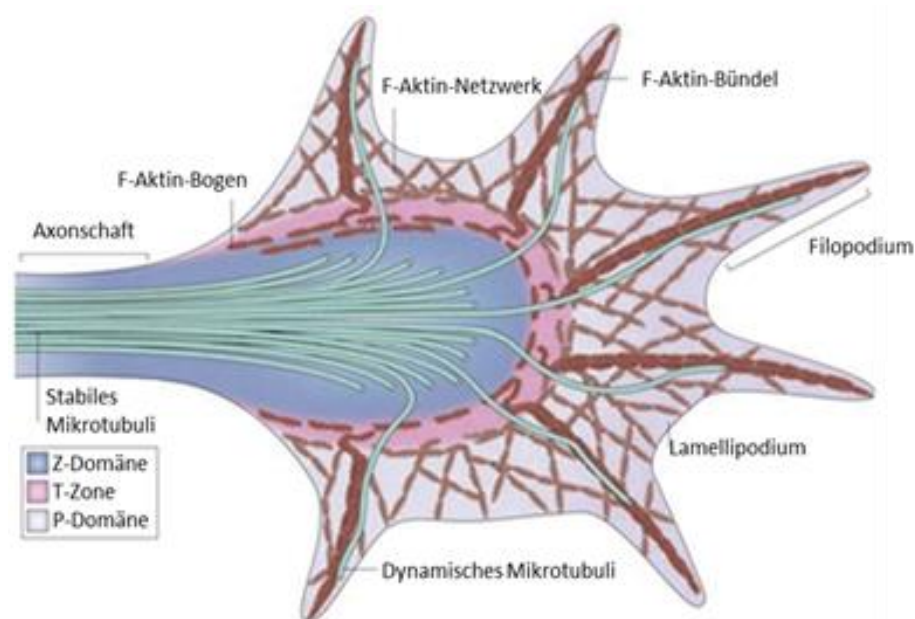
Ein zentraler Vorgang in der Entwicklung des Nervensystems ist das Wachstum und die Migration von Axonen, die durch sogenannte Wachstumskegel gewährleistet werden (Munoz-Lasso et al., 2020). Wachstumskegel, die an der Spitze von Axonen lokalisiert und reich an Aktin sind, werden vor allem in den Entwicklungsstadien 2 und 3 geformt (Dotti et al., 1988).

## **1.2 Wachstumskegel als Voraussetzung für Axonmigration**

Die Entwicklung des neuronalen Netzwerks wird durch Wanderung von Axonen zu ihrem jeweiligen Ziel erreicht. Diese Axonmigration wird durch sogenannte Wachstumskegel gesteuert. Wachstumskegel sind bewegliche, dilatierbare Enden des sich entwickelnden Axons, die einerseits die Fähigkeit der sensorischen Erfassung ihrer Umwelt besitzen und andererseits über verschiedene Signalkaskaden mit aktinabhängigen Bewegungen auf diese Umweltsignale reagieren können. So ist gewährleistet, dass Axone an ihr jeweiliges spezifisches Ziel navigiert werden, um dort physiologische synaptische Verknüpfungen und somit ein neuronales Netzwerk herzustellen (Ramón y Cajal, 1909; Tamariz und Varela-Echavarría, 2015; Tessier-Lavigne et al., 1996; Kamiguchi, 2003; Ye et al. 2019; Schneider et al., 2022).

Um ihre Funktion erfüllen zu können, weisen Wachstumskegel *in vitro* eine charakteristische Struktur mit drei Domänen auf: die transitionale (T-) Zone, die zentrale (Z-) und periphere (P-) Domäne (Abbildung 2). Charakteristisch für die Z- Domäne ist das Vorhandensein von Zellorganellen und stabilen Mikrotubuli (Omotade et al., 2017; Lowery und van Vactor, 2009), welche Bestandteile des Zytoskeletts sind (Munoz-Lasso et al., 2020). An die zentrale Domäne grenzend ist die T-Zone, die durch kontraktionsfähige Aktin-Myosinstrukturen gekennzeichnet ist. Die kurzen Aktinfilamente hier sind senkrecht zu den langen Aktinfilamenten der P-Domäne ausgerichtet und bilden einen F-Aktinbogen. Dieser reguliert das Wachstum der Mikrotubuli sowie die Axonelongation. Das Motorprotein Myosin II ist an der Bildung dieser Aktinbögen beteiligt und beeinflusst die Aktivität von Aktin und Mikrotubuli und somit auch die Motilität des Wachstumskegels (Omotade et al., 2017; Lowery und van Vactor, 2009; Blanquie und Bradke, 2018; Schneider et al., 2022). Die periphere

Domäne weist eine charakteristische Fächerstruktur auf, die sehr dynamisch ist und durch aktinreiche Membranausstülpungen, Lamellipodien und Filopodien, gebildet wird. Die „fingerförmigen“ Filopodien bestehen aus dünnen Bündeln von langen Aktinfilamenten (F-Aktin), während Lamellipodien, die zwischen den Filopodien lokalisiert sind, aus einem verzweigten Aktinnetzwerk aufgebaut sind. Mikrotubuli können entlang der reichlich vorhandenen Aktinbündel lokalisiert sein (Tanaka et. al, 1995). Über die periphere Domäne wird sowohl die Umgebung wahrgenommen als auch die Navigation der Wachstumskegel als Reaktion auf die Umgebungssignale vollzogen (Hylton et al., 2022).

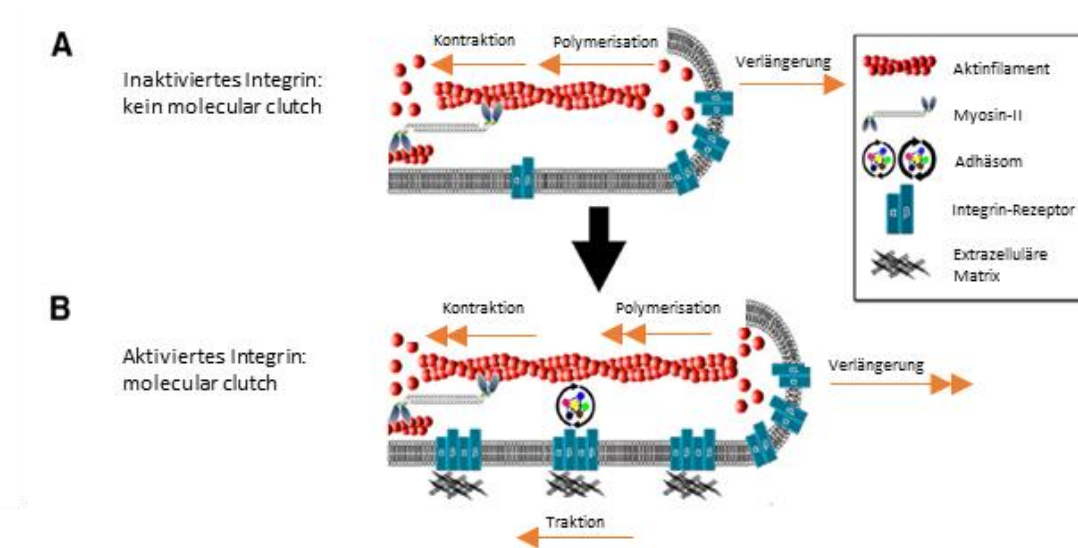


**Abbildung 2: Struktur von Wachstumskegeln.** Die periphere (P-) Domäne der Wachstumskegel ist durch aktinreiche Ausstülpungen (Filopodien und Lamellipodien) und dynamische Mikrotubuli gekennzeichnet. An die P-Domäne grenzend ist die transitionale (T-) Zone mit Aktin-Myosinstrukturen (F-Aktin-Bögen). Die zentrale (Z-) Domäne, die mit dem Axonschaft verbunden ist, weist eine Vielzahl von Zellorganellen und stabilen Mikrotubuli auf (modifiziert nach Lowery und van Vactor, 2009).

Da Wachstumskegel auf lokale Signale reagieren müssen, sind die Filopodien und Lamellipodien sehr dynamisch. Voraussetzung hierfür ist das Zusammenspiel zwischen Aktinpolymerisation an der Spitze der Filopodien in der P-Region, der Myosin II-angetriebene retrograde F-Aktinfluss und die Depolymerisation von Aktin in der T-Zone (Lin und Forscher, 1995; Omotade et al., 2017; Gomez und Letourneau, 2014; Schneider et al., 2022; Hylton et al., 2022). Überwiegt die Verlängerung der

Aktinfilamente (F-Aktin), so findet man längere Filopodien und der Wachstumskegel vergrößert sich. Bei Überwiegen der Depolymerisation retrahieren und verkürzen sich die Fortsätze und der Wachstumskegel kollabiert (Dent et al., 2011; Medeiros et al., 2006). Der durch Myosin II-angetriebene retrograde Aktinfluss unterstützt die Verkürzung der Strukturen durch Zug auf die Aktinfilamente Richtung T-Zone, wo diese dann depolymerisiert werden (Lin et al., 1996; Medeiros et al., 2006). Über diese genannten Mechanismen wird die Struktur des Wachstumskegels kontinuierlich dynamisch geformt (Omotade et al., 2017; Gomez und Letourneau, 2014).

Damit sich Wachstumskegel weiterhin als Reaktion auf einen Reiz fortbewegen können, sind Zugkräfte über Kontakte mit ihrer extrazellulären Umgebung nötig. Dieses Modell wird „molecular clutch“ genannt: Eine starke Vernetzung des Aktinzytoskeletts mit Adhäsionsrezeptoren wie Integrin, die durch Aktin-bindende Proteine ermöglicht werden, bewirkt eine Reduktion des retrograden Aktinflusses und durch entstehende Traktionskräfte die Verlängerung und vor allem Vorwärtsbewegung des Wachstumskegels (Mitchison und Kirschner, 1988; Suter und Forscher, 2000; Case und Waterman, 2015). Dabei ist die Geschwindigkeit der Bewegung proportional zur Anzahl der Kontaktverbindungen und Adhäsionsstärke von Aktin mit dem extrazellulären Substrat. Schwache Adhäsion führt zu einer geringen Zugkraft und einem Überwiegen des retrograden Aktinflusses, was eine reduzierte Fortbewegung bewirkt. Ein starker „molecular clutch“ hingegen fördert die Vorwärtsbewegung des Wachstumskegels und somit auch die Neuritenelongation (Omotade et al., 2017; Koch et al., 2012; Lin und Forscher, 1995) (Abbildung 3).



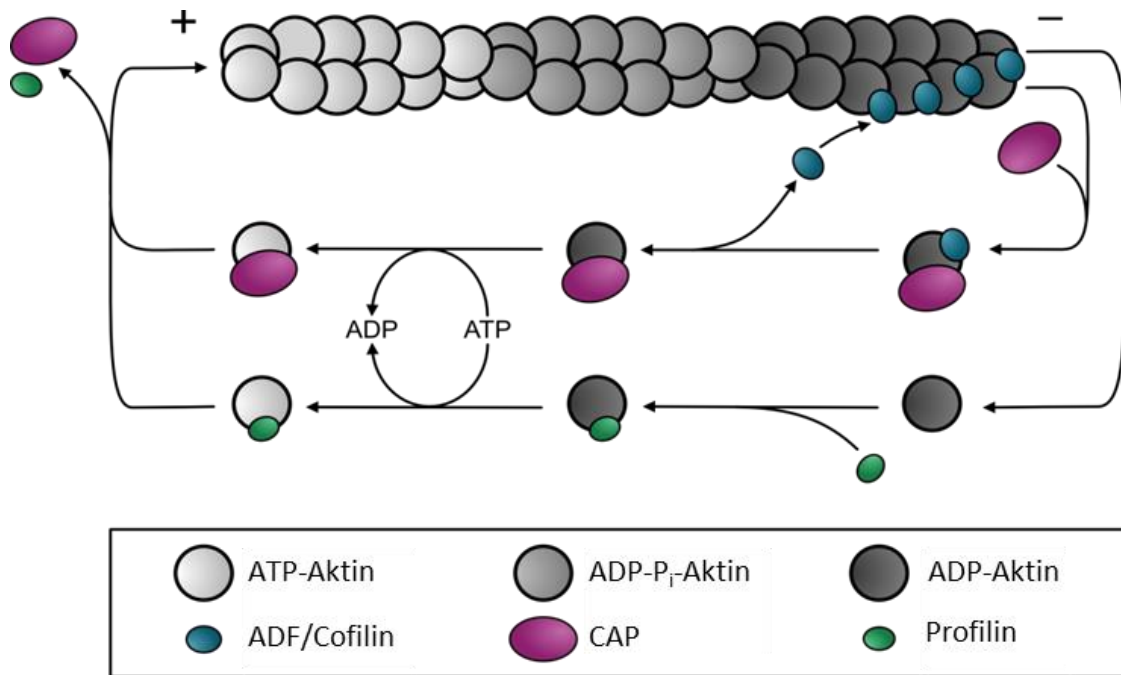
**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Fortbewegung von Wachstumskegeln in Abhängigkeit des Integrin-abhängigen „molecular clutch“.** (A) Der retrograde Aktinfluss entsteht aus der Polymerisation von F-Aktin an der Spitze der Wachstumskegel und der Kontraktion von F-Aktin durch Myosin II. Bei einer verstärkten Polymerisation von F-Aktin, der die Myosin II-getriebene, retrograde Kontraktion übersteigt, ist eine Verlängerung des Wachstumskegels möglich. (B) Bei Bindung von Integrin-Rezeptoren an Proteine der extrazellulären Matrix werden Adhäsom-ähnliche Proteine aktiviert, die Integrin mit F-Aktin verbinden. Man erhält einen starken molecular clutch, welcher den retrograden Fluss reduziert. Diese Traktionskraft resultiert in einer verstärkten Verlängerung und Vorwärtsbewegung des Wachstumskegels (modifiziert nach Nichol et al., 2016).

Die Mechanismen der dynamischen Fortsatzbildung, Adhäsion an die Extrazellulärmatrix und Traktionsbildung fördern die Axonelongation und Zellmigration der Neurone. Reguliert werden diese Vorgänge über sensorische Interaktionen der Rezeptoren an Wachstumskegeln mit Navigationssignalen aus der Umgebung (Gomez und Letourneau, 2014). Diese chemotaktischen Reize aus der Umgebung, die beispielsweise als chemische Gradienten oder Adhäsionsmoleküle an benachbarten Zelloberflächen oder im Extrazellulärraum vorliegen, fungieren als Wegweiser für die Wachstumskegel, damit diese an ihr jeweiliges spezifisches Ziel gelangen. Durch Bindung dieser Moleküle oder Botenstoffe an Wachstumskegel werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, die zum Umbau des Aktinzytoskeletts führen und die Navigation der Axone beeinflussen. Dabei unterscheidet man zwischen attraktiven und repulsiven Reizen. Attraktive Reize bewirken über intrazelluläre Signalwege eine verstärkte Aktinpolymerisation und Reduktion des retrograden Aktinflusses, sodass sich die Filopodien verlängern. Hieraus resultiert eine Bewegung des Wachstumskegels in Richtung des attraktiven Signals.

Repulsive Reize führen zu einer verstärkten Depolymerisation von Aktinfilamenten. Dies bewirkt eine Verkürzung und Abwendung der Wachstumskegel von der Quelle des Signals (Gomez und Letourneau, 2014; Lowery und van Vactor, 2009). In beiden Fällen wirken Botenstoffe über intrazelluläre Signalwege auf die Tätigkeit von Aktin-bindenden Proteinen (ABPen), die den Umbau des Aktinzytoskeletts und den retrograden F-Aktinfluss beeinflussen. Hierüber wird einerseits die Morphologie und andererseits die Navigation von Wachstumskegeln gesteuert. Dies ist wichtige Voraussetzung für die physiologische Axonmigration in der Entwicklung des Nervensystems (Quinn und Wadsworth, 2008; Omotade et al., 2017).

### **1.3 Das Aktinzytoskelett**

Für die Funktion von Wachstumskegeln spielen die Organisation und hohe Dynamik von F-Aktin, welches sich reichlich in der peripheren Domäne befindet, eine wichtige Rolle (Dent et al., 2011; Lowery und van Vactor, 2009; Gomez und Letourneau, 2014). Aktin gehört neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zum Zellzytoskelett (Munoz-Lasso et al., 2020) und findet sich in allen Eukaryonten als drei Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Über die Lokalisation der drei Isoformen in Neuronen werden widersprüchliche Aussagen gemacht. Es wird einerseits postuliert, dass vor allem die Isoformen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Aktin in Neuronen zu finden sind (Dominguez et al., 2011; Letourneau, 2009). Andererseits wird behauptet, dass vermehrt  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin in Neuronen exprimiert werden (Moradi et al., 2017). Das globuläre Aktinmonomer (G-Aktin) kann durch Polymerisation als F-Aktin, welches eine polare Struktur aufweist, vorliegen. Es besitzt ein Plus-Ende, an dem vorwiegend die Polymerisation von ATP-gebundenem G-Aktin stattfindet, und ein Minus-Ende, an dem vorwiegend die Depolymerisation von ADP-gebundenem G-Aktin erfolgt. Dieser dynamische Prozess wird Aktin-Tretmühlenmechanismus genannt (Ono, 2013; Dominguez und Holmes, 2011; Revenu et al., 2004) und wird hauptsächlich durch die ABPe Cyclase-abhängige Proteine (CAP) (Kotila et al., 2018; Kotila et al., 2019; Ono, 2013), Aktin-depolymerisierende Faktoren (ADF)/Cofilin (Andrianantoandro und Pollard, 2006; Kotila et al., 2019) und Profilin (Ono, 2013; Baum et al., 2006) reguliert (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Die Regulation des Aktintretmühlenmechanismus durch die aktinbindenden Proteine CAP, ADF/Cofilin und Profilin.** ADF/Cofilin fördern die Durchtrennung und Depolymerisation von F-Aktin am Minus-Ende. Profilin beschleunigt den Nukleotidaustausch von ADP- zu ATP-G-Aktin. CAP fördert die Depolymerisation von ADF/Cofilin gebundenen Aktinfilamenten am Minus-Ende und steigert unabhängig von Profilin den Nukleotidaustausch von ADP- zu ATP-G-Aktin (zur Verfügung gestellt von Isabell Metz, modifiziert).

ABPE vermitteln in Wachstumskegeln zwischen extrazellulären Navigationssignalen und dem Umbau von Aktinfilamenten (Munoz-Lasso et al., 2020; Gomez und Letourneau, 2014).

Es wird vermutet, dass Störungen in der Regulation der Aktindynamik, welche die Axonmigration in der Entwicklung des Nervensystems negativ beeinflussen, mit einer Reihe von neurologischen Erkrankungen wie mentale Retardierung, Epilepsie, Autismus-Spektrum-Störungen oder dem Kallmann-Syndrom assoziiert sind (Niftullayev und Lamarche-Vane, 2019; van Battum et al., 2015; Engle, 2010; Ramakers, 2002; Gomez und Letourneau, 2014).

#### 1.4 Cyclase-assoziierte Proteine (CAPs)

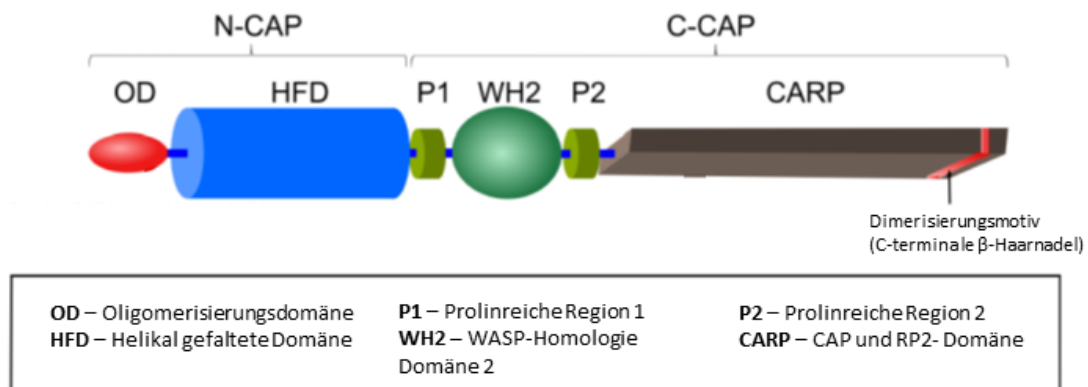
Das Cyclase-assoziierte Protein (CAP) wurde zuerst in der Knosphefe *Saccharomyces cerevisiae* als CAP/Srv2 beschrieben (Fedor-Chaiken et al., 1990; Rust et al., 2020). Es

hat ein molekulares Gewicht von 55 kDa und besitzt 450 bis 550 Aminosäuren (Ono, 2013). In Hefen ist CAP namensgebend an der Regulation von Adenylylcyclase-Komplexen als auch an der Regulation von Aktin beteiligt (Field et al., 1990; Freeman et al., 1995). Erst spätere Studien beschreiben die aktinregulierende Funktion von CAP in Eukaryonten. Es ist sowohl in der Polymerisation als auch in der Depolymerisation von Aktinfilamenten beteiligt und trägt somit wesentlich zur Aktindynamik bei (Bertling et al., 2004; Freeman et al., 1995; Ono, 2013; Rust et al., 2020).

CAP kann in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt werden (Abbildung 5). Der N-Terminus von CAP kann eine Coiled-Coil-Struktur ausbilden, die eine wichtige Rolle in der Selbstoligomerisierung des Proteins spielt und hiermit die enzymatische Funktion von CAP verstärkt (Ono, 2013; Quintero-Monzon et al., 2009; Rust et al., 2020). In Hefen wird über diese Coiled-coil-Struktur der Adenylylcyclase-Komplex aktiviert (Freeman et al., 1995; Ono, 2013). Die helikal gefaltete Domäne (helical folded domain, HFD) bildet den größten Teil der N-terminalen Region und bindet präferentiell das Minus-Ende von F-Aktin. Zusätzlich interagiert die HFD mit Cofilin/G-Aktin-Komplexen und bewirkt eine beschleunigte Depolymerisation sowie Durchtrennung von Aktinfilamenten (Quintero-Monzon et al., 2009; Kakurina et al., 2018; Kotila et al., 2019; Rust et al., 2020). Zwischen den N- und C-terminalen Regionen befinden sich zentral zwei prolinreiche Regionen (P1 und P2), die mit verschiedenen Bindungspartnern, beispielsweise weiteren ABPn wie Profilin interagieren können (Bertling et al., 2007; Makkonen et al., 2013; Ono, 2013; Kakurina et al., 2018; Rust et al., 2020). Die prolinreichen Regionen flankieren die Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)-Homologie 2 (WH2)- Domäne, die monomeres Aktin bindet und den Nukleotidaustausch von ADP-G-Aktin zu ATP-G-Aktin, dem kompetenteren Monomer für die Aktinpolymerisation, unterstützt (Chaudhry et al., 2010; Kotila et al., 2018; Rust et al., 2020). Weiterhin ist die WH2-Domäne an der Dissoziation von ADF/Cofilin vom ADF/Cofilin-Aktin-Komplex beteiligt (Kotila et al., 2018; Rust et al., 2020). Der C-Terminus von CAP beinhaltet ein Dimerisierungsmotiv und die CAP (CAPs und X-gebundenes Retinitis pigmentosa 2 Protein (RP 2))- Domäne, welche größtenteils aus

rechtsdrehenden  $\beta$ -Helices ( $\beta$ -Blatt) besteht (Dodatko et al., 2004) und den Nukleotidaustausch von G-Aktin fördert (Chaundhry, 2010; Makkonen et al., 2013).

Die Regulation von CAP erfolgt über Phosphorylierung des Proteins. Hierbei ist die Glykogen-Synthase-Kinase 3 beteiligt (Zhou et al., 2014b; Wu et al., 2019).



**Abbildung 5: Struktur von CAP.** Die N-terminale Region von CAP weist eine Oligomerisierungsdomäne und die HFD (helikal gefaltete Domäne) auf. Die C-terminale Region besteht aus der WASP-Homologie 2-Domäne, die von Prolin-reichen Domänen flankiert wird, und weiterhin aus der CARP-Domäne mit dem Dimerisierungsmotiv (modifiziert nach Rust et al., 2020).

In Wirbeltieren existieren zwei Isoformen von CAP: CAP1 und CAP2, die eine Übereinstimmung von über 60% in ihrer Aminosäuresequenz und ein nur teilweise überlappendes Expressionsmuster aufweisen (Swiston et al., 1995; Yu et al., 1994; Rust und Marcello, 2022). CAP1 ist mit Ausnahme vom Skelettmuskel in allen Geweben und Zellen vorhanden, während CAP2 spezifisch vor allem im Herz, Gehirn, Skelettmuskel und in den Testes exprimiert wird (Bertling et al., 2004; Swiston et al., 1995; Rust et al., 2020). Die unterschiedliche Organverteilung der beiden Isoformen lässt auf unterschiedliche Funktionen von CAP1 und CAP2 schließen (Peche et al., 2007; Ono, 2013; Rust und Marcello, 2022).

CAP1 ist durch die Regulation Aktin-abhängiger Prozesse an der Morphogenese, polarisierten Zellmigration und rezeptorvermittelten Endozytose in nicht-muskulären Zellen von Säugetieren beteiligt (Bertling et al., 2004). *In vitro* Studien zu CAP1 haben gezeigt, dass eine reduzierte Expression von CAP1 zu einer herabgesetzten Aktindynamik führt, die in der B16F1-Zelllinie (Maus-Melanom-Zelllinie) zu einem Verlust der Polarität von Lamellipodien und in HeLa-Zellen zu vergrößerten



Lamellipodien führt. Dies stört die Zellmigration erheblich (Bertling et al., 2004; Zhou et al., 2014a).

Da Krebszellen eine Störung der Zellmigration und Zytokinese aufweisen, wird eine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von CAP und verschiedenen Krebsarten postuliert (Ono, 2013). So ist beispielsweise eine Überexpression von CAP1 im Pankreas- und Mammakarzinom festgestellt worden (Yamazaki et al., 2009; Patsialou et al., 2012; Rust et al., 2020), während CAP2 beispielsweise bei hepatozellulären Karzinomen überexprimiert ist (Effendi et al., 2013; Shibata et al., 2006, Rust et al., 2020).

Die physiologische Funktion von CAP2 ist in den letzten Jahren zunehmend untersucht wurden. So zeigen Studien an Mäusen mit systemischem oder herzspezifischem Knockout (KO) von CAP2 Beeinträchtigungen in der Herzphysiologie mit Entwicklung von Kardiomyopathien oder Herzrhythmusstörungen (Peche et al., 2012; Ono, 2013; Field et al., 2015). Weiterhin wurden Störungen in der Entwicklung des Skelettmuskelsystems nachgewiesen (Kepser et al., 2019; Rust und Marcello, 2022).

In Bezug auf das Nervensystem ist CAP2 relevant für die physiologische Funktion dendritischer Dornen und das Phänomen der synaptischen Plastizität. Eine Störung von CAP2 im differenzierten Nervensystem kann durch Beeinträchtigung des Aktintretmühlenmechanismus zu Veränderungen der dendritischen Struktur und synaptischen Plastizität führen. Es konnte beispielsweise eine Korrelation zwischen der Alzheimererkrankung und dem CAP2-Expressionslevel im Hippocampus nachgewiesen werden (Kumar et al., 2016; Pelucchi et al., 2020b; Rust et al., 2020; Rust und Marcello, 2022). Während CAP2 demnach einen wichtigen Beitrag zur Hirnfunktion im differenzierten Nervensystem leistet, zeigt die Dysregulation von CAP2 keine pathologischen Veränderungen in der frühen Entwicklung des sich differenzierenden Nervensystems. Es wurden keine Veränderungen in der Morphologie oder Bewegungsfähigkeit der Wachstumskegeln nachgewiesen (Schneider et al., 2021c). Hier scheint CAP1 die relevantere Isoform zu sein. Der gehirnspezifische KO von CAP1 führte nämlich zu Veränderungen in der Anatomie des sich entwickelnden Gehirns (Schneider et al., 2021a). Trotz der Unterschiede in den Funktionen dieser beiden Isoformen konnte

jedoch kürzlich nachgewiesen werden, dass CAP1 und CAP2 wahrscheinlich überlappende Funktionen in der Neurodifferenzierung aufweisen. CAP2 ist in der Lage den Phänotyp von Wachstumskegeln im gehirnspezifisch konditionellen CAP1-KO-Mausmodell (flx/flx, Nestin-Cre) zumindest teilweise wiederherzustellen (Schneider et al., 2021c).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass CAP1 auch wichtig für die postnatale Hirnfunktion ist. CAP1 ist ein essenzielles Protein der postsynaptischen Aktinregulation und wird eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Morphologie und Dichte dendritischer Dornen zugesprochen (Heinze et al., 2022).

Über die physiologische Funktion von CAP1 *in vivo* ist sonst bisher wenig bekannt. CAP1 scheint eine wichtige Rolle im Metabolismus von Lipoproteinen zu spielen. In heterozygoten CAP1-KO-Mäusen konnte eine Absenkung des LDL-Cholesterols festgestellt werden. Diese Erkenntnis könnte in der weiteren Therapiefindung arteriosklerotischer Erkrankungen hilfreich sein (Jang et al., 2019; Burke et al., 2017; Rust et al., 2020). Ansonsten ist in Vertebraten wenig über die weitere Funktion von CAP1 im physiologischen Kontext bekannt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ein systemischer KO von CAP1 embryonal letal ist (Jang et al., 2019) und es lange Zeit keine passenden Mausmodelle gab.

Durch die Generierung eines gehirnspezifischen konditionellen CAP1-KO-Mausmodells (flx/flx, Nestin-Cre) konnte kürzlich erst gezeigt werden, dass CAP1 wichtig für die neuronale Differenzierung ist (Schneider et al., 2021a). Ein Verlust von CAP1 führt zu Störungen im Wachstumskegel. Dies wurde durch Beeinträchtigungen in der Aktindynamik und Neuronendifferenzierung und weiterhin durch Vergrößerung der Wachstumskegel belegt. Ebenso war die Reaktion der Wachstumskegel auf chemotaktische Reize gestört. Jedoch zeigten sich keine wesentlichen Störungen in der Neuronenmigration. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die HFD essenziell für die Funktion von CAP1 ist. Überexpressionsversuche mit verschiedenen CAP1-Mutanten (mutierte HFD, mutierte PP1-Region, mutierte WH2-Domäne oder mutierte  $\beta$ -Blatt-Region innerhalb der CARP-Domäne) an diesem KO-Mausmodell zeigten, dass einzig die

HFD-mutierte CAP1-Mutante die ursprüngliche Fläche der Wachstumskegel nicht wiederherstellen konnte (Schneider et al., 2021a). Dies deutet darauf hin, dass die HFD als Interaktionsvermittler zwischen CAP1 und Cofilin1 (Kotila et al., 2019) für die Aufrechterhaltung des Phänotyps von Wachstumskegeln wichtig ist.

### **1.5 Aktin-depolymerisierende Faktoren (ADF)/Cofilin**

In Säugetieren gehören zu der Aktin-depolymerisierende Faktoren (ADF)/Cofilin-Familie die Isoformen Cofilin1 (nicht-muskuläres Cofilin, n-Cofilin), Cofilin2 (muskuläres Cofilin, m-Cofilin) und ADF (auch Destrin genannt) (Bellenchi et al., 2007; Rust und Michaelsen-Preusse, 2016). Während Cofilin2 die muskuläre Isoform ist, sind die Isoformen ADF und Cofilin1 sowohl in der embryonalen Hirnentwicklung als auch im adulten Gehirn zu finden, wobei die Expression von ADF geringer als die von Cofilin ist (Bellenchi et al., 2007).

ADF/Cofilin sind in allen Eukaryonten zu finden und wichtig für die Aufrechterhaltung des dynamischen Aktinumsatzes (Lappalainen und Drubin, 1997). Dabei steht bei Cofilin1 die Durchtrennung von Aktinfilamenten und bei ADF namensgebend die Depolymerisation von G-Aktin im Vordergrund (Bernstein und Bamburg, 2010; Kotila et al., 2019).

ADF/Cofilin beschleunigt den Aktin-Tretmühlenmechanismus, indem es bevorzugt ADP-Aktin am Minus-Ende von Aktinfilamenten bindet und die Depolymerisation positiv beeinflusst (Carlier et al., 1997; Bamburg, 1999). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aktivität von ADF/Cofilin noch von weiteren Faktoren abhängig ist. So bestimmt unter anderem die Konzentration von ADF/Cofilin sowie dessen Verhältnis zur Konzentration von Aktin die Aktivität: Bei geringen Konzentrationen fördert ADF/Cofilin die Depolymerisation und Auftrennung von F-Aktin (Blanchoin und Pollard, 1999; Rust, 2015). Hohe Konzentrationen von ADF/Cofilin bewirken hingegen durch Nukleation von G-Aktin und Stabilisierung von F-Aktin eine verstärkte Polymerisation von Aktinfilamenten (Andrianantoandro und Pollard, 2006).

Reguliert wird die Aktivität von ADF/Cofilin weiterhin über die LIM Kinase (LIMK) und die testikuläre Protein (TES)-Kinasen, die über Phosphorylierung am konservierten Serinrest an Position 3 die Bindung von ADF/Cofilin an Aktin inaktivieren können (Abe et al., 1996; Bernstein und Bamburg, 2010).

Cofilin1 wird eine wichtige Rolle in der Neurogenese zugesprochen (Flynn et al., 2012; Bellenchi et al., 2007). Der systemische Knockout von Cofilin1 führte in Mäusen zur embryonalen Sterblichkeit (Gurniak et al., 2005). Der gehirnspezifische konditionelle Knockout von Cofilin1 beeinträchtigte die neuronale Zellproliferation und Migration sich entwickelnder Neurone. Die Inaktivierung von ADF hingegen schränkte die Hirnentwicklung und -morphologie nicht ein (Bellenchi et al., 2007). In Wachstumskegeln ist ADF/Cofilin mit F-Aktin ko-lokalisiert und an der Regulation der Aktindynamik beteiligt. Cofilin ist hier vor allem an der Basis der Filopodien lokalisiert (Bamburg und Bray, 1987; Hylton et al., 2022). Durch die Förderung des ständigen Aktinumbaus ist ADF/Cofilin1 einerseits an der Ausbildung und Verformung von Wachstumskegeln beteiligt, andererseits fördert es die Neuritogenese. ADF/Cofilin wird daher als essenzielles Protein in der Bewegung und Funktion von Wachstumskegeln und somit in der Axonavigation beschrieben (Gungabisson und Bamburg, 2003; Flynn et al., 2012; Omotade et al., 2017; Ye et al., 2019). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ADF/Cofilin1 für den Erhalt des retrograden Aktinflusses und Organisation des Zytoskeletts benötigt wird, wobei auch hier Cofilin1 die wichtigere Funktion zugeschrieben wird (Flynn et al., 2012). Cofilin reguliert die Dynamik in Wachstumskegeln über eine duale Funktion. Es kann abhängig von verschiedenen Faktoren zu einem Kollabieren oder einer Vergrößerung von Wachstumskegeln führen (Vitriol und Zheng, 2012; Wang et al., 2016). Weiterhin wurde gezeigt, dass Cofilin an mehreren Signalwegen beteiligt ist, um die Aktindynamik in Wachstumskegeln zu organisieren. So ist Cofilin beispielsweise in Calcium- und Rho GTPase-Signalwegen involviert (Omotade et al, 2017; Bernstein und Bamburg, 2010; Gasperini et al., 2017).

Neuere Studien haben weiterhin gezeigt, dass ADF/Cofilin über die Regulation der Aktindynamik die Axonregeneration nach Verletzungen des differenzierten Nervensystems unterstützen kann (Tedeschi et al., 2019)

## **1.6 Zielsetzung**

Die korrekte Navigation von Wachstumskegeln an ihr jeweiliges spezifisches Ziel zur Bildung neuronaler Schaltkreise ist wichtige Voraussetzung für die Entwicklung des Nervensystems. Die hierfür benötigte Bewegungsfähigkeit und dynamische Morphologie der Wachstumskegel wird vor allem durch das Aktinzytoskelett ermöglicht (Omotade et al., 2017; Blanquie und Bradke, 2018). Die strenge Organisation und Funktion des Aktinzytoskeletts werden durch ABPe gewährleistet, welche als Vermittler zwischen extrazellulären Navigationssignalen und dem Umbau von Aktinfilamenten fungieren (Munoz-Lasso et al., 2020; Gomez und Letourneau, 2014; Revenu et al., 2004).

Viele Studien haben bereits gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Aktinregulation und neurologischen Erkrankungen gibt (Engle, 2010; Ramakers, 2002; Gomez und Letourneau, 2014). Jedoch ist das Verständnis über ABPe und die Regulation des Aktinzytoskeletts in Wachstumskegeln bislang noch nicht vollständig geklärt (Dent et al., 2011; Omotade et al., 2017, Gomez und Letourneau, 2014).

Während Cofilin1 in Wachstumskegeln bereits umfangreich erforscht ist und eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Aktindynamik zugesprochen wird (Omotade et al., 2017; Flynn et al., 2012; Dent et al., 2011), wurden über CAP1 erst in den letzten Jahren nähere Erkenntnisse über seine molekulare Funktion gewonnen (Kotila et al., 2019; Kotila et al., 2018). Erst die Generierung eines gehirnspezifisch konditionellen CAP1-KO-Mausmodells konnte zeigen, dass CAP1 wichtig für die Aktindynamik in Wachstumskegeln ist und die Neuronendifferenzierung beeinflusst. Essenziell für die Funktion von CAP1 scheint dabei seine HFD zu sein (Schneider et al., 2021a). Bisherige Studien haben gezeigt, dass die HFD von CAP1 mit Cofilin-Aktin-Komplexen interagiert (Kotila et al., 2019). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wird in

dieser Arbeit die Hypothese gestellt, dass die Interaktion zwischen CAP1 und Cofilin1 über die HFD für die Regulation der Aktindynamik und Aufrechterhaltung des Phänotyps von Wachstumskegeln nötig ist.

Mit dieser Arbeit wird die Rolle von CAP1 und Cofilin1 als Aktin-regulierende Proteine in Wachstumskegeln näher untersucht. Ferner soll die Bedeutung der Interaktion zwischen CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln belegt und analysiert werden.

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, werden Wachstumskegel von primären hippocampalen Neuronenkulturen, die entweder einen Einzel-Knockout von CAP1 ( $CAP1^{flx/flx}$ ), einen Einzel-KO von Cofilin1 ( $Cfl1^{flx/flx}$ ) oder einen Doppel-KO (dKO) von CAP1 und Cofilin1 ( $CAP1^{flx/flx}/Cfl1^{flx/flx}$ ) aufweisen, untersucht. Die Geninaktivierung in isolierten Neuronen soll durch Transfektion mit einer m-Cherry-gekoppelten Cre-Rekombinase (mC-Cre) erfolgen (Kullmann et al., 2020).

Mittels konfokaler Lasermikroskopie und Life Cell Imaging sollen Aussagen über die Morphologie und Aktindynamik der Wachstumskegel gemacht werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalie bzw. Reagenz</b>	<b>Firma</b>
Aqua-Poly/Mount	Polysciences
B27 Supplement	Gibco
Borsäure	Carl Roth GmbH
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck
Doppelt-destilliertes Wasser (ddH <sub>2</sub> O)	Milli-Q-Water system, Millipore
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Gibco
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) + GlutaMAX™	Gibco
Fetales bovines Serum (FBS)	Gibco
Gelatine	Carl Roth GmbH
GlutaMAX™ Supplement	Gibco
HBS (HEPES-buffered saline)	Gibco
10x HEPES 1M pH: 7,0-7,6	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH
Leibovitz's L-15 Medium (L-15)	Gibco
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH
Neurobasales™ Medium (NB)	Gibco
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH
Penicillin-Streptomycin	Gibco

Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma
Triton X-100	Carl Roth GmbH
TrypLE™ Express	Gibco

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen und ihre Zusammensetzungen

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
2x GDB Puffer	0,36 % (w/v) Gelatine 0,55 % (v/v) Triton X-100 450 mM NaCl 30,3 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) In ddH <sub>2</sub> O
1x GDB Puffer	50 % (v/v) 2x GDB Puffer in ddH <sub>2</sub> O
1x HBS	1ml 10x HBS 200µl CaCl <sub>2</sub> *H <sub>2</sub> O (0,1M) 200µl NaHCO <sub>3</sub> (0,1M) In 8,6ml ddH <sub>2</sub> O
Leibovitz's L-15 Medium (L-15)+ HEPES	Leibovitz's L-15 Medium 7 mM HEPES
Neurobasales Medium plus (NB+)	Neurobasales Medium 2% (v/v) B27 Supplement 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM GlutaMAX
Nukleofektions-Medium	10% FBS DMEM (1x) + GlutaMAX™-I
1x PBS	10 % (v/v) 10x PBS in ddH <sub>2</sub> O
4 % PFA (pH 7)	4 % (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS



Poly-L-Lysin-Hydrobromid (PLL)	0,01% bzw. 0,005% (w/v) Poly-L-Lysin In 0,1M Borsäure (pH 8,5)
10x Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	1,37 M NaCl 27 mM KCl 43 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> In ddH <sub>2</sub> O

### 2.1.3 Primäre Antikörper

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper mit ihren entsprechenden Verdünnungen für die immunzytochemischen Untersuchungen

Antikörper (Spezies)	Verdünnung	Hersteller
Anti-CAP1 (Maus)	1:100	Abnova
Anti-Dcx (Kaninchen)	1:500	Abcam
Anti-GFP (Kaninchen)	1:1000	Thermo Fisher Scientific
Anti-mCherry (Huhn)	1:500	Abcam

### 2.1.4 Sekundäre Antikörper

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper mit ihren entsprechenden Verdünnungen für die immunzytochemischen Untersuchungen

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific
Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 647	1:500	Thermo Fisher Scientific
Anti-Huhn-Alexa Fluor 555	1:500	Thermo Fisher Scientific
Anti-Maus-Alexa Fluor 546	1:500	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.5 Fluoreszenzfarbstoffe für Immunzytochemie

Tabelle 5: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren entsprechenden Verdünnungen für die immunzytochemischen Untersuchungen

Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung	Hersteller
Hoechst 33342	1:1000	Thermo Fisher Scientific
Phalloidin Alexa Fluor 647	1:100	Cell Signaling Technology
Phalloidin Alexa Fluor 488	1:100	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.6 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide für die Transfektion

Plasmid	Quelle
GFP	GenScript
GFP-Actin	Labor von Robert Grosse
GFP-CAP1	GenScript
GFP-CAP1-HFD	GenScript
GFP-CAP1- $\beta$ -sheet	GenScript
GFP-CAP1- $\Delta$ 1-213	GenScript
GFP-CAP1- $\Delta$ 318-474	GenScript
GFP-CAP2	GenScript
GFP-Cofilin1	Rehklau et al., 2017
mCherry-Cre	Kullmann et al., 2020
mCherry-Cre-mut	Kullmann et al., 2020

### 2.1.7 Labormaterialien

Tabelle 7: Verwendete Labormaterialien

Labormaterial	Firma
Deckglas 18mm, rund	VWR
Reaktionsgefäße 1,5 ml / 2 ml	Kobe/Greiner
Falcon Tube 15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One GmbH

Feuchtkammer zum Färben	<i>Eigenbau</i>
Glasbodenzellkulturschale 22 mm	WillCo-dish
Immersionsöl Typ F Leica Microsystems	CMS GmbH
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Petrirschale 60x15 mm	Greiner Bio-One GmbH
Standard Objektträger	Carl Roth GmbH
TC-Platte 12 Well	Sarstedt

### 2.1.8 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
4D-Nucleofector <sup>TM</sup>	Lonza
Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems CMS GmbH
Mikroliterzentrifuge Z 160 M	Hermle
Vortexgenie 2	Scientific Industrie
Zeiss Axiovert 200M	Zeiss
Zeiss Stemi 2000/2000C	Zeiss
Zeiss TELAVAL 31	Zeiss

### 2.1.9 Software

Tabelle 9: Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Quelle</b>
Fiji	Schindelin et al., 2012
GnuPlot	<a href="http://www.gnuplot.info/">http://www.gnuplot.info/</a>
LAS-AF	Leica Microsystems CMS GmbH
Microsoft Excel	Microsoft Corporation

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mausmodelle

Während dieser Studie wurden drei verschiedene Mauslinien verwendet:  $CAP1^{flx/flx}$ ,  $Cfl1^{flx/flx}$  und  $CAP1^{flx/flx}/Cfl1^{flx/flx}$  Mäuse (flx= flankiert durch LoxP). Bei der  $CAP1^{flx/flx}$ -Mauslinie wurde das Exon 3 des CAP1-Gens mit loxP-Stellen flankiert (Schneider et al., 2021a). Bei der  $Cfl1^{flx/flx}$ -Mauslinie wurde das Exon 2 des Cofilin1-Gens (Cfl1) mit loxP-Stellen flankiert (Bellenchi et al., 2007). Die  $CAP1^{flx/flx}/Cfl1^{flx/flx}$ -Mauslinie wurde durch Kreuzen der beiden vorher genannten Linien generiert.

Die für die folgenden Experimente verwendeten Mäuse entstammten der Zucht der Tieranlage der Philipps-Universität Marburg. Nahrung und Wasser wurden *ad libitum* bereitgestellt und die Mäuse in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Kreislauf gehalten. Die Zucht und Tötung der Mäuse wurden gemäß den Tierschutzbestimmungen durchgeführt.

Die Experimente wurden an primären Neuronenkulturen des Hippocampus durchgeführt.

### 2.2.2 Beschichtung der Wellplatten

Einen Tag vor der Präparation wurden 18 mm Deckgläschen in 12-Well-Platten gegeben. Damit die Neurone auf diesen wachsen und sich anheften können, wurden die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid beschichtet. Hierfür wurde 0,01 % (w/v) Poly-L-Lysin (PLL) in 0,1 M Borsäure (pH 8,5) verdünnt, in jede Vertiefung der Platten gegeben und die Platten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Für die Platten zum anschließenden erneuten Ausplattieren der Neurone wurden keine Deckgläschen in die Vertiefungen gegeben und PLL 0,005 % (w/v) in 0,1 M Borsäure verdünnt.

Für FRAP-Experimente wurden ein Tag vor dem erneuten Ausplattieren der Neurone Glasbodenzellkulturschalen mit 0,01 % PLL beschichtet und ebenfalls über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.3 Präparation der Hippocampi

Am Tag der Präparation wurden die vorbereiteten Vertiefungen der Platten zweimal mit doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gewaschen, anschließend mit neurobasalem Medium (NB) bzw. für die Nukleofektion mit Nukleofektions-Medium äquilibriert. Die Platten wurden bis zur Verwendung im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) aufbewahrt.

Die Neurone wurden von Gehirnen von Embryonen im Alter von 17,5 bzw. 18,5 Tagen extrahiert. Dafür wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung des Abdomens mit einer Schere wurde die Gebärmutter mit den Embryonen herausgenommen und sofort in eiskaltes L-15 + HEPES überführt, um sie zu töten. Danach wurden die Embryonen aus der Gebärmutter herauspräpariert und der Kopf getrennt.

Zur Präparation der Hippocampi wurde der Kopf eines Embryos in eine Petrischale, welche mit eiskaltem L-15 + HEPES-Medium gefüllt war, übertragen und auf einem eiskalten Eisenblock unter einem Stereomikroskop (Zeiss Stemi 2000/2000C) platziert. Haut und Schädeldecke des Kopfes wurden entfernt und das Gehirn in eine neue mit eiskaltem L-15 + HEPES-Medium gefüllten Petrischale überführt. Die Hemisphären wurden ausgehend von der Mittellinie getrennt. Nach Entfernung der Meningen wurden die Hippocampi mit einer Pinzette herauspräpariert und anschließend in einen mit L-15 + HEPES-Medium gefüllten Falcon-Tube überführt.

### 2.2.4 Dissoziation des hippocampalen Gewebes

Um das hippocampale Gewebe zu dissoziieren und einzelne Neurone zu generieren wurde das L-15 + HEPES-Medium abgenommen und pro Gehirn bzw. pro zwei Hippocampi 500 µl TrypLE-Express hinzugegeben. Das Falcon-Tube wurde nach Invertieren für sechs Minuten im Wasserbad (37 °C) inkubiert, wobei nach jeweils 60 s das Falcon-Tube leicht geschwenkt wurde. Hiernach wurde das TrypLE-Express entfernt und pro Gehirn 500 µl Neurobasales-Medium plus (NB<sup>+</sup>-Medium) hinzugegeben. Nach einmaligem Invertieren wurde das Medium abgenommen und das Gewebe nochmals mit NB<sup>+</sup>-Medium gewaschen. Nach erneutem Waschen der Hippocampi wurde wieder NB<sup>+</sup>-Medium auf das Gewebe gegeben und anschließend durch Auf- und Abpipettieren

mit einer P1000 Pipette dissoziiert. NB<sup>+</sup>-Medium wurde hinzugegeben, sodass jedes Gehirn in 1 ml Medium verdünnt wurde. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zelldichte der präparierten Neurone bestimmt.

#### 2.2.5 Nukleofektion

Die hippocampalen Neurone wurden nach Dissoziation des Gewebes an Tag 0 *in vitro* (TIV) transfiziert. 250000 Neurone wurde in einer Tischzentrifuge für fünf Minuten bei 7000 Umdrehungen pro Minute (rpm) abzentrifugiert. Pro Nukleofektion wurden 82 µl P3-Lösung und 18 µl S1-Supplement aus dem Amaxa™ P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit mit 3 µg Plasmide in einem Eppendorf-Tube gemischt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und mit dem vorbereiteten DNA-Ansatz das Pellet dissoziiert und in die Elektroporationsküvette gegeben. Die Nukleofektion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen auf eine 12-Well-Platte ausplattiert.

Vier bis fünf Stunden nach der Nukleofektion wurde das Medium der Zellen einmal komplett mit NB<sup>+</sup>-Medium ausgetauscht.

#### 2.2.6 Erneutes Ausplattieren der Neurone

Zwei Tage nach der Nukleofektion wurden die Neurone neu ausplattiert. Als Konditionsmedium wurden pro Well 700 µl Medium und zusätzlich 400 µl frisches NB<sup>+</sup>-Medium in einem Falcon-Tube gesammelt. Das restliche Medium wurde verworfen. In jedes Well wurde anschließend 1 ml TrypLE-Express hinzugegeben und für 15 Minuten inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Nach Lösen der Zellen mit TrypLE-Express, wurde die Enzymreaktion mit 500 µl NB<sup>+</sup>-Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und für fünf Minuten bei 7000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit jeweils 1 ml des vorbereiteten Konditionsmediums dissoziiert. Anschließend wurden die Zellen auf Deckgläschen oder für FRAP-Experimente in Glasbodenzellkulturschalen ausplattiert (Schneider et al., 2021b).

### 2.2.7 Immunzytochemie

Für die Färbung der Zellen wurden die Deckgläser in eine Feuchtkammer überführt und mit 1x GDB-Lösung für fünf Minuten geblockt. Danach wurden die Zellen mit Primärantikörper, welcher mit 1x GDB-Lösung verdünnt wurde, für 90 Minuten inkubiert. Auf das dreimalige schnelle Waschen und zweimalige Waschen für jeweils fünf Minuten mit 1x PBS, erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher ebenfalls in 1x GDB-Lösung verdünnt wurde. Danach wurden die Zellen dreimal schnell mit 1x PBS und einmal mit 1:1000 in PBS verdünntem Hoechst für fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS nochmals für fünf Minuten gewaschen. Die Deckgläser wurden hiernach mit AquaPoly/Mount auf Objektträger platziert und im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

### 2.2.8 Konfokale Mikroskopie

Immunzytochemische Färbungen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP5 II) aufgenommen. Bei der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) erreicht man einen besseren Kontrast und eine höhere Auflösung, da das Präparat sequentiell von einem Laserpunkt gescannt wird. Das Fluoreszenzlicht einzelner Punkte des Präparates wird detektiert und an einem Computer zu einem vollständigen Bild zusammengesetzt (Egger und Petran, 1967).

Die Bilder wurden mithilfe der Software LAS AF (Leica) aufgenommen. Zur Anregung des grünen, roten, infraroten und blauen Signals wurden ein Argon-Laser (30% Intensität), ein HeNe 543 nm-Laser, ein HeNe 633 nm-Laser und eine 405 nm Diode verwendet. Die Bilder wurden mit einem Gain zwischen 600 und 800, einem Pinhole von einer Airy Unit, einem 40x-Immersionsölobjektiv und einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixel aufgenommen.

### 2.2.9 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP, Fluoreszenzwiederkehr nach Photoausbleichung), ist eine Methode zur Messung der Diffusionskonstante von Molekülen. Hierfür wird nach Photoausbleichung Fluoreszenz-markierter Moleküle die

Rückkehr der Fluoreszenzintensität in dem ausgebleichenen Gebiet gemessen (Meyvis et al., 1999).

Vor der Aufnahme der lebenden Zellen wurde die 1x HBS-Lösung in einem Röhrchen angesetzt und für mindestens eine Stunde mit geöffnetem Deckel inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Danach wurden die Zellen mit der vorbereiteten 1x HBS- Lösung gewaschen und anschließend in der 1x HBS-Lösung unter das Mikroskop gestellt. Für die Aufnahmen mit dem Leica TCS SP5 II wurde die Mikroskop-Kammer auf 35 °C erhitzt. Aufgenommen wurden einzelne Wachstumskegel mit einem 40 x Immersionsölobjektiv mit 6 x Zoom. Es wurden von dem GFP-Signal vor dem Photoausbleichen fünf Bilder und nach dem Photoausbleichen 65 Bilder in einem Zeitraum von 5 Minuten aufgenommen. Das Fluoreszenzsignal wurde in einer kreisrunden Fläche mit dem Durchmesser von 10 x 10 µm im Wachstumskegel ausgebleichen. Die Bilder wurden anschließend mit Fiji (Schindelin et al., 2012) bearbeitet. Berechnungen zur Erholung der Fluoreszenz wurden mit Excel durchgeführt.

#### 2.2.10 Auswertung und statistische Analysen

Für die Ermittlung der Fläche und Form der Wachstumskegel wurde das Programm Fiji (Schindelin et al, 2012) verwendet. Statistische Analysen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt und die Mittelwerte und deren Standardfehler graphisch mittels GnuPlot dargestellt. Die Werte wurden als Mittelwerte mit ihrem jeweiligen Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden unter einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  getestet. Vergleiche mit P-Werten über 0,05 wurden als nicht signifikant unterschiedlich gewertet und graphisch mit n.s. markiert. P-Werte zwischen 0,05 und 0,01 wurden als signifikant gewertet und in den Graphiken mit einem Stern (\*) markiert. P-Werte zwischen 0,01 und 0,001 waren sehr signifikant und wurden mit zwei Sternen (\*\*) markiert. P-Werte < 0,001 waren höchst signifikant und wurden mit drei Sternen (\*\*\*) gekennzeichnet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit einer Analyse der Varianzen (ANOVA) getestet und anschließend mit einem Bonferroni-Holm korrigierten T-Test geprüft.



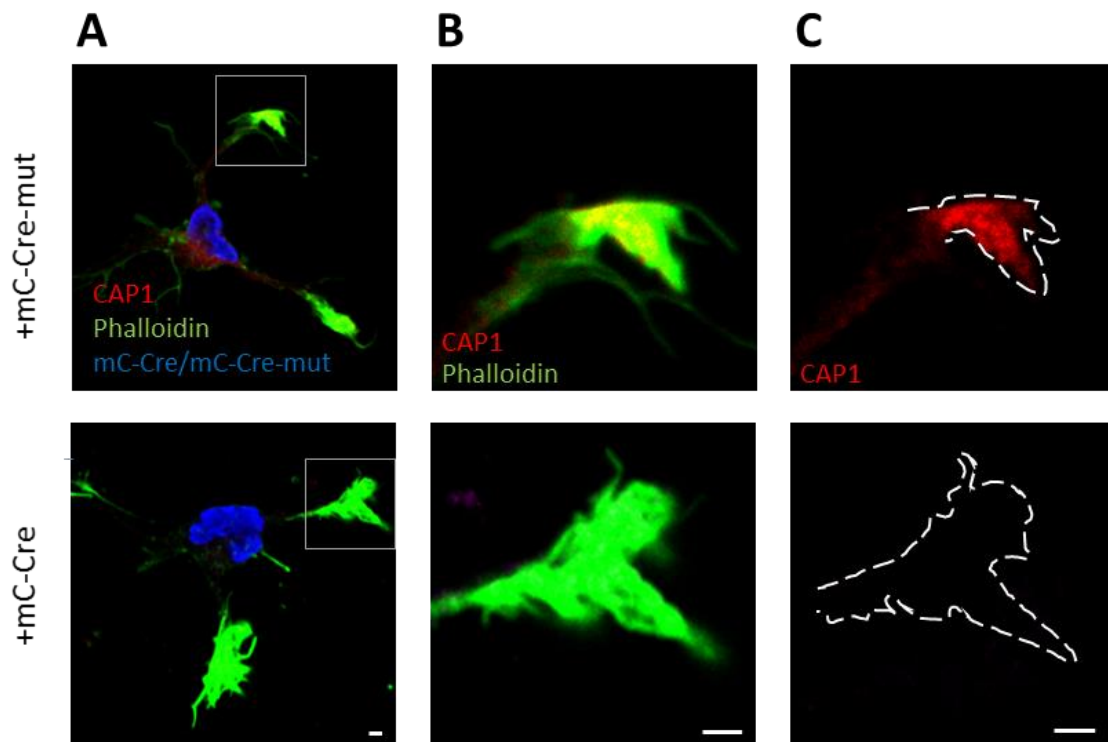
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis der CAP1-Deletion durch Transfektion mit mC-Cre

Über biochemische Assays konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden ABPe CAP1 und Cofilin1 funktionell miteinander interagieren (Kotila et al., 2019). Um zu überprüfen, ob diese Interaktion eine physiologische Relevanz hat, wurden Wachstumskegeln hippocampaler Neurone untersucht. Hippocampale CAP1<sup>flx/flx</sup>/Cfl1<sup>flx/flx</sup>-Neurone von Mäusen wurden am embryonalen Tag 17,5 bzw. 18,5 kultiviert. Um KO-Zellen zu generieren, wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches die Cre-Rekombinase codiert und nach Expression zur Deletion von CAP1 und Cofilin1 in diesen Zellen führte. Zur Visualisierung der transfizierten Zellen wurde die Cre-Rekombinase mit dem rotfluoreszierenden Protein mCherry (mC-Cre) markiert. Bei der Kontrollkondition erfolgte die Transfektion mit einer durch eine Mutation inaktivierten m-Cherry-markierten Cre-Rekombinase (mC-Cre-mut) (Kullmann et al., 2020).

Um zu überprüfen, ob der KO durch Transfektion mit mC-Cre erfolgreich war, wurden die hippocampalen CAP1<sup>flx/flx</sup>/Cfl1<sup>flx/flx</sup>-Neurone zwei Tage nach Transfektion mit mC-Cre-mut bzw. mC-Cre fixiert und mit einem Antikörper gegen CAP1 gefärbt.

Hier zeigte sich, dass die Zellen, welche mit mC-Cre-mut transfiziert wurden, ein deutliches CAP1-Fluoreszenzsignal aufwiesen. Dies bestätigt die CAP1-Lokalisation in Wachstumskegeln der Kontrollkondition. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass CAP1 nach Transfektion mit mC-Cre am zweiten Tag *in vitro* (TIV 2) nicht mehr in Wachstumskegeln vorhanden war (Abbildung 6). Dieses Experiment bestätigte, dass das mC-Cre-Konstrukt funktionsfähig ist. Somit konnte in der weiteren Studie die Funktion und Interaktion von CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln näher untersucht werden. Der KO-Nachweis für Cofilin1 war insofern nicht möglich gewesen, da für diese Studie kein Antikörper gegen Cofilin1 vorlag, der in der Immunzytochemie funktioniert.



**Abbildung 6: Nachweis der CAP1-Deletion in hippocampalen Neuronen an TIV 2.** (A) Repräsentative Aufnahmen isolierter hippocampaler Neurone aus  $CAP1^{flx/flx}/Cfl1^{flx/flx}$  Mäusen, die mit mC-Cre-mut bzw. mC-Cre transfiziert und mit einem Antikörper gegen CAP1 (rot), mC-Cre-mut/mC-Cre (blau) und einem F-Aktin-Marker Phalloidin (grün) gefärbt wurden. (B) Vergrößerung des Wachstumskegels aus (A). (C) Nachweis der CAP1-Deletion nach Transfektion mit mC-Cre. Die gestrichelte Linie markiert den Umriss des Wachstumskegels in (B). Die Länge der Maßstabbalken beträgt jeweils 2  $\mu$ m.

### 3.2 Die Rolle von CAP 1 und Cofilin 1 in der Aufrechterhaltung der Aktindynamik

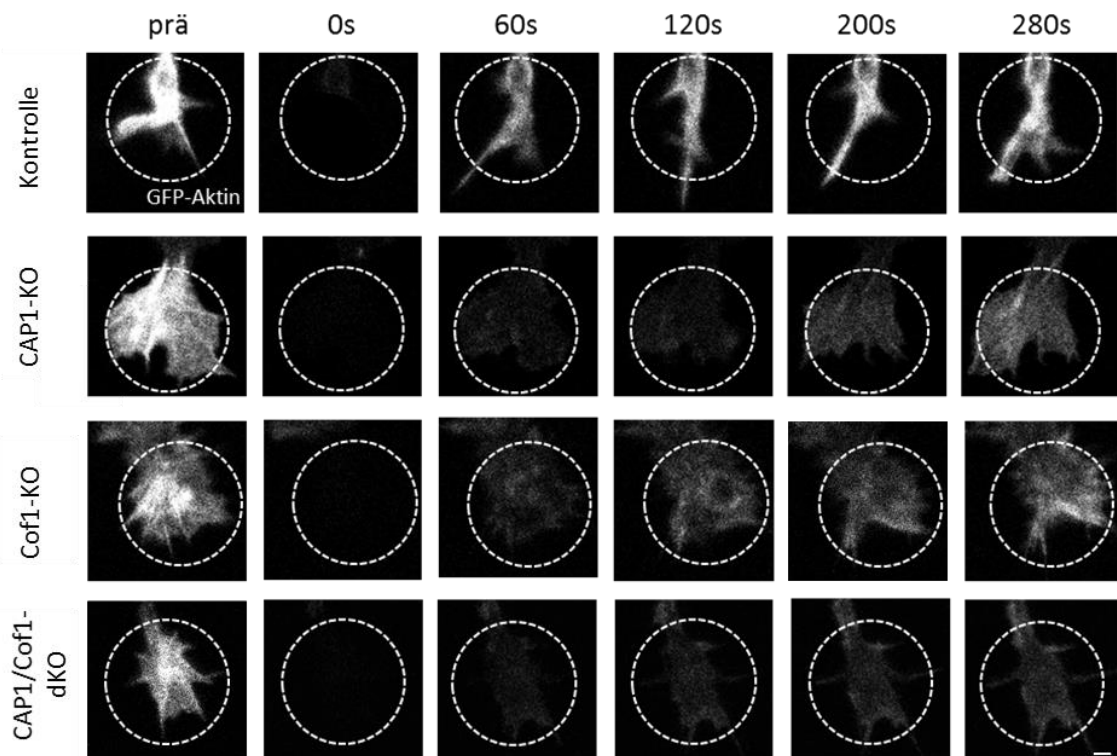
Da bekannt ist, dass sowohl CAP1 allein als auch Cofilin1 allein die Aktindynamik beeinflusst (Ono, 2013; Omotade et al., 2007; Flynn et al., 2012), soll diese in Wachstumskegeln von dKO-Neuronen untersucht werden. Um einen direkten Vergleich zu erhalten, wurde die Aktindynamik ebenfalls in Einzel-KO-Zellen gemessen. Somit wurde die Aktindynamik im nachfolgenden Experiment in CAP1-Einzel-KO, Cofilin1-Einzel-KO- und CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen mittels FRAP untersucht.

Hierfür wurden hippocampale  $CAP1^{flx/flx}$ ,  $Cfl1^{flx/flx}$  und  $CAP1^{flx/flx}/Cfl1^{flx/flx}$ -Neurone mit mC-Cre-mut bzw. mC-Cre und zusätzlich mit GFP-Aktin transfiziert.

Da in der ersten Zeit nach Transfektion von mC-Cre bereits vorher synthetisiertes CAP1 und Cofilin1 noch nicht komplett abgebaut sind, wurden die Zellen an TIV 2, an dem CAP1 nicht mehr detektierbar war (Abbildung 6), erneut ausplattiert. Das erneute Ausplattieren ist notwendig, da Wachstumskegel an TIV 2 kaum noch vorhanden sind (Dotti et al., 1988) und die Neurone daher in einen undifferenzierten Ausgangszustand zurückversetzt werden müssen, um eine erneute Ausbildung von Wachstumskegeln zu induzieren. Die Zellen wurden daher an TIV 2 von der Oberfläche gelöst und erneut ausplattiert, um einen Ausgangszustand mit KO der jeweiligen Zielproteine zu erhalten und die Wachstumskegel analysieren zu können (Biswas und Kalil, 2018; Schneider et al., 2021b).

24 h nach dem erneuten Ausplattieren der Neurone wurden die Wachstumskegel hinsichtlich ihrer Aktindynamik mittels FRAP untersucht. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität des GFP-Aktins in Wachstumskegeln vorab gemessen. Nach Ausbleichen dieser Fluoreszenz wurde die Wiedererlangung des Fluoreszenzsignals über einen Zeitraum von knapp fünf Minuten gemessen.

Hier zeigte sich in allen Konditionen ein starkes Fluoreszenzsignal vor der Photoausbleichung. Nach erfolgreicher Ausbleichung zum Zeitpunkt 0 s war kein Fluoreszenzsignal mehr zu erkennen. In der Kontrollkondition war eine relativ gute Rückkehr der Fluoreszenz über die Zeit festzustellen. Weiterhin konnte man im Zeitraum der Messung relativ große Veränderungen in der Form des Wachstumskegels erkennen. Im Vergleich dazu konnte man in der Aufnahmesequenz des Wachstumskegels des CAP1-Einzel-KOs als auch des Cofilin1-Einzel-KOs eine schwächere Wiedererlangung des Fluoreszenzsignals erkennen. Zudem ist erkennbar, dass die Wachstumskegel im Vergleich zur Kontrollkondition weniger motil waren. Am schwächsten war die Erholung der Fluoreszenz im Wachstumskegel des CAP1/Cofilin1-dKOs. Hier zeigte sich ähnlich zu den Einzel-KOs ebenfalls eine geringe Motilität (Abbildung 7).

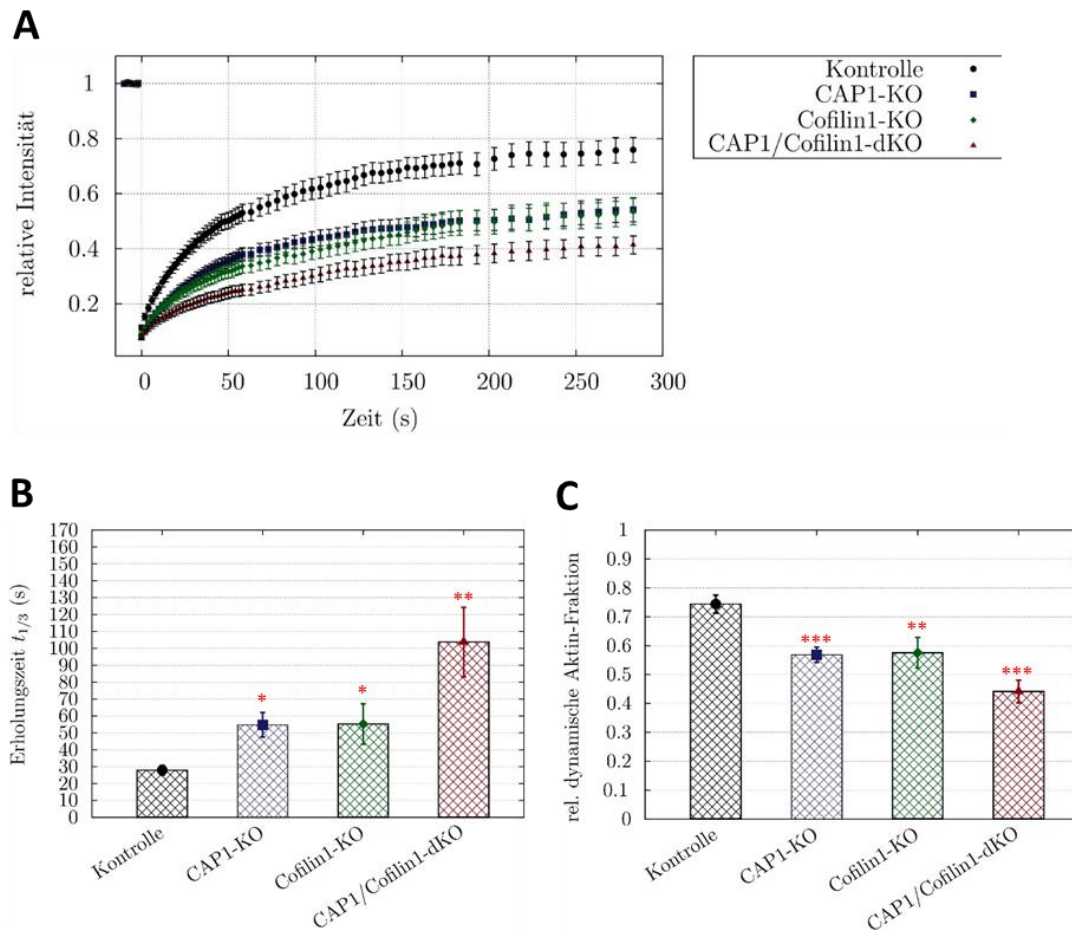


**Abbildung 7: Die Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität ist nach KO von CAP1 und/oder Cofilin1 beeinträchtigt.** Repräsentative Aufnahmesequenz von GFP-Aktin-transfizierten Wachstumskegeln der CAP1-KO-, Cofilin1-KO- und CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen des Hippocampus vor und nach Ausbleichen des GFP-Aktin-Signals. Der weiß-gestrichelte Kreis markiert die Fläche, in dem das Fluoreszenzsignal ausgebleicht wurde. Die Länge des Maßstabbalkens entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

Die beschriebenen Beobachtungen konnten durch Quantifizierung des Fluoreszenzsignals bestätigt werden. Die Erholungskurve der relativen Fluoreszenzintensität war in allen drei KO-Konditionen im Vergleich zur Kontrollkondition niedriger und flacher (Abbildung 8A). Dies belegt, dass die Aktindynamik in Wachstumskegeln des Einzel- als auch Doppel-KOs beeinträchtigt war. Zur besseren Quantifizierung wurden aus den Kurven zwei Parameter bestimmt, die die Aktindynamik beschreiben: Die Zeit bis zur Wiedererlangung von einem Drittel der ursprünglichen Fluoreszenzintensität ( $t_{1/3}$ ), welche die Aktinumdynamik quantifiziert, und das Plateau der Kurve, welches den relativen Anteil an dynamischem Aktin widerspiegelt.

Die Rate der Aktinmwandlung war im Vergleich zur Kontrollkondition sowohl im CAP1-Einzel-KO ( $t_{1/3}$  in s: Kontrolle:  $27,89 \pm 2,87$ ;  $n=32/9$ ; CAP1-KO:  $54,77 \pm 7,31$ ;  $n=19/3$ ;  $P<0,05$ ) als auch im Cofilin1-Einzel-KO ( $t_{1/3}$  in s: Cofilin 1-KO:  $55,17 \pm 11,94$ ;  $n= 21/3$ ;  $P<0,05$ ) fast doppelt so lang. In der Doppel-KO-Situation dauerte die Wiederherstellung der 33 %-Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrollkondition etwa viermal so lange ( $t_{1/3}$  in s: CAP1/ Cofilin1-dKO:  $103,77 \pm 20,56$ ;  $n=22/3$ ;  $P<0,01$ ) (Abbildung 8B).

Neben der verlangsamten Fluoreszenzwiederherstellung fand sich in den KO-Konditionen eine Reduktion der dynamischen Aktinfraktion. Im Vergleich zur Kontrolle ( $0,74 \pm 0,03$ ;  $n=32/9$ ) ist der relative Anteil an dynamischem Aktin in CAP1- und Cofilin1-Einzel-KO-Zellen um ca. 20 bis 25 % verringert (CAP1-KO:  $0,56 \pm 0,04$ ;  $n=19/3$ ;  $P<0,001$ ; Cofilin1-KO:  $0,58 \pm 0,05$ ;  $n= 21/3$ ;  $P<0,01$ ). Im Doppel-KO fand sich im Vergleich zur Kontrolle der geringste Anteil der dynamischen Aktinfraktion (CAP1/ Cofilin1-dKO:  $0,44 \pm 0,04$ ;  $n=22/3$ ;  $P<0,001$ ), welcher im Vergleich zur Kontrollkondition um etwa 40 % verringert war (Abbildung 8C).



**Abbildung 8: Der KO von CAP1 und/oder Cofilin1 führt zu einer verminderten Aktindynamik in hippocampalen Wachstumskegeln.** (A) Die Quantifizierung zeigte in allen KO-Situationen eine reduzierte Wiedererlangung der Fluoreszenz nach Photoausbleichung, wobei die Erholung der Fluoreszenzintensität in Wachstumskegeln der CAP1/Cofilin1-dKO-Kondition am stärksten beeinträchtigt war. (B) Die Zeit bis zur Wiedererlangung von 33% der ursprünglichen Fluoreszenzintensität ( $t_{1/3}$ ) nach Photoausbleichung war in allen drei KO-Konditionen verlängert. Es zeigte sich die längste Erholungszeit in der CAP1/Cofilin1-dKO-Kondition. Die rot markierten Sterne zeigen den signifikanten Unterschied zur Kontrolle an. (C) Der relative Anteil des dynamischen Aktins war im Vergleich zur Kontrollsituation in allen KO-Konditionen geringer. Der geringste Anteil an dynamischem Aktin fand sich wieder in der CAP1/Cofilin1-dKO-Kondition. Die rot markierten Sterne zeigen den signifikanten Unterschied zur Kontrolle an.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sowohl der Einzel-KO von CAP1 oder Cofilin1 allein als auch der Doppel-KO zu einer ähnlichen Reduktion der Aktindynamik führen.

Des Weiteren hat dieses Experiment gezeigt, dass die Aktindynamik in mit mC-Cre transfizierten  $CAP1^{flx/flx}$  Neurone nach dem erneuten Ausplattieren der Neurone ähnliche Werte ergab wie in einem zuvor durchgeführten Experiment an hippocampalen Neuronen von  $CAP1^{flx/flx}, Nestin-Cre$  Mäusen, welche während der gesamten Hirnentwicklung kein CAP1 exprimierten (Schneider et al., 2021a). Dies bestätigt, dass der Ansatz der Transfektion mit mC-Cre und der neu etablierten Methode des erneuten Ausplattieren der Neurone valide sind und daher für diese Art der Untersuchung und für die folgenden Experimente genutzt werden kann.

### **3.3 Veränderte Größe von Wachstumskegeln in CAP1- und/oder Cofilin1-defizienten hippocampalen Neuronen**

Da die Aktindynamik in CAP1- und/oder Cofilin1-defizienten Neuronen beeinträchtigt ist, sollten im nächsten Schritt diese Auswirkungen auf die Größe der Wachstumskegel der jeweiligen KO-Neurone näher untersucht werden.

Die Struktur und Form der Wachstumskegel stehen unter dem Einfluss von ABPEn, die das Aktinzytoskelett auf unterschiedlichste Weise organisieren können (Gomez und Letourneau, 2014). Durch eine hohe Aktindynamik kann die Form und Erscheinung von Wachstumskegeln kontinuierlich verändert werden. Dies ist wichtige Voraussetzung für die Funktion der Wachstumskegel in der Neuronendifferenzierung (Ye et al., 2019; Omotade et al., 2017).

Um nun die Rolle von CAP1 und Cofilin1 auf das Erscheinungsbild der Wachstumskegel zu untersuchen, wurde der gleiche experimentelle Ansatz wie beim FRAP-Experiment verwendet und hier die Größe der Wachstumskegel analysiert. Hippocampale  $CAP1^{flx/flx}$ ,  $Cfl1^{flx/flx}$  und  $CAP1/Cfl1^{flx/flx}$ -Neurone wurden jeweils mit mC-Cre-mut bzw. mit mC-Cre transfiziert und an TIV 2 erneut ausplattiert. 24 h später wurden die Zellen fixiert und nach immunzytochemischer Färbung mittels konfokaler Mikroskopie aufgenommen.

Hier zeigten sich in den Kontrollkonditionen aller drei Mauslinien Wachstumskegel mit relativ kleinem Lamellipodium und fingerförmigen Ausläufern. Sowohl im Einzel-KO von

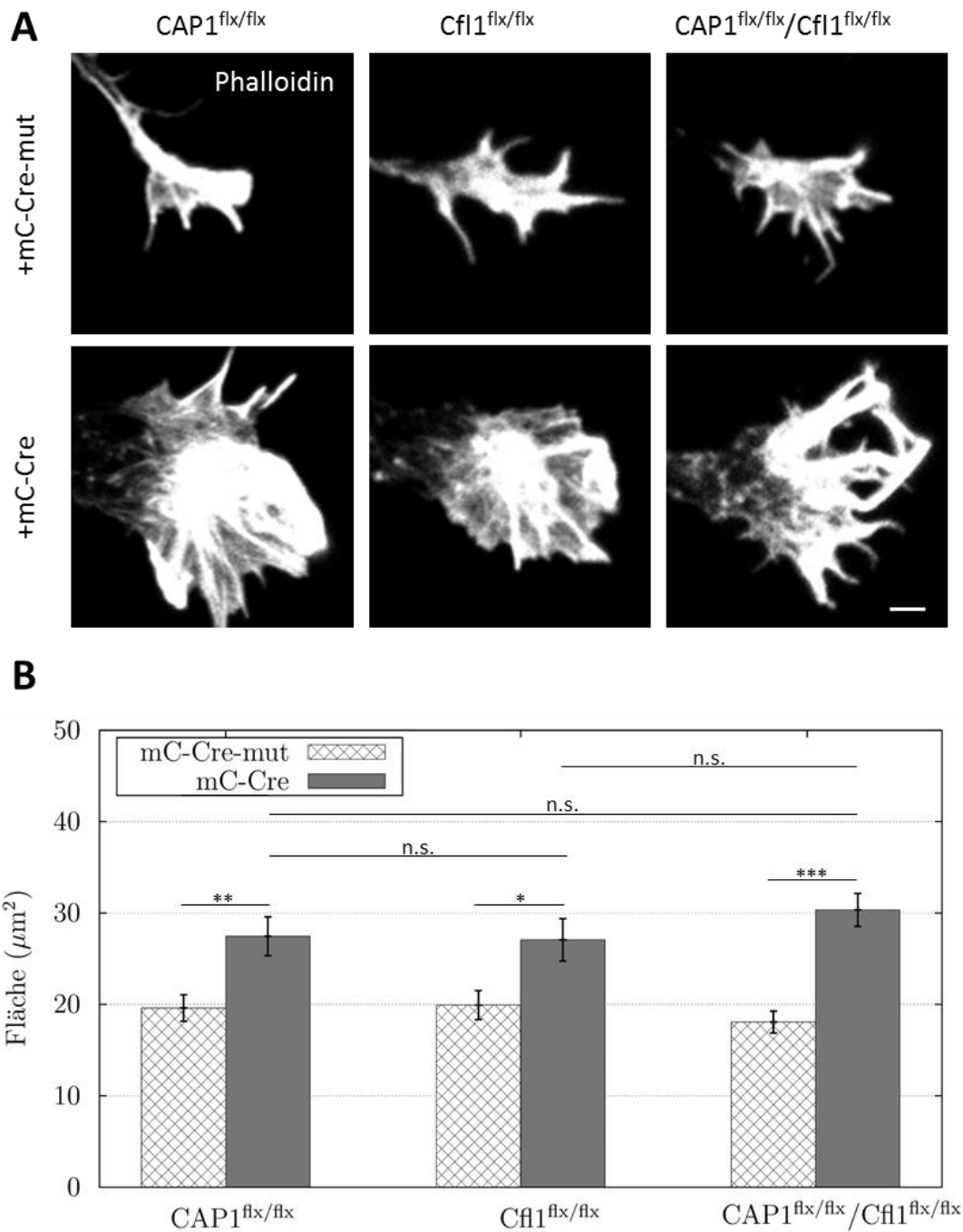
CAP1 als auch im Einzel-KO von Cofilin1 und im Doppel-KO von CAP1 und Cofilin1 war eine Vergrößerung der Wachstumskegel zu erkennen (Abbildung 9A).

Diese Beobachtungen wurden in der Quantifizierung der Fläche der Wachstumskegel bestätigt. Der Einzel-KO von CAP1 bewirkte eine Erhöhung der Wachstumskegel-Größe um ca. 40% (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre-mut:  $19,6 \pm 1,44$ ; mC-Cre:  $27,46 \pm 2,12$ ; jeweils  $n=90/3$ ;  $P<0,01$ ) (Abbildung 9B). Dass diese Werte ähnlich zu einem zuvor durchgeführten Experiment an hippocampalen  $\text{CAP1}^{\text{flx/flx}}$ , Nestin-Cre-Neurone waren (Schneider et al., 2021a), bestätigt nochmal die Validität des erneuten Ausplattierens der Neurone als experimentelle Methode.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch beim Einzel-KO von Cofilin1 gemacht, bei dem die Fläche nach mC-Cre-Expression um etwa 36% anstieg (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre-mut:  $19,92 \pm 1,58$ ; mC-Cre:  $27,07 \pm 2,32$ ; jeweils  $n=70/3$ ;  $P<0,05$ ). Somit war die Fläche im Cofilin1-KO im Vergleich zum CAP1-KO ähnlich vergrößert ( $P=0,93$ ). Die gemeinsame Inaktivierung von CAP1 und Cofilin1 führte zu einer Vergrößerung der Fläche um ca. 66% (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre-mut:  $18,07 \pm 1,2$ ; mC-Cre:  $30,33 \pm 1,80$ ; jeweils  $n=80/3$ ,  $P<0,001$ ). Demnach war die Größe im CAP1-KO bzw. Cofilin1-KO im Vergleich zum dKO ähnlich vergrößert ( $P=0,7$  bzw.  $P=0,93$ ) (Abbildung 9B).

Zusammenfassend stellte sich heraus, dass der KO von CAP1 und/oder Cofilin1 zu einer ähnlichen Vergrößerung der Fläche von Wachstumskegeln führt. Ein additiver Effekt durch den Doppel-KO von CAP1 und Cofilin1 konnte nicht verzeichnet werden.





**Abbildung 9: Sowohl der KO von CAP1 bzw. Cofilin1 allein als auch der dKO von CAP1 und Cofilin1 zusammen führen zu einer Vergrößerung der Wachstumskegel.** (A) Repräsentative Aufnahmen von hippocampalen Wachstumskegeln der CAP1-KO-, Cofilin1-KO- und CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen, gefärbt mit dem F-Aktin-Marker Phalloidin. Die Länge des Maßstabalkens entspricht 2µm. (B) Die Quantifizierung der Wachstumskegel-Fläche zeigte eine ähnliche Vergrößerung in CAP1-KO, Cofilin1-KO und CAP1/Cofilin1- dKO- Zellen.

### 3.4 Regulation der Größe von Wachstumskegeln durch CAP1 und Cofilin1

Im nächsten Schritt wurde die Bedeutung von CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln näher analysiert. Ferner wurde untersucht, ob CAP2, welches ebenfalls in Neuronen exprimiert wird und in Wachstumskegeln lokalisiert ist (Bertling et al., 2004; Swiston et al., 1995; Schneider et al., 2021; Rust et al., 2020), CAP1 in der Regulation der Wachstumskegel-Größe ersetzen kann. Hierfür wurden hippocampale CAP1<sup>flx/flx</sup>/Cfl1<sup>flx/flx</sup>-Neurone mit mC-Cre-mut bzw. mC-Cre transfiziert. Zusätzlich wurde GFP alleine oder folgende GFP-markierte Proteine überexprimiert: 1) GFP-CAP1, 2) GFP-Cofilin1, 3) GFP-CAP1 und GFP-Cofilin1 zusammen und 4) GFP-CAP2 und GFP-Cofilin1 zusammen. Das weitere Verfahren glich den vorherigen Experimenten. Die Zellen wurden am TIV 2 replattiert. 24 h später wurden Aufnahmen der Wachstumskegel mit konfokaler Mikroskopie durchgeführt.

In den Kontrollneuronen, in denen nur GFP überexprimiert wurde, war wieder eine Vergrößerung der Wachstumskegel-Größe in der mC-Cre-Kondition im Vergleich zur mC-Cre-mut-Kondition zu erkennen (Abbildung 10). Ferner waren die Werte ähnlich zu den Daten der CAP1/Cofilin1-dKO-Neurone nach Transfektion mit mC-Cre bzw. mC-Cre-mut (Abbildung 9). Dies belegt, dass die Überexpression von GFP keinen Effekt auf den Phänotyp hat und die nachfolgenden Experimente direkt mit den vorherigen verglichen werden können. Die Überexpression der oben genannten Konstrukte in den Zellen, die mit mC-Cre-mut transfiziert wurden, hatte keinen Einfluss auf die Größe der Wachstumskegel (Daten nicht gezeigt). Der Fokus sollte auf die KO-Konditionen gelegt werden.

Nach alleiniger Überexpression von GFP-CAP1 oder GFP-Cofilin1 war eine im Vergleich zur Kontrollkondition weiterhin vergrößerte Wachstumskegel-Fläche festzustellen. Bei Überexpression von GFP-CAP1 mit GFP-Cofilin1 zusammen war eine Reduktion der Fläche des Wachstumskegels im Vergleich zur KO-Kondition zu erkennen, wohingegen die Überexpression von GFP-CAP2 mit GFP-Cofilin1 eine weiterhin vergrößerte Fläche zeigte (Abbildung 10).

Diese Beobachtungen wurden quantifiziert. Die Wachstumskegel-Größe in der mC-Cre-Kondition war im Vergleich zur mC-Cre-mut-Kontrollkondition um ca. 68% erhöht (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre-mut + GFP:  $18,07 \pm 1,2$ ; n=80/3; mC-Cre + GFP:  $30,33 \pm 1,8$ ; n=80/3;  $P < 0,001$ ). Die alleinige Überexpression von GFP-CAP1 oder GFP-Cofilin1 in mC-Cre-transfizierten  $\text{CAP1}^{\text{flx/flx}}/\text{Cfl1}^{\text{flx/flx}}$ -Neuronen konnte die ursprüngliche Größe der Wachstumskegel nicht wiederherstellen. Die Fläche war im Vergleich zur Kontrollkondition weiterhin vergrößert (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre-mut + GFP:  $18,07 \pm 1,2$ ; n=80/3; mC-Cre + GFP-CAP1:  $31,3 \pm 2,84$ ; n=70/3;  $P < 0,01$ ; mC-Cre + GFP-Cof1:  $32,12 \pm 3,08$ ; n=100/3,  $P < 0,01$ ). Im Vergleich zur Cre-Kontrolle gab es sowohl nach Überexpression mit GFP-CAP1 ( $P=0,87$ ) als auch mit GFP-Cofilin1 ( $P=0,71$ ) keinen signifikanten Unterschied. Die Überexpression von GFP-CAP1 und GFP-Cofilin1 zusammen in mC-Cre-transfizierten Neuronen konnte die Fläche der Wachstumskegel jedoch wieder normalisieren. Die Größe war ähnlich der Cre-mut-Kontrolle (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre + GFP-CAP1 + GFP-Cof1:  $22,71 \pm 2,13$ ; n= 90/3,  $P=0,21$ ), während die Größe nun signifikant unterschiedlich zur Cre-Kondition war ( $P < 0,05$ ) (Abbildung 11).

Eine Überexpression von GFP-CAP2 und GFP-Cofilin1 bewirkte keine Normalisierung der Fläche. Im Vergleich zur Cre-mut-Kontrolle war die Fläche weiterhin vergrößert (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre + GFP-CAP2 + GFP-Cof1:  $38,69 \pm 3,83$ ; n= 90/3,  $P < 0,001$ ), wobei sie ähnlich zur Cre-Kontrolle war ( $P=0,37$ ) (Abbildung 11).

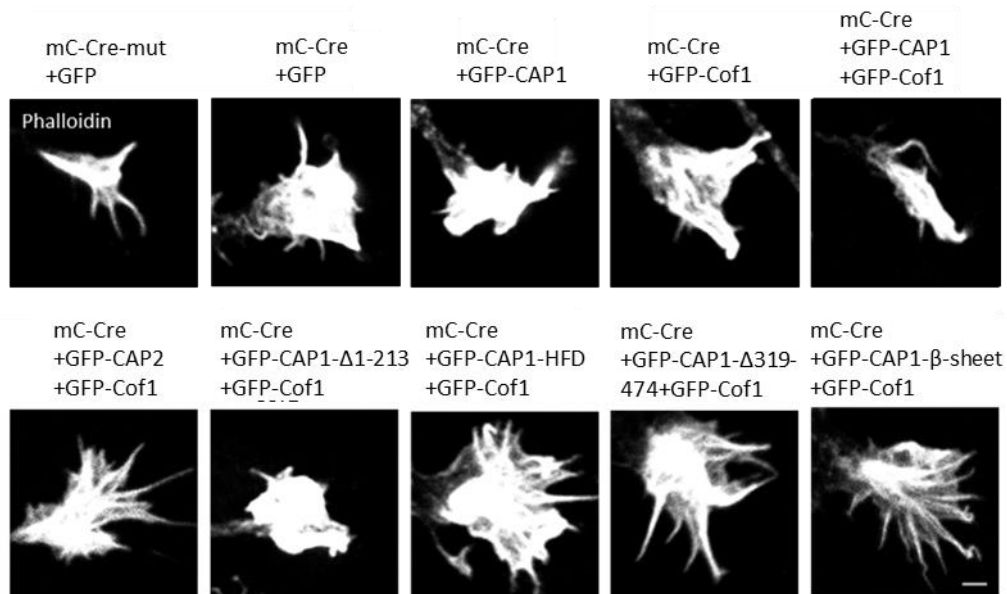
Diese Daten zeigen, dass CAP1 und Cofilin1 zusammen für die Regulation der Wachstumskegel-Größe unentbehrlich sind und verstärken die Hypothese, dass die beiden ABPe miteinander interagieren und eine funktionelle Abhängigkeit voneinander zeigen. Weder CAP1 allein noch Cofilin1 allein kann den Verlust des anderen Proteins kompensieren. Eine weitere wichtige Erkenntnis aus diesem Experiment ist, dass CAP2 im Vergleich zu CAP1 eine geringere Rolle in der Aufrechterhaltung der Wachstumskegel-Größe spielt.

Um eine mögliche Interaktion von CAP1 und Cofilin1 zu bestätigen und die Relevanz ausgewählter CAP1-Domänen näher zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt weitere

Überexpressionsversuche mit GFP-Cofilin1 und verschiedenen GFP-markierten CAP1- Mutanten durchgeführt. Die Transfektion erfolgte hierfür mit mC-Cre-mut bzw. mC-Cre und GFP-Cofilin1. Zusätzlich wurden verschiedene mit GFP-markierte CAP1-Mutanten überexprimiert: 1) GFP-CAP1- $\Delta$ 1-213 mit fehlender HFD durch Deletion des N-Terminus, 2) GFP-CAP1-HFD mit einer Mutation in der HFD, 3) GFP-CAP1- $\Delta$ 319-474 mit fehlender CARP-Domäne und 4) GFP-CAP1- $\beta$ -Blatt mit einer Mutation im  $\beta$ -Blatt der CARP-Domäne.

Die Zellen wurden wie in den vorherigen Experimenten nach Transfektion zwei Tage kultiviert und anschließend replattiert. Nach 24 h wurden die Neurone fixiert und nach immunzytochemischer Färbung wurden Aufnahmen mittels konfokaler Mikroskopie gemacht.

Sowohl bei der Überexpression von Cofilin1 mit CAP1-Mutanten, bei denen die HFD fehlend oder nicht funktionsfähig war, als auch bei der Überexpression von Cofilin1 mit CAP1-Mutanten, bei denen die CARP-Domäne fehlend oder nicht funktionsfähig war, waren vergrößerte Wachtumskegel zu erkennen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: CAP1 und Cofilin1 zusammen können die Wachstumskegel-Größe normalisieren.**

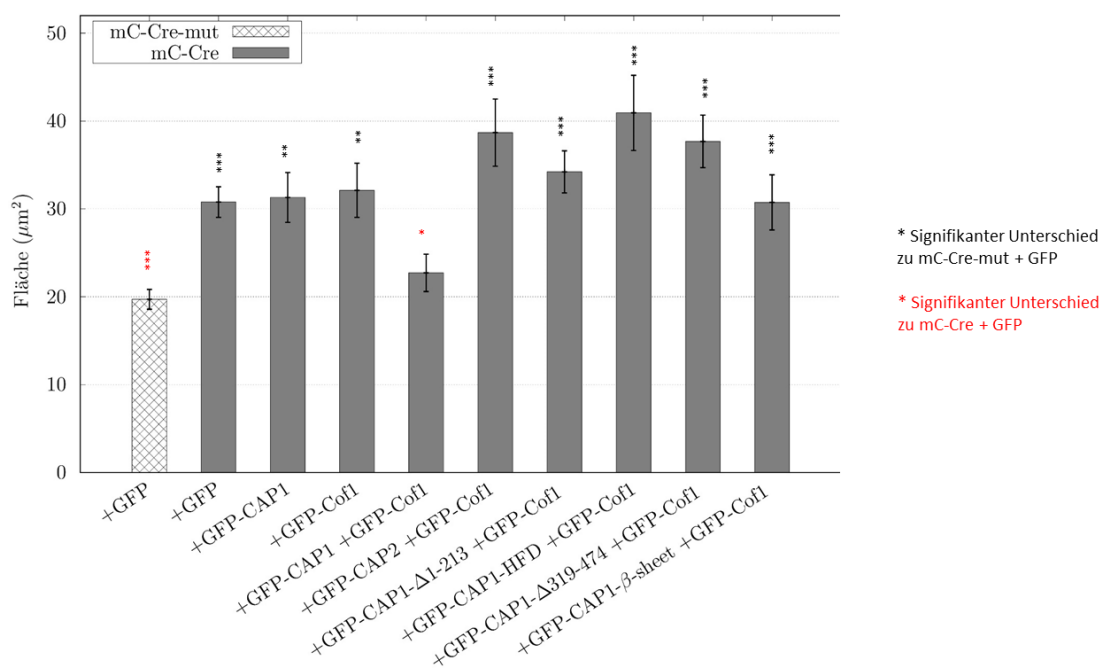
Repräsentative Aufnahmen von hippocampalen Wachstumskegeln der  $CAP1^{flx/flx}/Clf1^{flx/flx}$  Zellen, transfiziert mit GFP-CAP1, GFP-Cofilin1, GFP-CAP2 und verschiedenen GFP-CAP1-Mutanten. Die Wachstumskegel wurden mit Phalloidin gefärbt. Die Länge des Maßstabbalkens entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

Es konnte belegt werden, dass die Überexpression von Cofilin1 mit der CAP1-Mutante mit Deletion bzw. Mutation von HFD die ursprüngliche Wachstumskegel-Größe nicht regenerieren konnte und somit signifikant unterschiedlich zur Cre-mut-Kontrolle war (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre-mut + GFP:  $19,71 \pm 1,13$ ; n=80/3; mC-Cre + GFP-CAP1- $\Delta 1$ -213 + GFP-Cof1:  $34,22 \pm 2,4$ ; n=120/3;  $P < 0,001$ ; mC-Cre + GFP-CAP1-HFD + GFP-Cof1:  $40,93 \pm 4,29$ ; n=80/3;  $P < 0,001$ ). Die Größe war sowohl nach Überexpression von GFP-Cofilin1 und GFP-CAP1-  $\Delta 1$ - 213 ( $P=0,98$ ) bzw. GFP-Cofilin1 und GFP-CAP1-HFD ( $P=0,24$ ) ähnlich zur Cre-Kontrolle (Abbildung 11).

Auch war die Fläche der Wachstumskegel nach Überexpression von GFP-Cofilin1 mit der GFP-CAP1-Mutante mit Deletion bzw. Mutation von CAP1-Domäne weiterhin vergrößert und signifikant unterschiedlich zur Cre-mut-Kontrolle (Fläche in  $\mu\text{m}^2$ : mC-Cre + GFP-CAP1-  $\Delta 319$ - 474 + GFP-Cof1:  $37,7 \pm 2,99$ ; n=90/3;  $p < 0,001$ ; mC-Cre + GFP-CAP1- $\beta$ -Blatt + GFP-Cof1:  $30,74 \pm 3,14$ ; n= 70/3;  $p < 0,001$ ) (Abbildung 11). Im Vergleich zur Cre-

Kontrolle war die Fläche nach Überexpression von GFP-Cofilin1 und GFP-CAP1- $\Delta$ 319-474 ( $P=0,34$ ) bzw. GFP-Cofilin1 und GFP-CAP1- $\beta$ -Blatt ( $P=0,99$ ) ähnlich (Abbildung 11).

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse eine voneinander abhängige Kooperation von CAP1 und Cofilin1 über die HFD, die für die Regulation der Fläche von Wachstumskegeln nötig ist. Ferner wird hier die wichtige Bedeutung des Nucleotidaustausches in der Aktindynamik über die CARP-Domäne deutlich, die hier auch eine zentrale Rolle in der Regulation der Wachstumskegel-Größe spielt.



**Abbildung 11: CAP1 und Cofilin1 zusammen werden für die Regulation der Wachstumskegel-Größe benötigt.** Die Quantifizierung zeigte, dass nur GFP-CAP1 und GFP-Cofilin1 zusammen die ursprüngliche Größe der Wachstumskegel wiederherstellen können. Deletion bzw. Mutation der HFD- (GFP-CAP1- $\Delta$ 1-213, GFP-CAP1-HFD) oder CARP-Domäne (GFP-CAP1- $\Delta$ 319-474, GFP-CAP1- $\beta$ -sheet) von CAP1 beeinträchtigten diese Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Größe. Die Überexpression von GFP-CAP2 und GFP-Cofilin1 ist auch nicht ausreichend, um die ursprüngliche Wachstumskegel-Fläche in CAP1-Cof1-dKO-Zellen wiederherzustellen

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Rolle von CAP1 und Cofilin1 in der Neurogenese

Das Aktinzytoskelett spielt eine zentrale Rolle in der Neuronendifferenzierung. Im Vergleich zu Intermediärfilamenten und Mikrotubuli weist das Aktinzytoskelett eine höhere Dynamik und Umbaurate auf. Diese Besonderheit ermöglicht Neuronen eine schnelle und gezielte Anpassung an bestimmte Erfordernisse während ihrer Entwicklung (Munoz-Lasso et al., 2020). Über den kontinuierlichen Umbau von Aktinfilamenten, der durch ABPe reguliert wird, wird das Wachstum, die Morphologie und Navigation sich entwickelnder Neurone gesteuert (Luo, 2002; Da Silva und Dotti, 2002; Revenu et al., 2004; Blanquie und Bradke, 2018). ABPe regulieren den Aktintretmühlenmechanismus beispielsweise über die Abtrennung, Verlängerung oder Verzweigung von Aktinfilamenten, das Binden von G-Aktin und die Nukleation von Aktinfilamenten (Gomez und Letourneau, 2014; Omotade et al., 2017).

Störungen in ABPen resultieren daher in Beeinträchtigungen der Aktindynamik und können pathologische Erscheinungsbilder nach sich ziehen. So kann eine gestörte Aktindynamik zu Defekten in Wachstumskegeln und somit zu einer gestörten Axonmigration in der Neuronendifferenzierung führen. Folgen sind beispielsweise mentale Retardierung, Entwicklungsstörungen und weitere neurologische Erkrankungen wie Autismus oder das Kallmann-Syndrom (Niftullayev und Lamarche-Vane, 2019; van Battum et al., 2015; Ramakers, 2002; Engle, 2010; Lian und Sheen; 2015; Gomez und Letourneau, 2014).

Der Zusammenhang von Defekten in ABPen und daraus resultierenden Erkrankungen erfordert ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Proteine in der Koordination des Aktinzytoskeletts, um einerseits die Pathologie Aktin-abhängiger Erkrankungen besser verstehen zu können und andererseits neue Möglichkeiten in der Diagnostik und Therapie zu schaffen.

Unter den vielen ABPen konnte für Cofilin1 und CAP1 eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Nervensystems zugesprochen werden (Flynn et al., 2012; Dent et al.,

2011; Schneider et al., 2021a; Wills et al., 2002; Rust und Marcello, 2022). Ziel dieser Studie ist es, ein besseres Verständnis der Aktindynamik-Regulation in Wachstumskegeln durch CAP1 und Cofilin1 zu erhalten. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Cofilin1 und CAP1 auf molekularer Ebene miteinander interagieren (Quintero-Monzon et al., 2009; Kotila et al., 2019), wird in dieser Studie die Hypothese gestellt, dass Cofilin1 und CAP1 auch in Wachstumskegeln miteinander interagieren, um die Funktionalität des Aktinzytoskeletts aufrechtzuerhalten.

#### **4.2 Die Rolle von Cofilin1 in Wachstumskegeln**

Die Bedeutung von Cofilin1 in der Neuronendifferenzierung ist in vielen Studien bereits umfänglich untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass es das wichtigere Protein in der ADF/Cofilin-Familie ist (Bellenchi et al., 2007; Flynn et al., 2012), welches die Aktindynamik durch Dissoziation von G-Aktin von den Aktinfilamenten fördert (Flynn et al., 2012; Dent et al., 2011). In Wachstumskegeln kann Cofilin1 dadurch abhängig von räumlichen und zeitlichen Faktoren einerseits die Fortbewegung von Wachstumskegeln verstärken (Bradke und Dotti, 1999), andererseits ist es auch in der Lage, bei repulsiven Signalmolekülen ein Kollabieren des Wachstumskegels zu bewirken (Hsieh et al., 2006; Piper et al., 2006; Omotade et al., 2017). Weiterhin beeinflusst Cofilin1 den retrograden Aktinfluss und die Formation von Neuriten (Flynn et al., 2012). Cofilin1 ist somit essenziell an der Axonnavigation und embryonalen Gehirnentwicklung beteiligt (Dent et al., 2011; Piper et al., 2006).

Auch in dieser Studie konnte belegt werden, dass Cofilin1 im Umbau des Aktinzytoskeletts in Wachstumskegeln beteiligt ist und die Inaktivierung von Cofilin1 zu einer reduzierten Aktindynamik führt. Weiterhin ist die Fläche der Cofilin1-defizienten Wachstumskegel vergrößert. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass bei Verlust von Cofilin1 der Abbau von Aktinfilamenten gestört ist. Daraus resultieren folgende Effekte: Zum einen sind die Aktinfilamente stabilisiert. Zum anderen kann vermutet werden, dass durch die verringerte Rate an F-Aktin-Durchtrennung weniger kurze Aktinfilamente mit Plus- und Minusende vorliegen. So ist die Polymerisation am



Plus-Ende und die Depolymerisation am Minus-Ende der Filamente auch verringert. Dies beeinträchtigt die Aktindynamik. Durch die fehlende Durchtrennung der Aktinfilamente kommt es zu einer Verschiebung des F-/G-Aktin-Verhältnisses zugunsten von F-Aktin. Da aufgrund der reduzierten Depolymerisation weniger recycelte Aktinmonomere zur Verfügung stehen, kann vermutet werden, dass die Polymerisation zusätzlich verringert ist (Chan et al., 2000, Dent et al., 2011). Es ist jedoch auch bekannt, dass es neben dem recycelten G-Aktin noch ein Bestand an G-Aktin aus dem Zytosol gibt (Vitriol et al., 2015). Fraglich ist, ob die Menge an zytosolischem G-Aktin den Mangel an recyceltem G-Aktin durch den Cofilin1-KO kompensieren kann. In diesem Fall käme es zu einem starken Überwiegen der Polymerisation gegenüber der Depolymerisation.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der Cofilin1-KO zu einer Beeinträchtigung des Aktin-Tretmühlenmechanismus und somit der Aktindynamik führt. Die Vergrößerung der Wachstumskegel ist auf das Vorhandensein der stabilen Aktinfilamente, die nicht durch Cofilin1 abgebaut werden, und einem Ungleichgewicht an Polymerisierung zu Depolymerisierung zurückzuführen. Diese Defekte in Wachstumskegeln aufgrund des Cofilin1-Defizits bestätigen den hohen Stellenwert von Cofilin1 in der Neuronendifferenzierung (Bellenchi et al., 2017; Flynn et al., 2012).

### **4.3 Die Rolle von CAP1 in Wachstumskegeln**

Ein weiteres wichtiges Protein in der Regulation des Aktinzystoskeletts in Wachstumskegeln ist CAP1. Dabei hat CAP1 zwei wichtige Funktionen: Zum einen unterstützt es in Kooperation mit Cofilin1 die Depolymerisation von Aktinfilamenten und die anschließende Dissoziation von Cofilin1 vom Aktinmonomer (Kotila et al., 2019; Balcer et al., 2003). Zum anderen fördert es die Wiederherstellung von ATP-G-Aktin, welches für die Polymerisation von Aktin benötigt wird (Chaudhry et al., 2010; Ono 2013).

Im Gegensatz zu CAP2, bei dem die physiologische Funktion bisher gut untersucht wurde (Peche et al., 2012; Ono, 2013; Field et al., 2015; Kepser et al., 2019; Effendi et al., 2013), liegen zu CAP1 bisher nur wenige Studien in Säugetieren vor. Dies ist darauf

zurückzuführen, dass ein systemischer KO von CAP1 in Mäusen embryonal letal ist (Jang et al., 2020) und es bis vor einigen Jahren keine passenden Mausmodelle gab. Im Vergleich dazu konnte allerdings in anderen Modellorganismen wie *Drosophila* gezeigt werden, dass das CAP-Homolog Capulet wichtig für die Axonnavigation in der Embryonalphase ist (Wills et al., 2002).

Erst durch die Generierung eines gehirnspezifisch konditionellen CAP1-KOs in Mäusen, konnte gezeigt werden, dass CAP1 die neuronale Differenzierung sowie die Größe und Morphologie von Wachstumskegeln beeinflusst (Schneider et al., 2021a).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten ebenfalls, dass CAP1 eine wichtige Funktion in Wachstumskegeln und der Entwicklung des Nervensystems hat. Der KO von CAP1 führte erwartungsgemäß zu einer Störung der Aktindynamik und damit einhergehend zu einer vergrößerten Fläche der Wachstumskegel. Dies deckt sich gut mit den Ergebnissen in oben genannter Studie am CAP-Homolog Capulet der *Drosophila* (Wills et al., 2002) und den Daten, die aus Neuronen von CAP1<sup>flx/flx,Nestin-Cre</sup>-KO-Mäusen gewonnen wurden (Schneider et al., 2021a). Aufgrund der Funktionen von CAP1 können diese Ergebnisse durch zwei mögliche Mechanismen erklärt werden: Zum einen könnte durch den CAP1-KO der Verlust der Fähigkeit des Nukleotidaustausches nicht durch andere Proteine wie Profilin kompensiert werden, sodass ein Mangel an Polymerisations-kompetentem ATP-G-Aktin besteht.

Zum anderen kann weiterhin angenommen werden, dass die Unterstützung der Depolymerisation Cofilin1-markierter Aktinfilamente durch den CAP1-KO fehlt. Durch die verminderte Depolymerisation von F-Aktin und herabgesetzte Fähigkeit zur Dissoziation des Cofilin1 von G-Aktin stehen einerseits weniger Aktinmonomere und andererseits auch weniger Cofilin1 für die Förderung des Aktin-Tretmühlenmechanismus zur Verfügung.

Die Inaktivierung von CAP1 führt durch den Mangel an Polymerisations-kompetentem ATP-G-Aktin sowie der Akkumulation langer Aktinfilamente und Cofilin1-gebundenem G-Aktin zu einer verringerten Rate an Aktindynamik (Benlali et al., 2000; Balcer et al.,

2003; Quintero-Monzon et al., 2009), welches nicht für die Polymerisation zur Verfügung steht. Es ist zu vermuten, dass dies der Grund für die Vergrößerung der Wachstumskegel-Fläche ist.

Da die Aktindynamik und Größe der Wachstumskegel in CAP1- und Cofilin1-Einzel-KO-Zellen ähnlich reduzierte Werte aufwiesen, wird angenommen, dass CAP1 und Cofilin1 einen ähnlich hohen Stellenwert in der Regulation des Aktinzytoskeletts haben.

#### **4.4 Die Rolle der Interaktion von CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl CAP1 als auch Cofilin1 wichtig für die Regulation der Aktindynamik und Aufrechterhaltung der Größe von Wachstumskegeln sind. Da bekannt ist, dass CAP1 und Cofilin1 auf molekularer Ebene miteinander interagieren (Quintero-Monzon et al., 2009; Kotila et al., 2019), sollte im nächsten Schritt diese mögliche Interaktion in Wachstumskegeln näher untersucht werden. Hierfür wurden im ersten Schritt die Aktindynamik und Größe der Wachstumskegel in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich eine verringerte Aktindynamik und eine Vergrößerung der Fläche von Wachstumskegeln. Dies war zu erwarten, da die Einzel-KO-Zellen in dieser Studie schon ähnliche Beeinträchtigungen des Aktinumbaus und der Wachstumskegel-Größe aufwiesen.

Bezüglich der Aktindynamik zeigte sich in Doppel-KO-Zellen eine Reduktion der Aktindynamik, die ähnlich zu den Einzel-KO-Zellen war. Durch Inaktivierung von Cofilin1 ist die Störung der Aktindynamik durch fehlende Durchtrennung von Aktinfilamenten zu erklären. Folglich findet man weniger kurze, durchtrennte Aktinfilamente, an denen am Minus-Ende die Depolymerisation stattfinden kann. Aufgrund der verringerten Rate an Depolymerisation zeigt sich möglicherweise ein Mangel an Aktinmonomeren, die für eine erneute Polymerisation von F-Aktin benötigt wird (Dent et al., 2011). Durch die Inaktivierung von CAP1 ist zusätzlich der Nukleotidaustausch gestört, sodass nochmal weniger recyceltes G-Aktin für die Polymerisation zur Verfügung steht (Chaundhry et al., 2010; Ono 2013). Da bekannt ist, dass CAP1 die Depolymerisation Cofilin1-markierter Aktinfilamente fördert (Kotila et al., 2019; Rust et al., 2020), ist anzunehmen, dass durch

den gemeinsamen KO von CAP1 und Cofilin1 die Depolymerisation von F-Aktin am Minus-Ende gestört ist. Diese Störungen im Aktin-Tretmühlenmechanismus durch die Inaktivierung von CAP1 und Cofilin1 führen zu einer starken Reduktion der Aktindynamik, die sich in dieser Studie belegen ließ.

Neben der gestörten Aktindynamik zeigte sich in den CAP1/Cofilin1-Doppel-KO-Zellen eine Vergrößerung der Wachstumskegel-Fläche. Die Fläche der Wachstumskegel war ähnlich vergrößert wie in Einzel-KO-Zellen.

Schon nach alleinigem KO von CAP1 oder Cofilin1 war sowohl die Aktindynamik als auch die Regulation der Wachstumskegel-Größe anscheinend maximal gestört. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Aktindynamik und Wachstumskegel-Größe in Einzel- und Doppel-KO-Zellen. Diese Vermutung bestärkt die Annahme, dass die beiden ABPe CAP1 und Cofilin1 funktionell voneinander abhängig sind.

Um daher im nächsten Schritt zu überprüfen, ob die Interaktion zwischen CAP1 und Cofilin1 wichtig für die Aufrechterhaltung der Wachstumskegel-Größe ist, wurden beide Proteine einzeln oder zusammen in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen re-exprimiert. Hier zeigte sich, dass die ursprüngliche Größe der Wachstumskegel weder durch alleinige Überexpression von CAP1 noch durch alleinige Überexpression von Cofilin1 wiederherstellen ließ. Weder CAP1 allein noch Cofilin1 allein konnte den Verlust des jeweils anderen Proteins kompensieren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch Überexpression von Cofilin1 in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen die Durchtrennung von Aktinfilamenten durch Cofilin1 gefördert wird, anschließend aber eine kontinuierliche Bindung von G-Aktin mit Cofilin1 bestehen bleibt, da kein CAP1, welches die Dissoziation des Cofilin1 von G-Aktin fördert, vorhanden ist. Es bleibt weiterhin ein Mangel an Polymerisations-kompetentem G-Aktin. Dies beeinflusst den Aktin-Tretmühlenmechanismus negativ. Der fehlende Nukleotidaustausch von ADP-G-Aktin zu ATP-Aktin durch CAP1 verringert die Polymerisationsrate zusätzlich.

Ein möglicher Erklärungsansatz, warum die Überexpression von CAP1 in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen die ursprüngliche Wachstumskegel-Größe nicht wiederherstellen konnte,

besteht darin, dass CAP1 die Depolymerisation vor allem Cofilin1-markierter Aktinfilamente fördert (Kotila et al., 2019). Da Cofilin1 fehlt, werden die Aktinfilamente nicht für die Depolymerisation durch CAP1 markiert, sodass der Abbau von Aktinfilamenten herabgesetzt ist. Durch den Mangel an Cofilin1 ist weiterhin die Durchtrennung der Aktinfilamente beeinträchtigt. Der Aktinumbau ist somit gestört.

Da die alleinige Überexpression von CAP1 oder Cofilin1 in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen die ursprüngliche Wachstumskegel-Größe nicht wiederherstellen konnte, wurde die Hypothese, dass CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln miteinander interagieren und voneinander abhängige Funktionen aufweisen, weiter bestärkt. Es wurden im nächsten Schritt CAP1 und Cofilin1 gemeinsam in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen überexprimiert. Hier zeigte sich eine Normalisierung der Wachstumskegel-Größe. Dies bestätigt, dass das Vorhandensein von CAP1 und Cofilin1 unentbehrlich für die Aufrechterhaltung der Wachstumskegel-Größe ist und unterstützt nochmals die Vermutung einer synergistischen Funktion und Interaktion zwischen CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln.

Um die Hypothese, dass CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln miteinander interagieren, zu überprüfen, wurden verschiedene CAP1-Mutanten mit Cofilin1 in CAP1-Cofilin1-dKO-Zellen überexprimiert. Es wurde Cofilin1 mit einer CAP1-Mutante, bei der die HFD fehlend bzw. nicht funktionsfähig war, in dKO-Zellen überexprimiert. Hier zeigte sich keine Wiederherstellung der Wachstumskegel-Fläche. Dies bestätigt, dass die voneinander abhängige Interaktion von CAP1 und Cofilin1 über die HFD (Kotila et al., 2019) essenziell für die Aufrechterhaltung der Wachstumskegel-Größe ist.

Weiterhin zeigte sich in der Überexpression von Cofilin1 mit einer CAP1-Mutante, bei der die CARP-Domäne fehlend bzw. nicht funktionsfähig war, ebenfalls keine Normalisierung der Wachstumskegel-Fläche. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass auch der Nukleotidaustausch von ADP-G-Aktin zu ATP-G-Aktin für die Regulation des Aktin-Tretmühlenmechanismus und somit der Aufrechterhaltung der Wachstumskegelfläche eine zentrale Rolle spielt. Dieses Ergebnis steht in Diskrepanz zu zuvor durchgeführten

Experimenten am hirnspezifischen CAP1-KO-Mausmodell. Hier konnte nach Überexpression einer CAP1-Mutante, die keine funktionsfähige CAP-Domäne besitzt, die Größe der Wachstumskegel der hippocampalen Neurone wiederhergestellt werden. In der Studie wurde somit postuliert, dass der Nukleotidaustausch für die Aufrechterhaltung der Wachstumskegel-Größe entbehrlich ist. (Schneider et al., 2021a).

Dieser Widerspruch in der Rolle des Nukleotidaustausches von CAP1 könnte darauf zurückzuführen sein, dass beim CAP1<sup>flx/flx,Nestin-Cre</sup>-KO-Mausmodell, bei dem CAP1 gehirnspezifisch während der gesamten Embryonalentwicklung bereits nicht exprimiert wird, im Verlauf der Entwicklung Anpassungsvorgänge der Aktindynamik erfolgt sind, die das Fehlen des Nukleotidaustausches durch CAP1 kompensieren konnten. Beispielsweise könnte vermutet werden, dass das Expressionslevel von Profilin gesteigert wurde.

In dieser vorliegenden Arbeit ist die Zeit zwischen Transfektion und Analyse der Wachstumskegel im Vergleich zur Arbeit mit dem CAP1<sup>flx/flx,Nestin-Cre</sup>-KO-Mausmodell sehr kurz. Es kann vermutet werden, dass Anpassungsvorgänge, die die fehlende Nukleotidaustausch-Fähigkeit von CAP1 kompensieren könnten, noch nicht ausreichend erfolgt sind.

Ferner wurde in dieser Studie die Bedeutung von CAP2, welches auch im Gehirn exprimiert wird, in Wachstumskegeln untersucht. Während sich CAP1 (474 Aminosäuren) und CAP2 (476 Aminosäuren) in der Anzahl ihrer Aminosäuren und ihrer Lokalisation unterscheiden, zeigen sie Gemeinsamkeiten in ihren Domänen und Funktionen (Ono, 2013; Rust et al., 2020).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass CAP2 mit Cofilin1 interagiert (Kumar et al., 2016). Diese Interaktion ist wichtig für die synaptische Plastizität des Nervensystems (Pelucchi et al., 2020b). Ein KO von CAP2 führt zur Anreicherung von dephosphoryliertem und somit aktiviertem Cofilin1. Des Weiteren ist eine Akkumulation von aggregiertem Cofilin1 zu beobachten, welches beispielsweise eine wichtige Rolle in neurologischen

Erkrankungen wie Morbus Alzheimer spielt (Kumar et al., 2016; Pelucchi et al., 2020a; Pelucchi et al., 2020b).

Es wurde daher in dieser Arbeit weiterhin untersucht, ob CAP2 die fehlende Funktion von CAP1 kompensieren kann. Hierfür wurden CAP2 und Cofilin1 in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen überexprimiert. Dies konnte die Größe der Wachstumskegel jedoch nicht normalisieren. Da die Überexpression von Cofilin1 mit CAP1 die ursprüngliche Fläche der Wachstumskegel in den dKO-Zellen wiederherstellen konnte, ist anzunehmen, dass CAP2 die fehlende Funktion von CAP1 in diesem Fall nicht kompensieren kann und somit eine geringere Bedeutung in der Regulation der Größe von Wachstumskegeln hat. Dies deckt sich mit der bisherigen Erkenntnis, dass CAP1 die relevantere Isoform in der frühen Hirnentwicklung ist. Während CAP2 in der frühen Hirnentwicklung entbehrlich ist, führt der KO von CAP1 zu Veränderungen in der Anatomie des sich entwickelnden Gehirns und neuronalen Verbindungen (Schneider et al., 2021a; Schneider et al., 2021c).

Zusammenfassend bestätigen die Daten dieser Studie den hohen Stellenwert von Cofilin1 (Bellenchi et al., 2007) und den ebenso vergleichbar hohen Stellenwert von CAP1 (Schneider et al., 2021a) in der Funktion von Wachstumskegeln. Es konnte gezeigt werden, dass beide Proteine und deren Interaktion über die HFD essenziell für die Aufrechterhaltung der Aktindynamik in Wachstumskegeln und deren Größe sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die CARP-Domäne von CAP1, welche den Nukleotidaustausch von ADP-Aktin fördert, wichtig in der Regulation der Wachstumskegel-Fläche ist. Eine weitere wichtige Erkenntnis aus dieser Studie ist, dass CAP2 bei einem akuten CAP1/Cofilin1-dKO die Funktion von CAP1 in der Aufrechterhaltung der Größe von Wachstumskegeln nicht ersetzen kann.

#### 4.5 Ausblick

Diese Studie soll das Wissen und Verständnis über die Funktion von Cofilin1 und CAP1 als wichtige ABPe in Wachstumskegeln erweitern und die physiologische Relevanz eines bisher nur durch *in vitro*-Analysen postulierten molekularen Mechanismus belegen. Jedoch bleiben weiterhin noch viele offene Fragen, unter anderem bezüglich der Funktion und Interaktion von CAP1 und Cofilin1 in Wachstumskegeln. Nachdem bekannt ist, dass CAP1 und Cofilin1 wichtig für die Aktinregulation in Wachstumskegeln sind, ergeben sich als Ausblick neue Arbeitsansätze zur Aufklärung weiterer Details zur Funktion des Aktinzytoskeletts und der Bedeutung von CAP1 und Cofilin1. So sollte beispielsweise in zukünftigen Studien die Bedeutung der Kooperation von CAP1 und Cofilin1 in der neuronalen Differenzierung und auch in der Axonavigation untersucht werden. Über Einordnung sich entwickelnder Neurone in die jeweiligen Entwicklungsstadien (Dotti et al., 1988) können durch Vergleich mit der Kontrollkondition Aussagen getroffen werden, ob und inwieweit die Neuronendifferenzierung durch die gemeinsame Inaktivierung von CAP1 und Cofilin1 beeinträchtigt ist. Experimente mit Zugabe von attraktiven oder repulsiven Signalstoffen auf die Wachstumskegel können zeigen, ob die Wachstumskegel in CAP1/Cofilin1-dKO-Zellen in der Lage sind, adäquat auf äußere Umweltsignale zu reagieren und die Axonmigration regelrecht durchzuführen.

Ebenfalls muss noch geklärt werden, ob CAP1 mit weiteren ABPen interagiert und inwiefern eine mögliche Interaktion zur Koordination des Aktinzytoskeletts und zur physiologischen Relevanz beiträgt. Hier kann zum Beispiel ein experimenteller Ansatz ähnlich dieser Studie angewendet werden, bei dem nach Transfektion und erneutem Ausplattieren die Aktindynamik und Wachstumskegel-Größe dieser KO-Zellen untersucht wird. Interessant wäre beispielsweise die Interaktion von CAP1 mit Profilin näher zu untersuchen, da beide ABPe die Fähigkeit des Nukleotidaustausches von ADP- zu ATP-G-Aktin besitzen (Ono, 2013; Baum et al., 2006). Eine weitere, offene Frage bezieht sich auf das Expressionslevel von Profilin in CAP1-KO-Zellen. Hier könnte man



vermuten, dass die Expression von Profilin, als Versuch die Funktion des Nukleotidaustausches von CAP1 zu kompensieren, hochreguliert wird.

Weiterhin ist im Vergleich zu Cofilin1 (Omotade et al., 2017; Munoz-Lasso et al., 2020; Dent et al., 2011) wenig über die Regulation von CAP1 bekannt. So ist bisher nur bekannt, dass CAP1 über Phosphorylierung reguliert wird und die Glykogen-Synthase-Kinase 3 dabei beteiligt ist (Zhou et al., 2014b; Wu et al., 2019). Weitere Erkenntnisse über Signalwege, die die Funktion und Aktivität von CAP1 koordinieren, sind hier wünschenswert.

Neuere Studien haben zudem gezeigt, dass ADF/Cofilin zur Axonregeneration nach traumatischer Schädigung des zentralen Nervensystems beiträgt (Tedeschi et al., 2019). Hier stellt sich die Frage, welche Rolle CAP1 in der Axonregeneration differenzierter Neurone einnimmt. Da zumindest in dieser Arbeit die Interaktion von CAP1 und Cofilin1 belegt werden konnte, wäre es nicht unwahrscheinlich, dass auch in differenzierten Neuronen eine Interaktion dieser beiden ABPe stattfindet. Eine Interaktion zwischen CAP2 und Cofilin1 wäre in diesem Fall auch denkbar, da CAP2 im adulten Nervensystem wichtiger zu sein scheint als in der frühen Hirnentwicklung (Kumar et al., 2016; Pelucchi et al., 2020b; Schneider et al., 2021c).

Es wird deutlich, dass noch viele Untersuchungen nötig sind, um die Mechanismen der Aktindynamikregulation in Wachstumskegeln komplett zu verstehen. Ein besseres Verständnis über die Funktionsweise von ABPen in Wachstumskegeln ist jedoch unerlässlich, um Aktin-abhängige Pathologien, die durch Dysregulation von ABPen entstehen (Ramakers, 2002; Engle, 2010; Lian und Sheen; 2015; Bamburg und Bernstein 2016; Effendi et al., 2013), zu verstehen und neue Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten zu schaffen.

## 5. Zusammenfassung

Ein essenzieller Schritt in der Entwicklung des Nervensystems ist die Axonmigration, bei der Axone zu ihrem jeweiligen spezifischen Ziel wandern, um dort synaptische Verknüpfungen herzustellen. Gesteuert wird diese Wanderung durch den Wachstumskegel, welche aktinreiche Vorwölbungen an der Spitze von Axonen sind. Wachstumskegel können in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen ihre Struktur und Bewegungsrichtung ändern. Gesteuert wird dieses durch den dynamischen Umbau des Aktinzytoskeletts. Der kontinuierliche Auf- und Abbau von Aktinfilamenten, welcher auch Aktin-Tretmühlenmechanismus genannt wird, wird durch Aktin-bindende Proteine reguliert.

Zwei wichtige Aktin-bindende Proteine sind das Cyclase-assoziierte Protein 1 und Cofilin 1. Cofilin 1 beschleunigt den Aktin-Tretmühlenmechanismus über die Durchtrennung und Depolymerisation von Aktinfilamenten. Das Cyclase-assoziierte Protein 1 fördert die Aktindynamik, indem es die Depolymerisation und Dissoziation des Cofilin 1 von globulärem Aktin beschleunigt und Adenosintriphosphat-G-Aktin wiederherstellt. Es ist auch bekannt, dass das Cyclase-assoziierte Protein 1 und Cofilin 1 synergistisch kooperieren, indem das Cyclase-assoziierte Protein 1 die Depolymerisation Cofilin 1-markierter Aktinfilamente fördert. Dennoch ist das Wissen über das Cyclase-assoziierte Protein 1 und Cofilin 1 in Wachstumskegeln noch nicht vollständig erforscht.

Daher sollte in dieser Arbeit die Bedeutung vom Cyclase-assoziierten Protein 1 und Cofilin 1 und deren Interaktion in Wachstumskegeln näher untersucht werden. Sowohl der Einzel-Knockout vom Cyclase-assoziierten Protein 1 oder von Cofilin 1 als auch der Doppelknockout vom Cyclase-assoziierten Protein 1 und Cofilin 1 zusammen führten in dieser Studie zu einer Reduktion der Aktindynamik und einer Vergrößerung der Wachstumskegel-Fläche. Diese Ergebnisse lassen sich am ehesten dadurch erklären, dass der Knockout vom Cyclase-assoziierten Protein 1 und/oder Cofilin 1 zu einer Störung des Aktin-Tretmühlenmechanismus führt. Durch Stabilisierung der Aktinfilamente und die Akkumulation von Cofilin1-G-Aktin-Komplexen ist die Fläche der Wachstumskegel vergrößert.

Die Überexpression vom Cyclase-assoziierten Protein 1 und Cofilin 1 in den Doppel-Knockout-Zellen führte zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Größe der Wachstumskegel. Dass eine Überexpression von Cofilin 1 und einer Cyclase-assoziierten Protein 1-Mutante, bei der keine Interaktion mit Cofilin 1 möglich war, die Fläche der Wachstumskegel nicht normalisieren konnte, bestätigt die Wichtigkeit der Interaktion dieser beiden Proteine in der Aufrechterhaltung der Größe von Wachstumskegeln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Cyclase-assoziierten Protein 1 und Cofilin 1 sowie deren Interaktion eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Aktindynamik in Wachstumskegeln haben. Dieser Beleg für die physiologische Relevanz der Interaktion der beiden ABPe soll das Wissen über die Mechanismen der Aktindynamikregulation erweitern, um Aktin-abhängige Krankheitsbilder besser verstehen zu können.

## 6. Summary

An essential step in the development of the nervous system is a process called axon migration, in which axons migrate to their specific target to establish synaptic connections. This migration is controlled by growth cones, which are actin-rich dilated structures at the tip of axons. Growth cones change their structure and direction of movement in response to extracellular signals by re-arranging the actin cytoskeleton. This continuous assembly and disassembly of actin filaments, which is also called actin treadmilling, is regulated by actin-binding proteins.

Two important actin-binding proteins are the cyclase-associated protein 1 and cofilin 1. Cofilin 1 accelerates the actin treadmilling by severing and depolymerisation of actin filaments. Cyclase-associated protein 1 promotes actin dynamics by accelerating depolymerisation and the dissociation of cofilin 1 from globular actin and restoring adenosine triphosphate-G-actin. It is also known that cyclase-associated protein 1 and cofilin 1 cooperate synergistically: cyclase-associated protein 1 promotes depolymerization of cofilin 1-decorated actin filaments. However, the knowledge about cyclase-associated protein 1 and cofilin 1 in growth cones is not yet fully understood.

Therefore, this work investigated the role of cyclase-associated protein 1 and cofilin 1 in growth cones. In this study, the single knockout of cyclase-associated protein 1 or cofilin1 as well as the double-knockout of cyclase-associated protein 1 and cofilin 1 led to a reduction of actin dynamics and an increase of the growth cone area. These results can most likely be explained by the fact that the knockout of cyclase-associated protein 1 and/or cofilin 1 leads to a disturbance of the actin treadmilling. Due to the predominance of actin filament stabilization and the accumulation of cofilin 1-G-actin-complexes, the growth cone area is increased.

Overexpression of cyclase-associated protein 1 and cofilin 1 in double knockout cells led to a rescue of the original growth cone size. But overexpression of cofilin 1 and a cyclase-associated protein 1-mutant, which cannot interact with cofilin 1, failed in rescuing the

growth cone area. That confirms the central importance of the interaction of these two proteins in maintaining the growth cone area.

In summary, cyclase-associated protein 1 and cofilin 1 and their interaction play a central role in the regulation of actin dynamics in growth cones. This evidence for the physiological relevance of the interaction of those two ABPs should increase our knowledge of the mechanisms of actin dynamics for a better understanding of actin-dependent pathologies.

## 7. Literaturverzeichnis

Abe, H.; Obinata, T.; Minamide, L. S.; Bamburg, J. R. (1996): *Xenopus laevis* actin-depolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development. In: *The Journal of cell biology* 132 (5), S. 871–885. DOI: 10.1083/jcb.132.5.871.

Andrianantoandro, Ernesto; Pollard, Thomas D. (2006): Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. In: *Molecular cell* 24 (1), S. 13–23. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.08.006.

Balcer, Heath I.; Goodman, Anya L.; Rodal, Avital A.; Smith, Ellen; Kugler, Jamie; Heuser, John E.; Goode, Bruce L. (2003): Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. In: *Current biology : CB* 13 (24), S. 2159–2169. DOI: 10.1016/j.cub.2003.11.051.

Bamburg, J. R. (1999): Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. In: *Annual review of cell and developmental biology* 15, S. 185–230. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.185.

Bamburg, James R.; Bernstein, Barbara W. (2016): Actin dynamics and cofilin-actin rods in alzheimer disease. In: *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 73 (9), S. 477–497. DOI: 10.1002/cm.21282.

Bamburg, J. R.; Bray, D. (1987): Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. In: *The Journal of cell biology* 105 (6 Pt 1), S. 2817–2825. DOI: 10.1083/jcb.105.6.2817.

Baum, Jake; Papenfuss, Anthony T.; Baum, Buzz; Speed, Terence P.; Cowman, Alan F. (2006): Regulation of apicomplexan actin-based motility. In: *Nature reviews. Microbiology* 4 (8), S. 621–628. DOI: 10.1038/nrmicro1465.

Bellenchi, Gian Carlo; Gurniak, Christine B.; Perlas, Emerald; Middei, Silvia; Ammassari-Teule, Martine; Witke, Walter (2007): N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. In: *Genes & development* 21 (18), S. 2347–2357. DOI: 10.1101/gad.434307.

Benlali, Aude; Draskovic, Irena; Hazelett, Dennis J.; Treisman, Jessica E. (2000): act up Controls Actin Polymerization to Alter Cell Shape and Restrict Hedgehog Signaling in the Drosophila Eye Disc. In: *Cell* 101 (3), S. 271–281. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80837-5.

Bernstein, Barbara W.; Bamburg, James R. (2010): ADF/cofilin: a functional node in cell biology. In: *Trends in cell biology* 20 (4), S. 187–195. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.01.001.

Biswas, Sayantane; Kalil, Katherine (2018): The Microtubule-Associated Protein Tau Mediates the Organization of Microtubules and Their Dynamic Exploration of Actin-Rich Lamellipodia and Filopodia of Cortical Growth Cones. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 38 (2), S. 291–307. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2281-17.2017.

Blanchoin, L.; Pollard, T. D. (1999): Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (22), S. 15538–15546. DOI: 10.1074/jbc.274.22.15538.

Blanquie, Oriane; Bradke, Frank (2018): Cytoskeleton dynamics in axon regeneration. In: *Current opinion in neurobiology* 51, S. 60–69. DOI: 10.1016/j.conb.2018.02.024.

- Bradke, F.; Dotti, C. G. (1999): The role of local actin instability in axon formation. In: *Science (New York, N.Y.)* 283 (5409), S. 1931–1934. DOI: 10.1126/science.283.5409.1931.
- Burke, Amy C.; Dron, Jacqueline S.; Hegele, Robert A.; Huff, Murray W. (2017): PCSK9: Regulation and Target for Drug Development for Dyslipidemia. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 57, S. 223–244. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010716-104944.
- Carlier, M. F.; Laurent, V.; Santolini, J.; Melki, R.; Didry, D.; Xia, G. X. et al. (1997): Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. In: *The Journal of cell biology* 136 (6), S. 1307–1322. DOI: 10.1083/jcb.136.6.1307.
- Case, Lindsay B.; Waterman, Clare M. (2015): Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch. In: *Nature cell biology* 17 (8), S. 955–963. DOI: 10.1038/ncb3191.
- Chan, A. Y.; Bailly, M.; Zebda, N.; Segall, J. E.; Condeelis, J. S. (2000): Role of cofilin in epidermal growth factor-stimulated actin polymerization and lamellipod protrusion. In: *The Journal of cell biology* 148 (3), S. 531–542. DOI: 10.1083/jcb.148.3.531.
- Chaudhry, Faisal; Little, Kristin; Talarico, Lou; Quintero-Monzon, Omar; Goode, Bruce L. (2010): A central role for the WH2 domain of Srv2/CAP in recharging actin monomers to drive actin turnover in vitro and in vivo. In: *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (2), S. 120–133. DOI: 10.1002/cm.20429.
- da Silva, Jorge Santos; Dotti, Carlos G. (2002): Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. In: *Nature reviews. Neuroscience* 3 (9), S. 694–704. DOI: 10.1038/nrn918.
- Dent, Erik W.; Gupton, Stephanie L.; Gertler, Frank B. (2011): The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (3). DOI: 10.1101/cshperspect.a001800.
- Dodatko, Tetyana; Fedorov, Alexander A.; Grynberg, Marcin; Patskovsky, Yury; Rozwarski, Denise A.; Jaroszewski, Lukasz et al. (2004): Crystal structure of the actin binding domain of the cyclase-associated protein. In: *Biochemistry* 43 (33), S. 10628–10641. DOI: 10.1021/bi049071r.
- Dominguez, Roberto; Holmes, Kenneth C. (2011): Actin structure and function. In: *Annual review of biophysics* 40, S. 169–186. DOI: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.
- Dotti, C. G.; Sullivan, C. A.; Banker, G. A. (1988): The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. In: *J. Neurosci.* 8 (4), S. 1454–1468. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988.
- Effendi, Kathryn; Yamazaki, Ken; Mori, Taisuke; Masugi, Yohei; Makino, Shinji; Sakamoto, Michiie (2013): Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression. In: *Experimental cell research* 319 (1), S. 35–44. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.09.013.
- Egger, M. D.; Petr an, M. (1967): New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 157 (3786), S. 305–307. DOI: 10.1126/science.157.3786.305.

- Engle, Elizabeth C. (2010): Human genetic disorders of axon guidance. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (3), a001784. DOI: 10.1101/cshperspect.a001784.
- Enni Bertling,\* Pirta Hotulainen,\* Pieta K. Mattila,\* Tanja Matilainen,† Marjo Salminen,† and Pekka Lappalainen\*‡ (2004): Cyclase-associated Protein 1 (CAP1) Promotes Cofilin-induced Actin Dynamics in Mammalian Nonmuscle Cells□V. In: *molecular biology of the cell*.
- Fedor-Chaiken, Mary; Deschenes, Robert J.; Broach, James R. (1990): SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast. In: *Cell* 61 (2), S. 329–340. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90813-T.
- Field, J.; Vojtek, A.; Ballester, R.; Bolger, G.; Colicelli, J.; Ferguson, K. et al. (1990): Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein. In: *Cell* 61 (2), S. 319–327. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90812-S.
- Field, Jeffrey; Ye, Diana Z.; Shinde, Manasi; Liu, Fang; Schillinger, Kurt J.; Lu, MinMin et al. (2015): CAP2 in cardiac conduction, sudden cardiac death and eye development. In: *Scientific reports* 5, S. 17256. DOI: 10.1038/srep17256.
- Flynn, Kevin C.; Hellal, Farida; Neukirchen, Dorothee; Jacob, Sonja; Tahirovic, Sabina; Dupraz, Sebastian et al. (2012): ADF/cofilin-mediated actin retrograde flow directs neurite formation in the developing brain. In: *Neuron* 76 (6), S. 1091–1107. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.09.038.
- Freeman, N. L.; Chen, Z.; Horenstein, J.; Weber, A.; Field, J. (1995): An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (10), S. 5680–5685. DOI: 10.1074/jbc.270.10.5680.
- Gasperini, Robert J.; Pavez, Macarena; Thompson, Adrian C.; Mitchell, Camilla B.; Hardy, Holly; Young, Kaylene M. et al. (2017): How does calcium interact with the cytoskeleton to regulate growth cone motility during axon pathfinding? In: *Molecular and cellular neurosciences* 84, S. 29–35. DOI: 10.1016/j.mcn.2017.07.006.
- Gomez, Timothy M.; Letourneau, Paul C. (2014): Actin dynamics in growth cone motility and navigation. In: *Journal of neurochemistry* 129 (2), S. 221–234. DOI: 10.1111/jnc.12506.
- Gungabissoon, Ravine A.; Bamburg, James R. (2003): Regulation of growth cone actin dynamics by ADF/cofilin. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51 (4), S. 411–420. DOI: 10.1177/002215540305100402.
- Gurniak, Christine B.; Perlas, Emerald; Witke, Walter (2005): The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. In: *Developmental biology* 278 (1), S. 231–241. DOI: 10.1016/j.ydbio.2004.11.010.
- Heinze, Anika; Schuldt, Cara; Khudayberdiev, Sharof; van Bommel, Bas; Hacker, Daniela; Schulz, Toni G. et al. (2022): Functional interdependence of the actin regulators CAP1 and cofilin1 in control of dendritic spine morphology. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 79 (11), S. 558. DOI: 10.1007/s00018-022-04593-8.
- Hsieh, Sidney H-K; Ferraro, Gino B.; Fournier, Alyson E. (2006): Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase. In: *J. Neurosci.* 26 (3), S. 1006–1015. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2806-05.2006.



- Hylton, Ryan K.; Heebner, Jessica E.; Grillo, Michael A.; Swulius, Matthew T. (2022): Cofilactin filaments regulate filopodial structure and dynamics in neuronal growth cones. In: *Nature communications* 13 (1), S. 2439. DOI: 10.1038/s41467-022-30116-x.
- Jang, Hyun-Duk; Lee, Sang Eun; Yang, Jimin; Lee, Hyun-Chae; Shin, Dasom; Lee, Hwan et al. (2019): Cyclase-associated protein 1 is a binding partner of proprotein convertase subtilisin/kexin type-9 and is required for the degradation of low-density lipoprotein receptors by proprotein convertase subtilisin/kexin type-9. In: *European heart journal* 41 (2), S. 239–252. DOI: 10.1093/eurheartj/ehz566.
- Kakurina, G. V.; Kolegova, E. S.; Kondakova, I. V. (2018): Adenylyl Cyclase-Associated Protein 1: Structure, Regulation, and Participation in Cellular Processes. In: *Biochemistry. Biokhimiia* 83 (1), S. 45–53. DOI: 10.1134/S0006297918010066.
- Kamiguchi Hiroyuki (2003): The mechanism of axon growth. In: *Molecular Neurobiology*.
- Kepser, Lara-Jane; Damar, Fidan; Cicco, Teresa de; Chaponnier, Christine; Prószyński, Tomasz J.; Pagenstecher, Axel; Rust, Marco B. (2019): CAP2 deficiency delays myofibril actin cytoskeleton differentiation and disturbs skeletal muscle architecture and function. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (17), S. 8397–8402. DOI: 10.1073/pnas.1813351116.
- Koch, Daniel; Rosoff, William J.; Jiang, Jiji; Geller, Herbert M.; Urbach, Jeffrey S. (2012): Strength in the periphery: growth cone biomechanics and substrate rigidity response in peripheral and central nervous system neurons. In: *Biophysical journal* 102 (3), S. 452–460. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.025.
- Kotila, Tommi; Kogan, Konstantin; Enkavi, Giray; Guo, Siyang; Vattulainen, Ilpo; Goode, Bruce L.; Lappalainen, Pekka (2018): Structural basis of actin monomer re-charging by cyclase-associated protein. In: *Nature communications* 9 (1), S. 1892. DOI: 10.1038/s41467-018-04231-7.
- Kotila, Tommi; Wioland, Hugo; Enkavi, Giray; Kogan, Konstantin; Vattulainen, Ilpo; Jégou, Antoine et al. (2019): Mechanism of synergistic actin filament pointed end depolymerization by cyclase-associated protein and cofilin. In: *Nature communications* 10 (1), S. 5320. DOI: 10.1038/s41467-019-13213-2.
- Kullmann, Jan A.; Trivedi, Niraj; Howell, Danielle; Laumonnerie, Christophe; Nguyen, Vien; Banerjee, Shalini S. et al. (2020): Oxygen Tension and the VHL-Hif1 $\alpha$  Pathway Determine Onset of Neuronal Polarization and Cerebellar Germinal Zone Exit. In: *Neuron* 106 (4), 607–623.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.02.025.
- Kumar, Atul; Paeger, Lars; Kosmas, Kosmas; Kloppenburg, Peter; Noegel, Angelika A.; Peche, Vivek S. (2016): Neuronal Actin Dynamics, Spine Density and Neuronal Dendritic Complexity Are Regulated by CAP2. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 10, S. 180. DOI: 10.3389/fncel.2016.00180.
- Lappalainen, P.; Drubin, D. G. (1997): Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. In: *Nature* 388 (6637), S. 78–82. DOI: 10.1038/40418.
- Letourneau, Paul C. (2009): Actin in axons: stable scaffolds and dynamic filaments. In: *Results and problems in cell differentiation* 48, S. 65–90. DOI: 10.1007/400\_2009\_15.

- Lian, Gewei; Sheen, Volney L. (2015): Cytoskeletal proteins in cortical development and disease: actin associated proteins in periventricular heterotopia. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 9, S. 99. DOI: 10.3389/fncel.2015.00099.
- Lin CH; Espreafico EM; Mooseker MS; Forscher P. (1996): Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. In: *Neuron*.
- Lin, Chi-Hung; Forscher, Paul (1995): Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. In: *Neuron* 14 (4), S. 763–771. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90220-1.
- Lowery, Laura Anne; van Vactor, David (2009): The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (5), S. 332–343. DOI: 10.1038/nrm2679.
- Luo, Liqun (2002): Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. In: *Annual review of cell and developmental biology* 18, S. 601–635. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.18.031802.150501.
- Makkonen, Maarit; Bertling, Enni; Chebotareva, Natalia A.; Baum, Jake; Lappalainen, Pekka (2013): Mammalian and malaria parasite cyclase-associated proteins catalyze nucleotide exchange on G-actin through a conserved mechanism. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (2), S. 984–994. DOI: 10.1074/jbc.M112.435719.
- Medeiros, Nelson A.; Burnette, Dylan T.; Forscher, Paul (2006): Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. In: *Nature cell biology* 8 (3), S. 215–226. DOI: 10.1038/ncb1367.
- Meyvis, T. K.; Smedt, S. C. de; van Oostveldt, P.; Demeester, J. (1999): Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research. In: *Pharmaceutical research* 16 (8), S. 1153–1162. DOI: 10.1023/a:1011924909138.
- Mitchison, T.; Kirschner, M. (1988): Cytoskeletal dynamics and nerve growth. In: *Neuron* 1 (9), S. 761–772. DOI: 10.1016/0896-6273(88)90124-9.
- Moradi, Mehri; Sivadasan, Rajeeve; Saal, Lena; Lüningschrör, Patrick; Dombert, Benjamin; Rathod, Reena Jagdish et al. (2017): Differential roles of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -actin in axon growth and collateral branch formation in motoneurons. In: *The Journal of cell biology* 216 (3), S. 793–814. DOI: 10.1083/jcb.201604117.
- Muñoz-Lasso, Diana C.; Romá-Mateo, Carlos; Pallardó, Federico V.; Gonzalez-Cabo, Pilar (2020): Much More Than a Scaffold: Cytoskeletal Proteins in Neurological Disorders. In: *Cells* 9 (2). DOI: 10.3390/cells9020358.
- Nichol, Robert H.; Hagen, Kate M.; Lombard, Derek C.; Dent, Erik W.; Gómez, Timothy M. (2016): Guidance of Axons by Local Coupling of Retrograde Flow to Point Contact Adhesions. In: *J. Neurosci.* 36 (7), S. 2267–2282. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2645-15.2016.
- Niftullayev, Sadig; Lamarche-Vane, Nathalie (2019): Regulators of Rho GTPases in the Nervous System: Molecular Implication in Axon Guidance and Neurological Disorders. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6). DOI: 10.3390/ijms20061497.

- Omotade, Omotola F.; Pollitt, Stephanie L.; Zheng, James Q. (2017): Actin-based growth cone motility and guidance. In: *Molecular and cellular neurosciences* 84, S. 4–10. DOI: 10.1016/j.mcn.2017.03.001.
- Ono, Shoichiro (2013): The role of cyclase-associated protein in regulating actin filament dynamics - more than a monomer-sequestration factor. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 15), S. 3249–3258. DOI: 10.1242/jcs.128231.
- Patsialou, Antonia; Wang, Yarong; Lin, Juan; Whitney, Kathleen; Goswami, Sumanta; Kenny, Paraic A.; Condeelis, John S. (2012): Selective gene-expression profiling of migratory tumor cells in vivo predicts clinical outcome in breast cancer patients. In: *Breast cancer research : BCR* 14 (5), R139. DOI: 10.1186/bcr3344.
- Peche, Vivek S.; Holak, Tad A.; Burgute, Bhagyashri D.; Kosmas, Kosmas; Kale, Sushant P.; Wunderlich, F. Thomas et al. (2012): Ablation of cyclase-associated protein 2 (CAP2) leads to cardiomyopathy. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (3), S. 527–543. DOI: 10.1007/s00018-012-1142-y.
- Peche, V.; Shekar, S.; Leichter, M.; Korte, H.; Schröder, R.; Schleicher, M. et al. (2007): CAP2, cyclase-associated protein 2, is a dual compartment protein. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (19-20), S. 2702–2715. DOI: 10.1007/s00018-007-7316-3.
- Pelucchi, Silvia; Stringhi, Ramona; Marcello, Elena (2020): Dendritic Spines in Alzheimer's Disease: How the Actin Cytoskeleton Contributes to Synaptic Failure. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3). DOI: 10.3390/ijms21030908.
- Pelucchi, Silvia; Vandermeulen, Lina; Pizzamiglio, Lara; Aksan, Bahar; Yan, Jing; Konietzny, Anja et al. (2020): CAP2 dimerization regulates cofilin in synaptic plasticity and Alzheimer's disease. In: *Brain Communications*, Artikel fcaa086. DOI: 10.1093/braincomms/fcaa086.
- Piper, Michael; Anderson, Richard; Dwivedy, Asha; Weinl, Christine; van Horck, Francis; Leung, Kin Mei et al. (2006): Signaling mechanisms underlying Slit2-induced collapse of *Xenopus* retinal growth cones. In: *Neuron* 49 (2), S. 215–228. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.12.008.
- Quinn, Christopher C.; Wadsworth, William G. (2008): Axon guidance: asymmetric signaling orients polarized outgrowth. In: *Trends in cell biology* 18 (12), S. 597–603. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.09.005.
- Quintero-Monzon, Omar; Jonasson, Erin M.; Bertling, Enni; Talarico, Lou; Chaudhry, Faisal; Sihvo, Maarit et al. (2009): Reconstitution and dissection of the 600-kDa Srv2/CAP complex: roles for oligomerization and cofilin-actin binding in driving actin turnover. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (16), S. 10923–10934. DOI: 10.1074/jbc.M808760200.
- Ramakers, Ger J.A. (2002): Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. In: *Trends in neurosciences* 25 (4), S. 191–199. DOI: 10.1016/s0166-2236(00)02118-4.
- Ramón y Cajal, S. (1909): *Histologie du System Nerveux de l'Homme et des Vertebres*.
- Revenu, Céline; Athman, Rafika; Robine, Sylvie; Louvard, Daniel (2004): The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (8), S. 635–646. DOI: 10.1038/nrm1437.

- Rust, Marco B. (2015): ADF/cofilin: a crucial regulator of synapse physiology and behavior. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (18), S. 3521–3529. DOI: 10.1007/s00018-015-1941-z.
- Rust, Marco B.; Khudayberdiev, Sharof; Pelucchi, Silvia; Marcello, Elena (2020): CAPt'n of Actin Dynamics: Recent Advances in the Molecular, Developmental and Physiological Functions of Cyclase-Associated Protein (CAP). In: *Front. Cell Dev. Biol.* 8, Artikel 586631. DOI: 10.3389/fcell.2020.586631.
- Rust, Marco B.; Marcello, Elena (2022): Disease association of cyclase-associated protein (CAP): Lessons from gene-targeted mice and human genetic studies. In: *European journal of cell biology* 101 (2), S. 151207. DOI: 10.1016/j.ejcb.2022.151207.
- Rust, Marco B.; Michaelsen-Preusse, Kristin (2016): Form follows function: actin-binding proteins as critical regulators of excitatory synapses. In: *e-Neuroforum* 7 (1), S. 7–12. DOI: 10.1007/s13295-015-0019-6.
- Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schneider, Felix; Duong, Thuy-An; Metz, Isabell; Winkelmeier, Jannik; Hübner, Christian A.; Endesfelder, Ulrike; Rust, Marco B. (2021): Mutual functional dependence of cyclase-associated protein 1 (CAP1) and cofilin1 in neuronal actin dynamics and growth cone function. In: *Progress in neurobiology* 202, S. 102050. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2021.102050.
- Schneider, Felix; Duong, Thuy-An; Rust, Marco B. (2021): Neuron Replating, a Powerful and Versatile Approach to Study Early Aspects of Neuron Differentiation. In: *eNeuro* 8 (3). DOI: 10.1523/ENEURO.0536-20.2021.
- Schneider, Felix; Metz, Isabell; Khudayberdiev, Sharof; Rust, Marco B. (2021): Functional Redundancy of Cyclase-Associated Proteins CAP1 and CAP2 in Differentiating Neurons. In: *Cells* 10 (6). DOI: 10.3390/cells10061525.
- Schneider, Felix; Metz, Isabell; Rust, Marco B. (2022): Regulation of actin filament assembly and disassembly in growth cone motility and axon guidance. In: *Brain research bulletin* 192, S. 21–35. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2022.10.019.
- Shibata, Rie; Mori, Taisuke; Du, Wenlin; Chuma, Makoto; Gotoh, Masahiro; Shimazu, Motohide et al. (2006): Overexpression of cyclase-associated protein 2 in multistage hepatocarcinogenesis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (18), S. 5363–5368. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2245.
- Suter, D. M.; Forscher, P. (2000): Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. In: *Journal of neurobiology* 44 (2), S. 97–113.
- Swiston, John; Hubberstey, Andrew; Yu, Gang; Young, Dallan (1995): Differential expression of CAP and CAP2 in adult rat tissues. In: *Gene* 165 (2), S. 273–277. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00522-8.
- Tamariz, Elisa; Varela-Echavarría, Alfredo (2015): The discovery of the growth cone and its influence on the study of axon guidance. In: *Frontiers in neuroanatomy* 9, S. 51. DOI: 10.3389/fnana.2015.00051.

- Tanaka, Elly; Sabry, James (1995): Making the Connection: Cytoskeletal Rearrangements during Growth Cone Guidance. In: *Cell*.
- Tedeschi, Andrea; Dupraz, Sebastian; Curcio, Michele; Laskowski, Claudia J.; Schaffran, Barbara; Flynn, Kevin C. et al. (2019): ADF/Cofilin-Mediated Actin Turnover Promotes Axon Regeneration in the Adult CNS. In: *Neuron* 103 (6), 1073-1085.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.07.007.
- Tessier-Lavigne, M.; Goodman, C. S. (1996): The molecular biology of axon guidance. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (5290), S. 1123–1133. DOI: 10.1126/science.274.5290.1123.
- van Battum, Eljo Y.; Brignani, Sara; Pasterkamp, R. Jeroen (2015): Axon guidance proteins in neurological disorders. In: *The Lancet Neurology* 14 (5), S. 532–546. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70257-1.
- Vitriol, Eric A.; McMillen, Laura M.; Kapustina, Maryna; Gomez, Shawn M.; Vavylonis, Dimitrios; Zheng, James Q. (2015): Two functionally distinct sources of actin monomers supply the leading edge of lamellipodia. In: *Cell reports* 11 (3), S. 433–445. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.03.033.
- Vitriol, Eric A.; Zheng, James Q. (2012): Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. In: *Neuron* 73 (6), S. 1068–1081. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.03.005.
- Wang, Wei; Rai, Asit; Hur, Eun-Mi; Smilansky, Zeev; Chang, Karen T.; Min, Kyung-Tai (2016): DSCR1 is required for both axonal growth cone extension and steering. In: *The Journal of cell biology* 213 (4), S. 451–462. DOI: 10.1083/jcb.201510107.
- Wills, Zachary; Emerson, Mark; Rusch, Jannette; Bikoff, Jay; Baum, Buzz; Perrimon, Norbert; van Vactor, David (2002): A Drosophila Homolog of Cyclase-Associated Proteins Collaborates with the Abl Tyrosine Kinase to Control Midline Axon Pathfinding. In: *Neuron* 36 (4), S. 611–622. DOI: 10.1016/s0896-6273(02)01022-x.
- Wu, Huhehasi; Hasan, Rokib; Zhang, Haitao; Gray, Joshua; Williams, Dominic; Miller, Morgan et al. (2019): Phosphorylation Regulates CAP1 (Cyclase-Associated Protein 1) Functions in the Motility and Invasion of Pancreatic Cancer Cells. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 4925. DOI: 10.1038/s41598-019-41346-3.
- Yamazaki, Ken; Takamura, Masaaki; Masugi, Yohei; Mori, Taisuke; Du, Wenlin; Hibi, Taizo et al. (2009): Adenylate cyclase-associated protein 1 overexpressed in pancreatic cancers is involved in cancer cell motility. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89 (4), S. 425–432. DOI: 10.1038/labinvest.2009.5.
- Ye, Xiyue; Qiu, Yan; Gao, Yuqing; Wan, Dong; Zhu, Huifeng (2019): A Subtle Network Mediating Axon Guidance: Intrinsic Dynamic Structure of Growth Cone, Attractive and Repulsive Molecular Cues, and the Intermediate Role of Signaling Pathways. In: *Neural plasticity* 2019, S. 1719829. DOI: 10.1155/2019/1719829.
- Yu, G.; Swiston, J.; Young, D. (1994): Comparison of human CAP and CAP2, homologs of the yeast adenylyl cyclase-associated proteins. In: *Journal of cell science* 107 (Pt 6), S. 1671–1678. DOI: 10.1242/jcs.107.6.1671.

Zhou, Guo-Lei; Zhang, Haitao; Field, Jeffrey (2014): Mammalian CAP (Cyclase-associated protein) in the world of cell migration: Roles in actin filament dynamics and beyond. In: *Cell adhesion & migration* 8 (1), S. 55–59. DOI: 10.4161/cam.27479.

Zhou, Guo-Lei; Zhang, Haitao; Wu, Huhehasi; Ghai, Pooja; Field, Jeffrey (2014): Phosphorylation of the cytoskeletal protein CAP1 controls its association with cofilin and actin. In: *Journal of cell science* 127 (Pt 23), S. 5052–5065. DOI: 10.1242/jcs.156059.

## 8. Verzeichnis der akademischen Lehrer/innen

Adamkiewicz	Günther	Moll
Bartsch	Haug	Müller
Bauer	Hertl	Neubauer
Becker	Hildebrandt	Neumüller
Becker	Hoch	Nimsky
Bender	Homberg	Oberwinkler
Bette	Hoyer	Oliver
Bösner	Jansen	Opitz
Breder	Jerrentrup	Pagenstecher
Brehm	Josephs	Peterlein
Brückner	Kann	Pfützner
Cetin	Kanngießer	Plant
Chung	Keller	Preisig-Müller
Cramer	Kerwat	Reese
Czubayko	Kinscherf	Renz
Daut	Kircher	Riera-Knorrenschild
Decher	Kruse	Ruchholz
Del Rey	Kühnert	Rust
Denkert	Leonhardt	Sahmland
Dettmeyer	Lill	Schäfer
Donner-Banzhoff	Lohoff	Schartel-Hartick
Feuser	Mahnken	Schieffer
Forstner	Maier	Schratt
Fritz	Maisner	Schu
Geraedts	Mey	Schulze

Verzeichnis der akademischen Lehrer/innen

Schumacher

Steiniger

Weber

Schütz

Stuck

Westermann

Seifart

Thieme

Wilhelm

Seitz

Timmermann

Worzfeld

Sekundo

Ulrich

Wrocklage

Sevinc

Vogelmeier

Wulf

Sommer

Vogt

Stahl

Weber



## 9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marco Rust: für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe absolvieren und an diesem spannenden Projekt mitwirken zu dürfen. Auch möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und die von mir sehr geschätzte fachliche Expertise bedanken. Es war eine schöne und vor allem sehr lehrreiche Zeit für mich, die viel zu meinem Wissenszuwachs und meiner persönlichen Weiterentwicklung beigetragen hat.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Pagenstecher: für die Zeit, die er sich genommen hat, um meine Arbeit zu begutachten und zu bewerten.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. rer. nat. Felix Schneider, ehemaliger Doktorand am Institut für Physiologische Chemie: für die exzellente Betreuung und Unterstützung, auf die ich immer zählen konnte. Seine wertvollen Tipps bereicherten meine Arbeit maßgeblich.

In diesem Zuge möchte ich mich beim gesamten Team der AG Rust für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken.

Für die emotionale Unterstützung, Motivation und das Interesse an meiner Arbeit bedanke ich mich herzlichst bei meiner lieben Familie und meinen Freundinnen und Freunden.

Mein herzlichster Dank gilt Fabian Kötz: für den Rückhalt in allen Lebenslagen, die motivierenden Worte und den unerschütterlichen Glauben an meine Arbeit und mich.