

**Charakterisierung eines Bindungspartners von CHL1 und
Analyse der Morphologie und des Verhaltens bei CHL1-
defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-
doppeldefizienten Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch

die Fakultät der Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl. Psych. Alexandra Heyden

geb. am 02.07.1975

Gutachter: PD Dr. Constanze Seidenbecher
Prof. Dr. Fritz Rathjen

Eingereicht am: 25. 04 2008

Verteidigung am: 02.12.2008

Danksagung

PD Dr. Dirk Montag danke ich für die Vergabe der vielseitigen Projekte und seine Betreuung.

PD Dr. Constanze Seidenbecher danke ich für die Unterstützung bei der Veröffentlichung des Manuskripts aus dieser Arbeit, wodurch die Eröffnung des Promotionsverfahrens ermöglicht wurde.

Dr. Monique Sallaz danke ich für die Einführung in die in situ Hybridisierung und das Interesse an meiner Arbeit.

Dr. Frank Angenstein danke ich für die MRT-Aufnahmen.

Dr. Karl-Heinz Smalla und Kathrin Pohlmann danke ich für die Unterstützung bei der 2D-Gelelektrophorese.

Karla Sowa möchte ich für die Unterstützung bei der Mausezucht und den Verhaltensexperimenten danken.

Annelika Reichel danke ich für ihre technische Unterstützung im Labor.

Den Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie und Molekularbiologie möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit, ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima danken.

Phillip Grote und meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung.

Magdeburg, den 25.04.2008

.....
Alexandra Heyden

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	2
1.1 Entwicklung neuronaler Strukturen	2
1.2 Neurale Zellerkennungsmoleküle	3
1.3 Immunglobulin-Superfamilie	4
1.3.1 N-CAM	4
1.4 Die L1-Familie	6
1.4.1 Klinische Relevanz der L1-Familie	7
1.4.2 Alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen	8
1.4.3 Ligandenbindungen	9
1.4.4 Expressionsmuster	11
1.4.5 Analyse von Nullmutanten	12
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Lösungen	17
2.3 Bakterien und Hefe-Nährmedien	17
2.4 Vektoren	18
2.5 Kits und Enzyme	18
2.6 Antikörper	19
2.7 Tiere	19
2.8 Molekularbiologische Techniken	20
2.8.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese, Elution und Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.8.3 Genotypisierung	21
2.8.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien und Transformation	21
2.8.5 Plasmid-DNA-Präparation (Mini- und Maxipräparation)	22
2.8.6 PolyA ⁺ -RNA-Präparation und reverse Transkription	22
2.8.7 Screen von cDNA-Banken und Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	23
2.8.8 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	23
2.9 Hefe- Zwei –Hybrid System	24
2.9.1 Klonierung von Bait- und Prey- Konstrukten	24
2.9.2 Herstellung chemisch kompetenter Hefen und Transformation	24
2.10 Proteinbiochemische Methoden	25
2.10.1 Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein	25
2.10.2 Herstellung von Peptidantikörpern	25
2.10.3 Homogenisierung von Hirngewebe und subzelluläre Fraktionierung	26
2.10.4 Proteinbestimmung mit der Amidoschwarz-Methode	26
2.10.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.10.6 Western-Blotting und Immundetektion	27
2.10.7 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese und massenspektroskopische Analyse	28
von Peptiden	28
2.11 Zellkultur	29
2.11.1 Kultivierung und transiente Transfektion von COS-7-Zellen	29
2.11.2 Immuncytochemie	29

2.12 Morphologische und histologische Methoden	30
2.12.1 Messung der Ventrikelgröße mittels Magnet Resonanz Tomographie (MRT)	30
2.12.2 In situ Hybridisierung (ISH)	30
2.12.3 Perfusion	32
2.12.4 Größenmessungen am Cerebellum	32
2.12.5 Kresylviolett-Färbung	33
2.12.6 Neutralrotfärbung	34
2.12.7 Timms-Färbung	34
2.12.8 Immunhistochemie	35
2.12.9 Mikroskopie	36
2.13 Verhaltenstests	36
2.13.1 Akustische Schreckreaktion und Präpuls-Inhibition	36
2.13.2 Rota-Rod	37
2.14. Statistische Auswertungen	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Interaktionspartner von CHL1: CHL1-23	38
3.1.1 Datenbankanalyse von CHL1-23	38
3.1.2 Screen einer cDNA Bank, RT-PCR und RACE	42
3.1.3 Expression von CHL1-23 mRNA während der Entwicklung	44
3.1.4 Interaktion im Hefe-Zwei-Hybridsystem	47
3.1.5 Transfektion von COS-7 Zellen	48
3.1.6 Erzeugung von Peptidantikörpern gegen CHL1-23	49
3.1.7 Zwei-dimensionale Auftrennung von Proteinen und massenspektrometrische Analyse	52
3.2 Morphologische Veränderungen bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen: Proteinexpression und axonale Wegfindung, ventrikuläres System und Cerebellum	54
3.2.1 Expression von CHL1 und NrCAM im Hippocampus und olfaktorischem Bulbus	54
3.2.2 Hippocampale Moosfaserprojektionen	58
3.2.3 Projektionen primärer olfaktorischer sensorischer Neurone	62
3.2.4 Größe des ventrikulären Systems	63
3.2.5 Größe des Kleinhirnwurms	69
3.3 Verhaltenstests bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen: Präpuls-Inhibition und Rota-Rod	73
3.3.1 Präpuls-Inhibition	73
3.3.2 Rota-Rod	76
4. Diskussion	77
5. Literatur	97
Abkürzungen	114
Anhang	116
Lebenslauf	117
Veröffentlichungen	118

Zusammenfassung

Neurale Zellerkennungsmoleküle vermitteln zelluläre Kontakte während der Entwicklung und im ausgereiften Nervensystem. Die L1-Familie der Zellerkennungsmoleküle ist eine Subfamilie der Immunglobulin-Superfamilie und umfasst vier transmembrane Mitglieder bei Säugetieren: L1, CHL1, NrCAM und Neurofascin. Diese Moleküle modulieren zelluläre Vorgänge wie Migration, axonale Wegfindung und synaptische Plastizität und nehmen dadurch Einfluss auf Lernen und Gedächtnisbildung. Mutationen der Gene der L1-Familie sind mit schwerwiegenden neuropsychiatrischen Erkrankungen assoziiert.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Funktionen von CHL1 und NrCAM auf verschiedenen Ebenen. Die Ligandenbindungen des zuletzt identifizierten transmembranen Mitglieds der L1-Familie, CHL1, sind bisher noch wenig untersucht. Daher ist in dieser Arbeit ein Bindungspartner von CHL1 weiter charakterisiert worden. Da wesentliche Eigenschaften dieses Bindungspartners wie die vollständige Genstruktur und cDNA Sequenz nicht gezeigt werden konnten, besteht die Notwendigkeit weiterer Experimente.

Um spezifische Funktion von CHL1 und NrCAM *in vivo* zu untersuchen, erfolgte ein direkter Vergleich von CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen. Die Projektionen hippocampaler Moosfasern und der olfaktorischen sensorischen Axone sind im Zusammenhang mit der Proteinexpression dieser Moleküle untersucht worden. Zusätzlich wurde die Größenausprägung des ventrikulären Systems und des cerebellaren Vermis untersucht. Auf der Verhaltensebene erfolgte ein Vergleich der Einzel- und Doppelmutanten bezüglich der Motorkoordination und der akustischen Reizfilterung.

Im Gegensatz zu CHL1-defizienten Mäusen weisen NrCAM-defiziente Mäuse keine Fehlprojektionen hippocampaler Moosfasern auf, zeigen aber, ähnlich wie CHL1-defiziente Mäuse, Fehlprojektionen der olfaktorischen Axone. Die axonalen Fehlprojektionen der Doppelmutanten spiegeln die Abweichungen der Einzelmutanten wieder. Die Proteinexpression der beiden Moleküle lässt vermuten, dass CHL1 als Rezeptor auf den einwachsenden olfaktorischen Axonen die Wegfindung dieser Fasern steuert, während NrCAM möglicherweise durch seine repulsive Wirkung die Wegfindung dieser Axone optimiert. CHL1-defiziente Mäuse zeigen eine Vergrößerung der lateralen und des dritten Ventrikels, während NrCAM-defiziente Mäuse eine Verkleinerung dieser Ventrikel und eine Erweiterung des vierten Ventrikels aufweisen. Die Größen der lateralen und des dritten Ventrikels der Doppelmutanten waren mit den Wildtypmäusen vergleichbar. Die Erweiterung des vierten Ventrikels blieb bei den Doppelmutanten erhalten und korrelierte mit einer Verkleinerung des cerebellaren Vermis bei den NrCAM-defizienten Mäusen und den Doppelmutanten. Zusätzlich zeigten alle Mutanten ein spezifisches Muster an Größenveränderungen einzelner cerebellarer Lobuli des Vermis. Der Rota-Rod-Test zur Messung der Motorkoordination und die Präpuls-Inhibition zur Erfassung der akustischen Reizfilterung ließ keine Abweichungen bei den Einzel- und Doppelmutanten erkennen.

Zusammenfassend zeigt die Untersuchung der mutanten Mäuse sowohl überlappende als auch spezifische Funktionen von CHL1 und NrCAM bei der axonalen Wegfindung und der Größenausprägung morphologischer Strukturen ohne eine Verstärkung der Phänotypen bei den Doppelmutanten. Größenveränderungen des ventrikulären Systems und des cerebellaren Vermis der Doppelmutanten weisen auf teilweise gegenläufige Funktionen dieser Moleküle hin. Die Motorkoordination und die Reizfilterung war bei den mutanten Mäusen nicht verändert.

1. Einleitung

1.1 Entwicklung neuraler Strukturen

Das Nervensystem ist der Gegenstand zahlreicher neurowissenschaftlicher Fragestellungen und die Grundlage für Lernen und Gedächtnis. Bei der Induktion neuraler Gewebe von Vertebraten geht aus dem Ektoderm die Neuralplatte hervor, die in Neuralrohr und Neuralleiste differenziert. Während die Zellen der Neuralleiste wesentlich zum Aufbau des peripheren Nervensystems beitragen, geht das zentrale Nervensystem aus den Zellen des Neuralrohrs hervor. Die rostrale Spitze des Neuralrohrs entwickelt sich zum Gehirn und aus den übrigen Teilen des Neuralrohrs entsteht das Rückenmark. Das Lumen des Neuralrohrs bildet die Anlage des Zentralkanals und des Ventrikelsystems. Fortlaufende Regionalisierungsprozesse entlang der Körperachsen bilden weitere Strukturen des Nervensystems und spezifizieren ihre Identität. Fein abgestimmte zeitlich ineinander greifende Prozesse wie Proliferation, Migration, zelluläre Differenzierung und Apoptose bestimmen die Histogenese dieser Regionen. Postmitotische Neurone und einige proliferative Neuroblasten migrieren vom Ort ihrer Entstehung zu ihren Zielgebieten und noch vor Abschluss der Neurogenese beginnt die Genese glialer Zellen (Übersichtsartikel: Hatten, 1999; Lagercrantz and Ringstedt, 2001). Während der neuronalen Differenzierung senden neu entstandene Neurone ihre Axone in die vorgesehenen Zielgebiete aus und auswachsende Dendriten verzweigen sich. Über synaptische Kontakte entstehen neuronale Schaltkreise, die in Abhängigkeit von ihrer Aktivität komplexe neuronale Netzwerke ausbilden. Dieser Reifungsprozess führt zur Elimination überschüssiger synaptischer Kontakte und der Apoptose der im Kampf um Wachstumsfaktoren unterlegenen Neuronen. Auch im adulten Nervensystem findet in der Subventrikulärzone und in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus eine lebenslange Bildung von Nervenzellen statt, die in die bestehenden Verschaltungen integriert werden (Übersichtsartikel: Lledo et al., 2006). Strukturelle und funktionelle Plastizität neuraler Systeme ist die Voraussetzung für Lernen und Gedächtnisbildung. Während die Ausbildung einiger Strukturen und Fertigkeiten wesentlich von der Entwicklung innerhalb kritischer Perioden bestimmt wird, bewerkstelligen eine Vielzahl anderer plastizitätsbedingter Vorgänge die kontinuierliche Anpassung eines Organismus an die Umgebung (Übersichtsartikel: Waites et al., 2005).

1.2 Neurale Zellerkennungsmoleküle

Die Kommunikation zwischen Zellen ist für die Funktion aller mehrzelligen Organismen von entscheidender Bedeutung. Wie auch in anderen Geweben bestimmen im Nervensystem zeitlich und räumlich genau abgestimmte Zellinteraktionen über Induktion, Differenzierung und Erhalt neuraler Strukturen. Zellerkennungsmoleküle regulieren ein breites Spektrum dieser Interaktionen während der Entwicklung und im reifen Nervensystem. Das komplexe Bindungsverhalten dieser Moleküle mit benachbarten Zellen und der Extrazellulärmatrix (ECM) induziert intrazelluläre Signalwege, die z.B. Veränderungen des Cytoskeletts oder der Genregulation in den beteiligten Zellen bewirken. Daher ist der Übergang zwischen Zellerkennung und Signalübertragung fließend (Übersichtsartikel: Loers and Schachner, 2007; Maness and Schachner, 2007). Bis heute ist eine umfangreiche Zahl von Zellerkennungsmolekülen identifiziert worden. Einige von ihnen wie Cadherine, Integrine, Mitglieder der Immunoglobulin-Superfamilie, Rezeptor Tyrosin Kinasen und Phosphatasen und einige Semaphorine sind hauptsächlich Transmembranproteine oder über Glykosylphosphatidylinositol mit der Zelloberfläche verbunden, während andere Moleküle wie Proteoglykane, Laminine, Kollagene und Tenascine vorwiegend Bestandteile der ECM sind. Zellerkennungsmoleküle können sowohl homophile Interaktionen als auch heterophile Interaktionen mit Molekülen derselben Molekülfamilie oder anderer Molekülfamilien eingehen (Übersichtsartikel: Loers and Schachner, 2007). Ursprünglich und teilweise auch bis heute als Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) bezeichnet, wurde die Existenz solcher Moleküle erstmals infolge von Experimenten postuliert, bei denen man die Aggregatbildung gleichartiger Zelltypen adhäsionsvermittelnden Molekülen an der Zelloberfläche zuschrieb (Wilson 1907). Die Identifikation der ersten dieser Moleküle erfolgte durch Inhibitionsstudien mit Antikörpern, die die Reaggregation dissoziierter Gewebe verhinderten (Townes 1955). Durch weiterführende Experimente konnten diesen Molekülen sowohl adhäsive als auch repulsive Eigenschaften zugeschrieben werden, wie der allgemein gehaltene Ausdruck „Zellerkennungsmolekül“ verdeutlichen soll. Adhäsive und repulsive Eigenschaften werden durch Zellkontakte oder chemische Gradienten vermittelt und nehmen Einfluss auf Vorgänge wie Migration, axonale Wegfindung, Faszikulierung und Synapsenbildung (Übersichtsartikel: Maness and Schachner, 2007). Da diese Arbeit von Zellerkennungsmolekülen der Immunoglobulin-Superfamilie handelt, wird diese Familie im Folgenden näher beschrieben.

1.3 Immunglobulin-Superfamilie

Zellerkennungsmoleküle können auch anhand ihrer Proteindomänen entsprechenden Subfamilien zugeordnet werden. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) sind durch mindestens eine Ig-ähnliche Domäne gekennzeichnet (Übersichtsartikel: Brummendorf and Rathjen, 1993). Dieses Strukturmotiv ist erstmals bei Antikörpern (Immunglobulinen) des Immunsystems beschrieben worden und deutet auf einen gemeinsamen Ursprung von Immunglobulinen und Ig-ähnlichen Domänen in ihrer Funktion, spezifische Zellerkennung zu vermitteln, hin (Übersichtsartikel: Edelman 1989). Auf die N-terminal lokalisierten Ig-Domänen folgen teilweise Fibronectin-Typ-III-ähnliche (FNIII) Domänen. Trotz deutlicher Unterschiede in der Primärstruktur, weisen sowohl Ig- als auch FNIII-Domänen eine β -Faltblatt Struktur und eine sehr ähnliche Tertiärstruktur auf. Moleküle der Ig-Superfamilie sind entweder durch Transmembrandomänen oder über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) mit der Zellmembran verbunden. Die Domänenstruktur einzelner Mitglieder ist in der Evolution hoch konserviert und weist auf die Existenz einiger IgCAMs noch vor der Trennung von Arthropoden und Chordaten hin (Zhao and Hortsch, 1998). Durch Genduplikationen während der Evolution sind verschiedene Genfamilien entstanden. Alternatives Spleißing, posttranslationale Modifikationen und eine entwicklungsabhängige Regulation erhöhen weiterhin die Vielfalt möglicher Strukturen und Funktionen dieser Moleküle wie an N-CAM beispielhaft aufgezeigt werden kann.

1.3.1 N-CAM

N-CAM gehört zu der Familie der neuralen IgCAMs und ist das erste im Nervensystem identifizierte Zellerkennungsmolekül. Die extrazelluläre Domäne enthält fünf Ig-Domänen und zwei FNIII-Domänen. Durch alternatives Spleissen entstehen hauptsächlich drei Isoformen, die aufgrund ihres Molekulargewichts als N-CAM180, N-CAM140 und N-CAM120 bezeichnet werden. Diese Isoformen unterscheiden sich nur in der Größe ihrer intrazellulären Domäne und der Membranverankerung. Während N-CAM180 und N-CAM140 Transmembranproteine sind, ist N-CAM120 über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden (Gennarini et al., 1984a; Gennarini et al., 1984b). Die N-CAM-Expression beginnt während der frühen Embryonalentwicklung und wird zelltypspezifisch und entwicklungspezifisch verschieden reguliert. Fast alle postmitotischen Neurone,

Schwanzzellen, Oligodendrozyten und Astrozyten exprimieren N-CAM. Während N-CAM180 hauptsächlich von Neuronen exprimiert wird, ist die N-CAM140-Expression sowohl neuronal als auch glial und die N-CAM120-Expression hauptsächlich glial (Übersichtsartikel: Maness and Schachner, 2007). Zusätzliche Modifikationen von N-CAM werden durch alternatives Spleissing der mRNA erzeugt, die zum Einsatz zusätzlicher Aminosäuren in die extrazelluläre Domäne oder zur Freisetzung der extrazellulären Domäne durch proteolytisches Abspalten führen (Small et al., 1988; Small and Akeson, 1990; Barthels et al., 1992; Lahrtz et al., 1997; Hinkle et al., 2006). Die Modifikationen von N-CAM während der Entwicklung begleiten auch die funktionellen Eigenschaften dieser Moleküle. Früh in der Entwicklung wird die stark negativ geladene Polysialinsäure (PSA) der fünften Ig-Domäne von N-CAM angefügt. Die Größe und die negative Ladung von PSA vermindert die durch N-CAM vermittelte Zelladhäsion und fördert dynamische Prozesse wie Migration, axonales Wachstum und synaptische Plastizität (Bruses and Rutishauser, 2001; Demyanenko et al., 2004). Das Anfügen von PSA wird von den zwei Enzymen ST8Sia-II und ST8Sia-IV reguliert, die zeit- und gewebespezifisch verschieden exprimiert sind. ST8Sia-II kommt hauptsächlich in der Embryonalentwicklung und in frühen postnatalen Stadien vor, während ST8Sia-IV bis in adulte Stadien exprimiert ist. Die Analyse transgener Mäuse gibt Aufschluss über die spezifische funktionelle Bedeutung der Modifikation dieser Moleküle. Gegenüber N-CAM-defizienten Mäusen, bei denen die Wanderung von Neuroblasten im rostralen migratorischen Strom, die Moosfaserbündelung und die Langzeitpotenzierung im Hippocampus gestört ist, weisen ST8Sia-IV-defiziente Mäuse nur eine abweichende hippocampale Moosfaserbündelung und ST8Sia-IV-defiziente Mäuse nur eine Veränderung der Langzeitpotenzierung auf. ST8Sia-II/ST8Sia-IV-doppeldefiziente Mäuse überleben nur zu einem geringen Prozentsatz die ersten postnatalen Wochen und zeigen im Vergleich zu N-CAM-defizienten Mäusen zusätzliche Defekte, die jedoch in den entsprechenden dreifachdefizienten Mäusen nicht mehr nachzuweisen sind (Cremer et al., 1997; Eckhardt et al., 2000; Angata et al., 2004; Weinhold et al., 2005). Diese Experimente zeigen, dass die Polysialisierung von N-CAM dazu dient, die Effekte von N-CAM zu maskieren und die N-CAM-vermittelten Zellkontakte zeitlich und räumlich zu organisieren. Da Störungen wie die Migration der Neuroblasten und die Moosfaserbündelung unabhängig von der N-CAM-Defizienz auftreten (Ono et al., 1994; Angata et al., 2004), weist dieses auf eine Funktion von PSA auf eine über die bloße Maskierung von N-CAM hinausgehende stereochemische Regulierung der angemessenen Zellkontakte hin. Die Bedeutung der präzisen Regulation von N-CAM wird auch durch die ektopische Expression der extrazellulären löslichen Form von

N-CAM belegt. Der Ersatz der membranständigen Form von N-CAM durch die sezernierte extrazelluläre Domäne von N-CAM ist dominant embryonal letal. Die Überexpression von sezerniertem N-CAM in einem konditionalen Mausmodell in späten Stadien der neuronalen Entwicklung führte zu Abweichungen, die auch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen beobachtet werden können (Rabinowitz et al., 1996; Pillai-Nair et al., 2005; Hinkle et al., 2006).

Die Expression von PSA-N-CAM in späteren Stadien nach der Stabilisierung synaptischer Kontakte nimmt insgesamt ab und bleibt hauptsächlich nur in Regionen permanent erhöhter struktureller und funktioneller Plastizität wie Hippocampus, rostraler migratorischer Strom und Hypophyse erhalten (Theodosis et al., 1991; Seki and Arai, 1993; Lois et al., 1996). Eine erhöhte Polysialisierung von N-CAM180 konnte auch während der Akquisition und Konsolidierung bestimmter Lernparadigmen beobachtet werden, während eine stress-induzierte verringerte Lernleistung mit der Abnahme von PSA-NCAM in Verbindung gebracht wird (Ronn et al., 2000; Sandi et al., 2005; Van der Borght et al., 2005).

Die Modifikationen von N-CAM verdeutlichen, wie ein Zellerkennungsmolekül die Regulation vielfältiger Funktionen beeinflussen kann. Eine weitere Möglichkeit die strukturelle und funktionelle Vielfalt zu erweitern, entsteht durch Genduplikationen während der Evolution und kann anhand Entwicklung der L1 Familie der IgCAMs verfolgt werden.

1.4 Die L1-Familie

Die L1-Familie ist eine Subfamilie der Ig-CAMs und zeichnet sich durch einen ähnlichen strukturellen Bauplan aus. Alle Mitglieder der Familie weisen extrazellulär sechs Ig-Domänen und vier bis fünf FN-III Domänen auf, eine Transmembrandomäne und eine kurze intrazelluläre Domäne. Aufgrund von Sequenzvergleichen werden in der Arbeit von Holm et al. (1996) auch die Mitglieder der F3/F11/Contactin-Familie in die L1-Familie mit einbezogen. Die Mitglieder dieser Subfamilie weisen neben einer homologen Anordnung der extrazellulären Proteindomänen eine GPI-Verankerung mit der Zellmembran auf (Holm et al., 1996). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die transmembranen Mitglieder der L1-Familie. Phylogenetische Analysen unterstützen die Ansicht, dass die Entwicklung der L1-Familie auf einen gemeinsamen Vorläufer dieser Familie zurückzuführen ist und sich im Verlauf der Evolution als Anpassung auf immer komplexere Systeme durch Genduplikationen multiple Homologe herausgebildet haben (Übersichtsartikel: Hortsch, 1996, 2000).

Entsprechend dieser Annahme wurde bei Invertebraten nur ein Vertreter dieser Familie in *Caenorhabditis elegans* (LAD-1) (Chen et al., 2001) und in *Drosophila Melanogaster* (Neuroglian) (Bieber et al., 1989) gefunden, während bei den Vertebraten die Telostei zwei Vertreter dieser Familie aufweisen (L1.1 und L1.2) (Tongiorgi et al., 1995). In Säugetieren sind bereits vier Vertreter gefunden worden: L1, CHL1, NrCAM, Neurofascin (Rathjen and Schachner, 1984; Rathjen et al., 1987; Grumet et al., 1991; Holm et al., 1996).

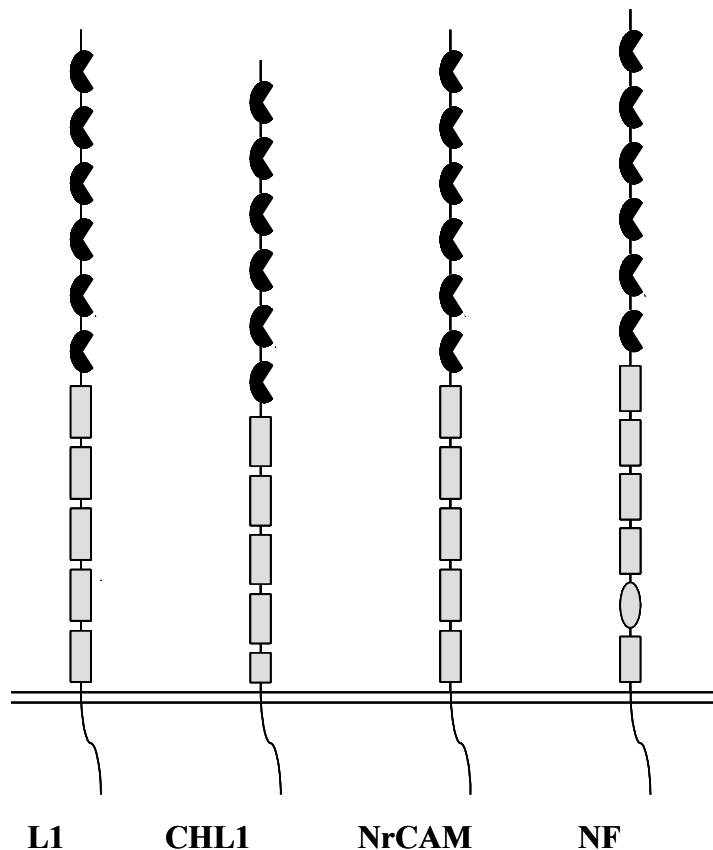


Abb. 1: Struktur der L1-Familienmitglieder

Mitglieder der L1-Familie weisen sechs Ig-Domänen (schwarz), vier bis fünf Fibronectin-Domänen (grau), eine Transmembrandomäne und eine kurze intrazelluläre Domäne (geschwungene Linie) von etwa 100 Aminosäuren auf. Neurofascin enthält außerdem zwischen der vierten und fünften Fibronectin-Domäne eine Prolin-, Alanin- und Threonin-reiche Domäne (PAT-Domäne, oval).

1.4.1 Klinische Relevanz der L1-Familie

Mutationen der L1-Familie stehen mit schwerwiegenden neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen im Zusammenhang. Über 70 verschiedene Mutationen des L1 Gens führen zu einem komplexen Syndrom, das als CRASH bezeichnet wird (Übersichtsartikel: Fransen.,

1997). Die prägendsten Symptome dieser sehr variabel ausgebildeten Erkrankung betreffen Spastiken der unteren Gliedmassen, mentale Retardation, Hydrocephalus und Fehlhaltung der Daumen. Polymorphismen von L1 sind mit Schizophrenie assoziiert (Kurumaji et al., 2001). Der Verlust des distalen Arms von Chromosom drei, auf dem *CHL1* lokalisiert ist, verursacht das 3-p Syndrom. Diese Erkrankung ist ebenfalls durch mentale Retardation und verzögerte motorische Entwicklung charakterisiert (Angeloni et al., 1999b; Frints et al., 2003). Weitere Mutationen werden mit Intelligenz und der Erkrankung an Schizophrenie in Verbindung gebracht (Angeloni et al., 1999a; Sakurai et al., 2002; Chen et al., 2005). Mutationen von *NrCAM* sind mit Zwangsstörungen, Autismus und Substanzabhängigkeit assoziiert und die Veränderung der Expression von Neurofascin geht verschiedenen Stadien der Entzündung und Demyelinisierung bei multipler Sklerose voraus (Petek et al., 2001; Bonora et al., 2005; Maier et al., 2005; Howell et al., 2006; Sakurai et al., 2006). Für die Entwicklung von Therapiemaßnahmen sind genaue Kenntnisse der zugrunde liegenden Mechanismen wünschenswert, die durch funktionelle Untersuchung dieser Moleküle in vitro und in vivo erweitert wird.

1.4.2 Alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen

Alternatives Spleissen ist eine zusätzliche Möglichkeit, ein Molekül in seiner Struktur und Funktion zu verändern. Obwohl die Mitglieder der L1-Familie auf genomischer Ebene und der Proteinebene hoch konserviert sind, können durch Spleissen Veränderungen der Intron/Exon Anordnung festgestellt werden (Zhao and Hortsch, 1998; Dry et al., 2001). Für L1 ist nur das Spleissen der Exone 2 und 27 beschrieben, während bei *NrCAM* und Neurofascin komplexere Spleissvorgänge gezeigt worden sind (Hassel et al., 1997; Coutelle et al., 1998; Dry et al., 2001). Die so entstandenen Isoformen können unterschiedlich exprimiert werden und verschiedenen Affinitäten zu extra- und intrazellulären Liganden aufweisen, wodurch sich ihre Funktionsweise verändert. Die längere der beiden beschriebenen L1 Isoformen wird beispielsweise nur in Neuronen gefunden, während die kürzere Isoform entwicklungsabhängig auch in Gliazellen exprimiert wird (Takeda et al., 1996; De Angelis et al., 2001; Jacob et al., 2002). Weitere Veränderungen der Moleküle der L1-Familienmitglieder auf der Proteinebene entstehen durch enzymkatalysierte Reaktionen. Es entstehen proteolytische Spaltprodukte und zum Teil ähnliche Modifikationen durch Glykosylierung und Phosphorylierung. Die extrazellulären Domänen von L1, *CHL1* und

NrCAM können durch Metalloproteinasen abgespalten werden und in löslicher Form weitere Funktionen übernehmen. Die löslichen Formen von L1, CHL1 und NrCAM beeinflussen in Zellkultrexperimenten Proliferation, Motilität und ein durch Integrine vermitteltes Neuritenwachstum (Beer et al., 1999; Naus et al., 2004; Conacci-Sorrell et al., 2005). L1-Mitglieder zeichnen sich, wie viele Oberflächenproteine, durch zahlreiche putative Glykosylierungsstellen aus, die u. a. zur Anheftung des HNK-1 (human natural killer 1) Kohlenhydratepitops führen kann. Die durch HNK-1 vermittelte Zelladhäsion beeinflusst das Neuritenwachstum und die Expression dieses Kohlenhydratepitops ist für synaptische Plastizität und Lernen und Gedächtnis von Bedeutung (Schmidt and Schachner, 1998; Strekalova et al., 2001; Senn et al., 2002; Yamamoto et al., 2002). Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung intrazellulärer hoch konservierter Tyrosinreste modulieren die adhäsiven Eigenschaften dieser Moleküle. Sie bestimmen über das Trafficking der Zellerkennungsmoleküle an der Zellmembran und die Anbindung an das Cytoskelett. Durch die Bindung an das Cytoskelett verringert sich die Mobilität dieser Moleküle an der Zellmembran und über ein Clustering von Zellerkennungsmolekülen werden die adhäsiven Eigenschaften der extrazellulär vermittelten Zellkontakte verändert (Garver et al., 1997; Tuvia et al., 1997; Kamiguchi and Lemmon, 1998; Schmid et al., 2000; Whittard et al., 2006).

1.4.3 Ligandenbindungen

Die Funktionsweise der Zellerkennungsmoleküle wird davon bestimmt, wie extrazelluläre Signale ins Zellinnere weitergeleitet werden und wie Veränderungen in der Signaltransduktion die Eigenschaften extrazellulärer und intrazellulärer Ligandenbindungen beeinflussen. Das extrazelluläre Bindungsverhalten dieser Moleküle ist, ähnlich wie bei anderen Zellerkennungsmolekülen, durch homophile und heterophile Interaktionen in der cis- und trans-Ebene gekennzeichnet. Die homophile Interaktion ist die Interaktion eines Proteins mit sich selbst und die heterophile Interaktion besteht aus verschiedenen Interaktionspartnern. Die Interaktionen membranassoziiierter Zellerkennungsmoleküle können durch benachbarte Moleküle einer Zellmembran erfolgen (cis-Ebene) oder durch Interaktionen von Molekülen mit benachbarten Zellmembranen oder der ECM (trans-Ebene). Bei allen transmembranen Mitgliedern der L1-Familie sind, mit Ausnahme von CHL1, homophile Interaktionen nachgewiesen worden (Mauro et al., 1992; Miura et al., 1992; Tuvia et al., 1997; Hillenbrand et al., 1999). Außerdem sind noch zahlreiche heterophile Interaktionen beschrieben worden.

Im Zusammenhang mit der Signalweiterleitung ins Zellinnere, sind für die Funktionsweise dieser Interaktionen die Kombination der Bindungspartner, der Zelltyp und der Entwicklungszustand der Zelle von Bedeutung. Die Interaktion von NrCAM mit F3/ F11 fördert das Wachstum tektaler Neurone, während das Wachstum axonaler Fortsätze cerebellarer Körnerzellen reduziert wird. Die Interaktion von NrCAM mit Neurofascin fördert ebenfalls das Wachstum tektaler Neurone, jedoch nur wenn immobilisiertes Neurofascin als Ligand für NrCAM als axonalen Rezeptor dient (Volkmer et al., 1996; Faivre-Sarrailh et al., 1999). Damit Sema3A auf Axone des Corticospinaltraktes eine repulsive Wirkung ausüben kann, wird die cis-Interaktion von L1 mit Neuropilin-1 benötigt. Eine zusätzliche trans-Interaktion von L1 mit dem L1-Neuropilin-1 Komplex in der cis-Ebene kehrt die repulsive Wirkung von Sema3A auf die Axone in eine anziehende Wirkung um (Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2002). In ähnlicher Weise wird die cis-Interaktion von NrCAM mit Neuropilin-2 sowohl für die anziehende als auch für die repulsive Wirkung von Sema3B und Sema3F auf die posteriore Subpopulation bzw. anteriore Subpopulation der Axone der anterioren Commissur benötigt (Falk et al., 2005). Die Auswirkung einer Interaktion hängt entscheidend von der Signaltransduktion in der Zelle ab. Wie die Spezifität der komplexen extrazellulären Interaktionen bei der Konvergenz auf eine vergleichsweise eingeschränkte Zahl bekannter intrazellulärer Interaktionspartner erhalten bleibt, ist bisher nicht gut untersucht. Die intrazelluläre Domäne der transmembranen L1 Moleküle besteht aus etwa 100 Aminosäuren und ist der am höchsten konservierte Bereich dieser Molekülfamilie (Holm et al., 1996). Alle L1-Familienmitglieder können an die Familie der Ankyrine binden, die eine Verbindung dieser Moleküle zum Aktin-Spektrin Cytoskelett herstellen und sind am Aufbau spezialisierter Membranstrukturen beteiligt (Davis and Bennett, 1994; Garver et al., 1997; Lustig et al., 2001b; Needham et al., 2001; Buhusi et al., 2003; Custer et al., 2003; Ango et al., 2004; Dirks et al., 2006). Die Interaktion der L1-Familienmitglieder und Ankyrin ist durch Phosphorylierung des Tyrosinrests der Ankyrin-Erkennungssequenz (FIGQY) reguliert. Durch die Phosphorylierung wird die Bindung an Ankyrin reduziert und damit Motilität von L1 und Neurofascin in der Membran erhöht (Garver et al., 1997; Gil et al., 2003). Phosphotyrosin kann auch eine Bindung mit Doublecortin eingehen, einem Mikrotubuli-assoziierten Protein, das für die Migration corticaler Neurone von Bedeutung ist (Kizhatil et al., 2002). Über die Bindung von L1 an Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Proteine ist eine von Ankyrin unabhängige Verbindung zum Cytoskelett möglich (Dickson et al., 2002). L1-ERM Interaktionen regulieren axonale Verzweigungen cerebellarer Neurone (Cheng et al., 2005). Die Interaktion der intrazellulären Domäne von L1 mit der Tyrosin-basierten Signalsequenz

(YRSL) führt zur Clathrin-vermittelte Endocytose von L1 und bietet dadurch eine Möglichkeit die Expression von L1 dynamisch zu regulieren (Übersichtsartikel: Kamiguchi and Lemmon, 2000). NrCAM besitzt als einziges L1-Familienmolekül der Vertebraten ein PDZ-Bindungsmotiv und interagiert mit den Synapsen-assoziierten Proteinen SAP90 und SAP 97 (Dirks et al., 2006).

CHL1 ist das zuletzt identifizierte Mitglied der transmembranen L1-Familie (Holm et al., 1996). Während für die übrigen Mitglieder ein komplexes Bindungsverhalten gezeigt werden konnte, ist über CLH1 nur wenig bekannt. In einer Studie von Buhusi et al., (2003) verstärkt CHL1 die Zellmigration in vitro über die Interaktion der extrazellulären Domäne mit Integrinen und die Interaktion der intrazellulären Domäne mit Ankyrin (Buhusi et al., 2003). In einer weiteren Arbeit reguliert die intrazelluläre Domäne von CHL1 über die Bindung an Hsc 70 das Ablösen des Clathrin-Mantels von synaptischen Vesikeln und greift damit das Clathrin-abhängige Recycling synaptischer Vesikel ein (Leshchyn'ska et al., 2006). Weitere Mechanismen der Funktionsweise von CHL1 sind bisher noch ungeklärt. Daher wurde in dieser Arbeit ein weiterer intrazellulärer Interaktionspartner von CHL1 untersucht.

1.4.4 Expressionsmuster

Die genau abgestimmte räumliche und zeitliche Expression der Moleküle der L1-Familie ist die Voraussetzung für ihre Funktionen während der Entwicklung und in adulten Stadien. Die Expression dieser Moleküle wird während embryonaler Stadien detektiert und kann über die ganze Lebenszeit hinweg verfolgt werden. Gegenüber der Expression während der Embryogenese und in fortgeschrittenen postnatalen Stadien ist ihre Expression während früher postnataler Stadien am stärksten ausgeprägt (Dirks., 2003. Diss. Univ. Oldenburg). L1-Mitglieder werden sowohl von einigen proliferierenden Vorläuferzellen als auch von zahlreichen Neuronen und Gliazellen exprimiert (Moscoso and Sanes, 1995; Hillenbrand et al., 1999; Lustig et al., 2001a; Sakurai et al., 2001; Backer et al., 2002). Die Expression dieser Moleküle ist im Nervensystem weit verbreitet. Einzelne Mitglieder weisen individuell verschiedene Expressionsmuster auf, die jedoch in vielen Bereichen überlappen, so dass die Expression einzelner als auch mehrerer Moleküle der L1-Familie in einer Zelle auftreten kann (Dirks., 2003 Diss. Univ. Oldenburg). Während die Expression von L1, CHL1 und NrCAM vorwiegend neuronal ist, wird Neurofascin verstärkt auch in glialen Zellen exprimiert. Die subzelluläre Verteilung führt häufig zu einer Anreicherung dieser Moleküle entlang von

Fasertrakten. Die Expression von NrCAM und Neurofascin wird verstärkt an axonalen Initialsegmenten und entlang Ranvierscher Schnürringe detektiert (Davis et al., 1996; Collinson et al., 1998; Tait et al., 2000; Jenkins and Bennett, 2001; Lustig et al., 2001a).

Die zeitlich und räumlich weit gestreute Expression steht auch im Einklang mit den entsprechend vielfältigen Funktionsweisen dieser Moleküle während der Entwicklung und im ausgereiften Nervensystem und den mit der Mutation dieser Moleküle verbundenen neuropsychiatrischen Erkrankungen. Fragestellungen, die die Funktion dieser Moleküle in komplexeren systembezogenen Zusammenhängen, wie der Ausbildung bestimmter Hirnstrukturen oder den Einfluss auf Lernen und Gedächtnis betreffen, können nur durch eine Untersuchung dieser Moleküle *in vivo* beantwortet werden. Die Analyse gendefizienter Mäuse hat in Bezug auf diese Fragestellungen zu bedeutenden Erkenntnissen geführt.

1.4.5 Analyse von Nullmutanten

Die Erzeugung von Nullmutanten bietet die Möglichkeit, die direkten Konsequenzen des Verlusts der Funktion eines Gens in einer *in vivo* Situation zu untersuchen.

Im Zeitraum des letzten Jahrzehnts sind für alle vier Moleküle der transmembranen L1-Familie defiziente Mauslinien erzeugt worden. L1-, CHL1- und NrCAM-defiziente Mäuse sind überlebensfähig und fertil (Dahme et al., 1997; Cohen et al., 1998; More et al., 2001; Sakurai et al., 2001; Montag-Sallaz et al., 2002; Sherman et al., 2005). Nur die Neurofascin-defizienten Mäuse, deren Erzeugung und initiale Analyse in einer kürzlich erschienenen Arbeit von Sherman et al., (2005) beschrieben wurde, sterben innerhalb der ersten postnatalen Woche. Die Mäuse zeigen schwerwiegende Defekte in der Erregungsweiterleitung myelinisierter Nerven und in der Zusammensetzung nodaler und paranodaler Proteinkomplexe. Im Vergleich dazu ist bei NrCAM-defizienten Mäusen nur die Zusammenlagerung von Natriumkanälen in nodalen Bereichen verzögert (Custer et al., 2003). Nullmutanten der L1-Familie zeigen neben Defekten des Aufbaus von spezialisierten Membranstrukturen auch vielen andere strukturelle Abweichungen, die sowohl spezifische als auch überlappende Veränderungen mit einschließen. So ist beispielsweise in den L1-defizienten Mäusen das Corpus Callosum unterentwickelt, während bei NrCAM-defizienten Mäusen die Wegfindung der Axone der anterioren Commissur beeinträchtigt ist (Demyanenko et al., 1999; Falk et al., 2005). Die Defekte verschiedener defizienter Mäuse können jedoch auch in gleichen Fasertrakten auftreten. So ist z. B. die Zielfindung der Axone

retinaler Ganglionzellen bei L1-defizienten Mäusen gestört, während bei NrCAM-defizienten Mäusen die Axone retinaler Ganglionzellen im optischen Chiasma einen abweichenden Verlauf aufweisen (Demyanenko and Maness, 2003; Williams et al., 2006). Überlappende Abweichungen sind in corticalen Neuronen L1-defizienter und CHL1-defizienter Mäuse gefunden worden. L1- und CHL1-defiziente Mäuse zeigen beide eine abweichende Morphologie einiger corticaler Pyramidalneurone (Demyanenko et al., 1999; Demyanenko et al., 2004). Bei CHL1-defizienten Mäusen ist aber zusätzlich noch die Migration corticaler Neurone verändert. Die zahlreichen strukturellen Veränderungen in verschiedenen Hirnregionen stehen auch im Einklang mit den weit verbreiteten und teilweise überlappenden Expressionsmustern der L1-Familie und zeigen eine mögliche Notwendigkeit in der Entstehung der vier Familienmitglieder durch Genduplikation auf. Die überlappenden Funktionen können jedoch auch dazu führen, dass bei der Detektion subtiler Abweichungen der Verlust der Funktion eines Moleküls von den Funktionen der anderen Moleküle überdeckt wird. Daher kann die Untersuchung von Doppelmutanten zu weiteren Einblicken verhelfen. Bisher ist nur die NrCAM/L1 Doppelmutante bezüglich ihres Phänotyps im Cerebellum untersucht worden. Sowohl NrCAM als auch L1-defiziente Mäuse weisen subtile Abweichungen in der Grösse einiger cerebellarer Lobuli auf. Die NrCAM/L1 Doppelmutante zeigt dagegen einen schweren Defekt der cerebellaren Schichtung mit einer starken Größenreduktion der inneren Körnerzellschicht. Diese Beobachtung legt eine überlappende Funktion beider Moleküle in der Entwicklung der Körnerzellen des Cerebellums nahe (Sakurai et al., 2001).

Der genaue Anteil überlappender und spezifischer Funktionen der L1-Familie ist bisher nicht gut untersucht, da sich die verschiedenen Studien häufig auf verschiedene Regionen oder Systeme beziehen. Daher wurde in dieser Arbeit ein direkter Vergleich von NrCAM-defizienten und CHL1-defizienten Mäusen bezüglich ihrer Veränderungen der Hirnmorphologie in verschiedenen Regionen angestrebt. Aufgrund einer Studie von Montag-Sallaz et al. (2002), in der Abweichungen der axonalen Projektion im olfaktorischen Bulbus und Hippocampus gezeigt und eine Vergrößerung der Ventrikel vermutet wurde, sind in dieser Arbeit NrCAM-defiziente Mäuse bezüglich dieser Veränderungen untersucht und mit CHL1-defizienten Mäusen verglichen worden (Montag-Sallaz et al., 2003). In einer Studie von Sakurai et al. (2001) sind bei NrCAM-defizienten Mäusen Veränderungen in der Größenausprägung einzelner cerebellarer Lobuli gezeigt worden (Sakurai et al., 2001). Daher wurden in dieser Arbeit CHL1-defiziente Mäuse in Bezug auf mögliche Veränderungen der Cerebellummorphologie untersucht und mit NrCAM-defizienten Mäusen verglichen. Eine

weitere Studie von Fransen et al., (1998) verweist auf einen möglichen Zusammenhang der Cerebellumsmorphologie von L1-Mutanten mit der Ausprägung des vierten Ventrikels. In Bezug auf diese Arbeit erfolgte die entsprechende Untersuchung von CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen. Um im Hinblick auf überlappende und spezifische Funktionen dieser Moleküle die Auswirkungen durch den Verlust beider Moleküle zu untersuchen, sind durch das Kreuzen von CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse gezüchtet und mit den Einzelmutanten verglichen worden.

Die Defizienz der Moleküle der L1-Familie führt auch auf der Verhaltensebene zu Abweichungen bei den Mäusen, die in ähnlicher Weise auch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen auftreten können. L1-defiziente und conditional L1-defiziente Mäuse zeigen Verhaltensabweichungen, die Exploration, Angst und Informationsfilterung betreffen. (Fransen et al., 1998; Law et al., 2003; Irintchev et al., 2004). CHL1-defiziente Mäuse zeigen auch ein verändertes Explorationsverhalten und abweichende Reaktionen auf stressvolle und sozial bedeutsame Situationen (Montag-Sallaz et al., 2002; Frints et al., 2003; Morellini et al., 2007). Erkrankungen wie Schizophrenie, Autismus und Zwangsstörungen, die mit der Mutation von CHL1 und NrCAM in Verbindung gebracht werden, sind häufig durch eine Beeinträchtigung der Informationsfilterung gekennzeichnet (Rossi et al., 2005; Perry et al., 2007; Thoma et al., 2007; Tregellas et al., 2007). CHL1-defiziente Mäuse zeigen in der Arbeit von Irintchev et al. (2004) ebenfalls eine reduzierte Filterung akustischer Reize (Irintchev et al., 2004). Im Hinblick auf die klinische Relevanz von CHL1 und NrCAM sind in dieser Arbeit auch NrCAM-defiziente Mäuse und CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse bezüglich der Filterung akustischer Reize untersucht und mit CHL1-defizienten Mäusen verglichen worden. Bei CHL1-defizienten Mäusen wurde ausserdem noch eine Beeinträchtigung der Motorkoordination festgestellt, die auch bei NrCAM-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (Sakurai et al., 2001; Pratte et al., 2003). Während NrCAM-defiziente Mäuse eine Unterentwicklung bestimmter cerebellarer Lobuli aufweisen, die möglicherweise mit einer eingeschränkten Funktion des Cerebellums bei der Motorkoordination im Zusammenhang stehen, sind bei CHL1-defizienten Mäusen noch keine morphologischen Veränderungen bekannt, die einen Einfluss auf die Motorkoordination nahe legen (More et al., 2001; Sakurai et al., 2001). Um zu untersuchen, wie sich die doppelte Defizienz von CHL1 und NrCAM auf die Motorkoordination auswirkt, sind in dieser Arbeit die Einzelmutanten bezüglich ihrer motorischen Koordinationsfähigkeit untersucht und mit den Doppelmutanten verglichen worden.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Phylogenetische Untersuchungen stützen die Annahme, dass die vier Mitglieder der L1-Familie der Säugetiere im Verlauf der Evolution durch Genduplikation aus einem Ursprungsgen hervorgegangen sind (Übersichtsartikel: Hortsch, 1996, 2000). Eine Entstehung multipler Homologe lässt auf Anpassung an immer komplexere Vorgänge und eine Spezialisierung der Funktion einzelner Mitglieder schließen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Funktionen von CHL1 und NrCAM.

L1-Familienmitglieder zeichnen sich durch strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit aus. Sie weisen aber auch vielfältige Modifikation auf und zeigen ein komplexes Bindungsverhalten mit intra- und extrazellulären Liganden auf. Für die Spezifität der Funktionsweise dieser Moleküle ist die Kopplung extrazellulärer Ligandenbindungen an die intrazelluläre Signalweiterleitung ein wesentlicher Bestandteil. Besonders zu den intrazellulären Bindungspartnern und ihren Beitrag zur spezifischen Funktionsweise dieser Moleküle sind noch viele Fragen offen. Dabei ist über das zuletzt identifizierte Mitglied dieser Familie, CHL1, im Vergleich zu den anderen Mitgliedern am Wenigsten bekannt. Daher sollte ein Bindungspartner der intrazellulären Domäne von CHL1, der in einem Hefescreen identifiziert wurde, näher charakterisiert werden.

Die Bedeutung der L1-Familie offenbart sich auch durch die Assoziation der Mutation der zugrunde liegenden Gene mit zahlreichen neuropsychiatrischen Erkrankungen. Die diesen Erkrankungen zugrunde liegenden strukturellen und funktionellen Abweichungen können teilweise nur in einem systembezogenen Zusammenhang untersucht werden. Genetisch defiziente Mäuse bieten hierbei die Möglichkeit, die Auswirkung einer gezielt durchgeführten genetischen Manipulation in einem *in vivo* Modell zu analysieren.

Zu diesem Zweck ist auf der Grundlage vorangegangener Arbeiten in dieser Arbeit ein direkter Vergleich von hirnmorphologischen Abweichungen bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen durchgeführt worden (Sakurai et al., 2001; Montag-Sallaz et al., 2002). Da Mitglieder der L1-Familie auch auf dieser Ebene überlappende Funktionen aufweisen, sollte dieser direkte Vergleich Aufschluss über mögliche spezifische Funktionen dieser Moleküle in den ausgewählten Hirnregionen geben. In den Mutanten sind daher die axonalen Projektionen im olfaktorischen Bulbus und im Hippocampus im Zusammenhang mit der Proteinexpression von CHL1 und NrCAM untersucht worden. Zusätzlich erfolgte bei diesen Mäusen eine Untersuchung bezüglich der morphologischen Veränderungen des ventrikulären Systems und des Cerebellums.

Ähnlich wie bei neuropsychiatrischen Störungen, die mit der Mutation der Gene CHL1 und NrCAM in Verbindung stehen, ist bei CHL1-defizienten Mäusen eine Beeinträchtigung der Reizfilterung gezeigt worden (Irintchev et al., 2004). Weitere Verhaltensänderungen bei CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen äußern sich in einer verringerten Motorkoordination (More et al., 2001; Pratte et al., 2003). Um den Vergleich der Einzel- und Doppelmutanten hinsichtlich dieser Auffälligkeiten auf der Verhaltensebene fortzuführen, sind bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen die Filterung akustischer Reize und die Motorkoordination untersucht worden.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer/Roche, Calbiochem, Clontech, Gibco Life Technologies, Invitrogen, Merck, Qiagen, Roth und Sigma-Aldrich bezogen und in der Qualität pro analysis (p. A.) eingesetzt. Spezielle Chemikalien und Lösungen werden am Anfang der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

2.2 Lösungen

10 x PBS	1,5 M NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
10 x TBS	1,5 M NaCl, 500mM Tris-HCl; pH 7,5
10 x TCM	0,1 M MgCl ₂ , 0,1 M CaCl ₂ , 0,1 M Tris-HCl; pH 7,5
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat; pH 6,3
20 x SSPE	3,6 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4), 20mM EDTA
50 x Denhardt's Lösung	1 % Bovine Serum Albumin (BSA), 1 % Ficoll, 1 % Polyvinyl-pyrrolidone (PVP) in H ₂ O
50 x TAE	2 M Tris-Acetat; 0,05 M EDTA

2.3 Bakterien und Hefe-Nährmedien

LB-Medium	5 g / l Hefe-Extrakt, 10 g / l BactoTryptone, 5 g / l NaCl
LB-Platten	1000 ml LB-Medium, 15 g Agar
YPDA-Flüssigmedium	50g/l YPD Media, 30 mg / l Adenin-Hemisulfat ; pH 5,8
-L, -W, -LW, -ALWH	26,7 g / l Minimal SD-Base
Flüssigmedien	X g Dropout (DO) Supplement; pH 5,8
	-L 0,69 g / l -Leu DO
	-W 0,74 g / l -Trp DO
	-LW 0,64 g / l - Leu-Trp DO
	-ALWH 0.69 g / l -Ade-Leu-Trp-His DO
3-AT-Stammlösung	1M 3-AT in H ₂ O

2.4 Vektoren

pBlueskript KS -	Stratagene, La Jolla, CA
pEGFP-C1	Clontech / BD Biosciences, Heidelberg
pGBK-T7	Clontech / BD Biosciences, Heidelberg
pACT-2	Clontech / BD Biosciences, Heidelberg
pGEX 5 x 1	Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, U.K.

2.5 Kits und Enzyme

Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France
DIG RNA Labeling Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNase I RNase-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FirstChoice™ RLM-Race Kit	Ambion, Cambridshire, U.K.
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotid Removal Kit	Qiagen, Hilden
MasterAmp™ Tth DNA Polymerase	Epicentre, Madison, Wisconsin, USA
Marathon-Ready cDNA Mouse Brain	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France
mRNA Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase K Solution	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
5'/3'RACE Kit, 2nd Generation	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Rapid DNA-Ligation Kit	Roche Diagnostics GmbH Mannheim
Restriktionsenzyme	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNAsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Polyfect	Qiagen, Hilden
Sensiscript ^R RT Kit	Qiagen, Hilden
Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine-Tablet-Set	Sigma, Steinheim
T 3 RNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T 7 RNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden
Vectastain® Elite ABC Kit	Alexis, San Diego, USA
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.6 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-Calbindin	Kaninchen, polyklonal	IHC: 1:10000	Sigma, Steinheim
anti-CHL1: Peptid 1-16	Kaninchen, polyklonal	IHC: 1:1000	Pineda Antikörper Service/ Dr. D. Montag
anti-CHL1-23: Peptide 1 u. 2	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:10000	Pineda Antikörper Service/ A. Heyden
anti-GST	Kaninchen polyclonal	WB 1: 1000	Dr. W. Altmann
anti-NrCAM	Kaninchen, polyklonal	IHC: 1:1000	AbCAM, Cambridge, U.K.
anti-Synaptophysin	Maus, monoklonal	IHC: 1:200	Sigma, Steinheim

IHC: Immunhistochemie WB: Western Blot

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 568 anti-Maus IgG	Ziege	IHC: 1:200 ICC: 1:1000	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
anti-Digoxigenin-AP	Schaf	ISH: 1:500	Boehringer/Roche, Mannheim
anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt	Ziege	WB: 1:10000	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen IgG, Biotin-gekoppelt	Ziege	IHC: 1:200	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
anti-Maus IgG, Biotin gekoppelt	Ziege	IHC: 1:200	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

ICC: Immunocytochemie IHC: Immunhistochemie ISH: In situ-Hybridisierung WB: Western Blot

2.7 Tiere

Für die in situ-Expressionstudie von CHL1-23 wurde mit C57BL/6 Mäusen von Charles River, Sulzfeld gearbeitet. Die übrigen Versuche wurden mit C57BL/6 Mäusen und einer Wistar Ratte der hauseigenen Zucht (Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) durchgeführt. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen (12 h: 12 h/ Hell-Dunkel Zyklus,

21 ± 2°C , Luftfeuchtigkeit 50 – 55%) bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Der Genotyp der Mäuse gendefizienter Mauslinien wurde durch DNA-Isolation aus einer Schwanzbiopsie mit nachfolgender Genotypisierungs-PCR bestimmt.

2.8 Molekularbiologische Techniken

2.8.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Primer für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden mit dem Primer3-Programm (Rozen and Skaletsky, 2000) entworfen und zur Subklonierung gewonnener DNA-Fragmente mit Restriktionsschnittstellen am 5'Ende versehen. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert und geliefert. Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer und die PCR-Bedingungen werden im Anhang aufgeführt.

2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese, Elution und Ligation von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung hochmolekularer Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (BioRad) mit 0,7–2%igen Agarosegelen (in Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA) und Ethidiumbromid (1µg/ml) in 1x TAE-Puffer. DNA-Fragmente für Subklonierungen wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Qiaex II Gelextraktions-Kit aus dem Gel eluiert. Um die Fragmente in den vorgesehenen Vector zu ligieren, wurde dieser mit den entsprechenden Enzymen linearisiert und die Ligation des DNA-Fragments mit Hilfe des Rapid Ligation Kits durchgeführt.

2.8.3 Genotypisierung

TC-Puffer 0,5% SDS; 0,1 M NaCl; 0,05 M Tris-HCl; pH 7,5;
1 mM EDTA, pH 8,0

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde ein etwa 0,5 cm langes Stück vom Schwanz abgeschnitten und in 400 µl TC-Puffer mit 8,5 µl Proteinase K-Lösung (> 600 Einheiten je ml, Roche, Mannheim) über Nacht bei 65°C inkubiert. Um lipophile Moleküle und das SDS zu entfernen, wurden 75 µl 8 M K-acetat (SDS wird zu nahezu unlöslichem KDS) und 400 µl CHCl₃ dazugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, eine halbe Stunde auf Eis gestellt und anschliessend zentrifugiert (14000 x g, 4°C). Die wässrige Phase wurde abgenommen, und die DNA mit 2,5 fachem Ethanol gefällt, zentrifugiert, mit Ethanol 70% gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde bei 37°C getrocknet und die DNA in 150 µl 1mM Tris-HCl pH 7,0 mit 1µl RNase A (100 µg / ml, Boehringer, Mannheim) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.8.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien und Transformation

10 x TCM 0,1 M MgCl₂, 0,1 M CaCl₂, 0,1 M Tris-HCl; pH 7,5

Um chemisch kompetente Bakterien herzustellen, wurden 5 ml LB Medium mit einer Kolonie E.coli JM 109 angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 4 ml in 200 ml LB-Medium mit 2ml 1M MgSO₄ gegeben und bis zu einer optischen Dichte von 0,3 – 0,4 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde für 20 – 30 min auf Eis gestellt und anschliessend für 10 min bei 5000 x g, 4 °C zentrifugiert. Nach Spülen des Pellets mit 20 ml eisgekühltem 50 mM CaCl₂ wurde das Pellet in 100 ml eisgekühltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und 1h auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 5000 x g bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ mit 20% Glycerin gelöst, aliquotiert und bei – 70°C gelagert.

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und der Transformationsansatz (10µl Ligationsansatz + 20µl 10 x TCM ad 75µl H₂O) in 15 ml Falconröhrchen vorbereitet. 125 µl der Bakterien wurden zum Transformationsansatz gegeben und 30 – 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42°C wurde 1 ml

LB-Medium zum Ansatz gegeben und 30 – 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschliessend wurden die transformierten Bakterien auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert.

2.8.5 Plasmid-DNA-Präparation (Mini- und Maxipräparation)

P1- Puffer Qiagen	50mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0; 100 µg / ml RNase (4 °C)
P2-Puffer Qiagen	200 mM NaOH, 1% SDS
P3-Puffer Qiagen	2,5 M Kaliumacetat; pH 4,8
QBT-Puffer Qiagen	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % Ethanol; 0,15% Triton-X 100; pH 7,0
QC-Puffer Qiagen	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol; pH 7,0
QF-Puffer Qiagen	1,35 M NaCl; 50 mM MOPS, 15% Ethanol; pH 8,2

Für eine Minipräparation wurden 3 ml Selektionsmedium mit einer Einzelkolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden für 5 min bei 14000 x g, RT zentrifugiert und das Pellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Unter Zugabe von 300 µl P2-Puffer (5 min, RT) erfolgte die Lyse der Bakterien. Das Lysat wurde mit 300 µl P3-Puffer zur Neutralisation und Fällung denaturierter Proteine und chromosomaler DNA versetzt und bei 14000 x g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 800 µl Isopropanol gefällt und 15 min (14000 x g, 4°C) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit Ethanol 96% gewaschen, getrocknet und in 50 µl 1m M Tris-HCl, pH 7,0 aufgenommen.

Für eine Maxipräparation wurde eine Übernachtskultur von 200 ml angesetzt und bei der Präparation den Angaben des Qiagen Plasmid Maxi Kits gefolgt. DNA-Pellets wurden in 1 ml 10 mM Tris-HCl pH 7,0 aufgenommen. Sollte die isolierte DNA für die Synthese einer in situ Sonde oder für die Transfektion eukaryotischer Zellen eingesetzt werden, folgte im Anschluss eine Aufreinigung durch Chloroformextraktion und Ethanolfällung.

2.8.6 PolyA⁺-RNA-Präparation und reverse Transkription

Die Isolierung von polyA⁺ RNA aus dem Gesamthirn einer Maus erfolgte mit dem mRNA Isolations-Kit. Die reverse Transkription der polyA⁺ RNA erfolgte mit dem Sensiscript^R RT PCR Kit. Beide Kits wurden entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Für den

Nachweis von CHL1-23 im Maushirn, folgte eine PCR mit zwei genspezifischen Primern. Sollte die isolierte RNA für eine RACE eingesetzt werden, wurde die reverse Transkription und die nachfolgende PCR entsprechend den Angaben des jeweiligen RACE-Kits durchgeführt.

2.8.7 Screen von cDNA-Banken und Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Um die vollständige Sequenz von CHL1-23 zu erhalten, wurde der Screen einer cDNA Bank (Rapid-Screen cDNA Library Panel: Mouse Adult Brain; OriGene Technologies, Inc.; Rockville, Maryland) mit genspezifischen Primern durchgeführt. Diese cDNA Bank enthält 500000 cDNA-Klone und ist auf die Identifikation langer cDNAs und ihrer 5'Enden ausgerichtet. Das Durchsuchen der Plasmid-DNA dieser Bank erfolgte durch eine PCR mit zwei genspezifischen Primern auf einer 96-Loch Platte. Der Screen dieser Platte wird nach der Amplifikation des erwarteten PCR-Produkts in einer der Vertiefungen durch einen weiteren Screen einer entsprechende Subplatte ergänzt, die pro Vertiefung 50 cDNA-Klone als E. Coli Glycerolstock enthält. Weitere Versuche, die vollständige Sequenz von CHL1-23 zu erhalten, beinhalteten die Anwendung verschiedener RACE-Strategien, mit Hilfe entsprechender Kits (Marathon-ReadyTM cDNA (Adaptor-ligierte doppelsträngige cDNA für die Marathon-RACE); 5'/3'RACE Kit, 2nd Generation; FirstChoiceTM RLM-Race Kit).

2.8.8 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Für die Synthese von Digoxigenin – markierter sense und antisense RNA-Sonden wurde das Ausgangsplasmid vollständig mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Zur Aufreinigung des Plasmids wurde eine Chloroformextraktion durchgeführt, die gereinigte DNA mit 10% 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 1% 1 M MgCl₂ versetzt und mit 2,5fachem Volumen Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde in 20 µl mit Diethylpyrocarbonat behandelten (DEPC)-H₂O gelöst und die Konzentration anhand der optischen Dichte (OD 260 nm) bestimmt. Die in vitro Transkription wurde in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt: (1µg DNA + 2 µl 10 x Transkriptionspuffer + 5 µl 40 mM DTT + 1 µl RNAsin + 2 µl 10 x RNA Labeling Mix + 1,5 µl RNA-Polymerase ad 20 µl DEPC-H₂O) und für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde nochmals 1 µl RNA-Polymerase hinzugegeben und über Nacht

inkubiert. Die DNA-Matrize wurde durch 1 µl DNase (RNase-frei; Boehringer) Zugabe (15 – 20 min ; 37°C) abgebaut. Die gewonnene RNA wurde durch Zugabe von 2,4 µl 4 M LiCl; 2µl 0,5 M EDTA und 65 µl Ethanol gefällt. Nach dem Waschen der RNA mit Ethanol 70% wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl DEPC-H₂O gelöst. Sonden einer Länge von über 300 Nukleotiden wurden in folgendem Ansatz alkalisch hydrolysiert (100µl gelöste RNA + 100 µl Hydrolysepuffer (40mM NaHCO₃, 60 mM Na₂CO₃); 65°C). Die Dauer der Hydrolyse wurde nach folgender Formel bestimmt : (Sondenlänge in kb – 0,3 kb) / (Sondenlänge in kb x 0,3 x 0,11) = Minuten, um 0.3 kb Fragmente zu erhalten. Der Ablauf der Reaktion wurde durch Neutralisation mit 100 µl 0,1 N HCL beendet und die cRNA-Sonden bei -70°C gelagert.

2.9 Hefe- Zwei –Hybrid System

2.9.1 Klonierung von Bait- und Prey- Konstrukten

Bait-Konstrukte (Vektor pGBKT-7) kodierend für die intrazelluläre Dömaine von CHL1 und NrCAM wurden von Dr. I. Schön zur Verfügung gestellt. Prey-Konstrukte (Vector pACT-2) kodierend für CHL1-23 und verschiedene Exons wurden von Dr. S. Neidhold zur Verfügung gestellt.

2.9.2 Herstellung chemisch kompetenter Hefen und Transformation

Hefestamm	AH 109
10 x LiAc	1M Lithiumacetat in H ₂ O, pH 7,5 sterilfiltriert
10 x TE	0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA
PEG/TE/LiAc	1 x TE, 1 x LiAc, 40% Polyethylenglykol
carrier-DNA	10 mg / Heringssperma DNA

Zur Herstellung kompetenter Hefen wurden 50 ml YPD Medium mit dem entsprechenden Hefestamm angeimpft und über Nacht bei 300 rpm und 30°C kultiviert. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min, RT) und Resuspension der Zellen in 50 ml frischem Medium erfolgte eine weitere Inkubation für ca. 3 Stunden bei 300 rpm und 30°C. Nach Zentrifugation (500 x g, 5 min RT) und zweimaligem Waschen in 1 x TE und 1 x TE / LiAc wurden die kompetenten

Zellen in 1,5 ml 1 x TE / LiAc aufgenommen. Bei der Transformation wurden zu 50 µl kompetenten Hefen 75 µg carrier-DNA, versetzt mit 0,5 µg Plasmid-DNA, gegeben. Nach Zugabe von 300 µl PEG/TE/LiAc und einer Inkubation von 30 min bei 30°C wurde ein 20 minütiger Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und die Zellen auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen geerntet (500 x g, 5 min) und in 200 µl Wasser aufgenommen. Bis zu 100 µl der transformierten Hefen wurden auf entsprechende Selektionsplatten ausgestrichen und 3 – 5 Tage bei 30°C inkubiert.

Transformanden wurden aufgrund des Wachstums der Kolonien auf –LW Platten identifiziert und ein Reporter-gen vermittelter Interaktionsphänotyp anhand des Wachstums der Kolonien auf -ALWH Platten. Bait- und prey-Konstrukte wurden zum Ausschluß falsch-positiver Interaktionen auf ihre Selbstaktivität überprüft.

2.10 Proteinbiochemische Methoden

2.10.1 Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein

Mittels PCR wurde das cDNA Fragment von CHL1-23 amplifiziert, dass den ersten 115 Aminosäuren von CHL1-23 (siehe Anhang) entspricht. Dieses Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen EcoR I und BamH I in den Expressionsvector pGEX 5 x kloniert. Eine Einzelkolonie von BL21(DE3) pLys, die mit dem Expressionsplasmid pGEX 5x CHL1-23 transformiert wurde, diente zum Animpfen einer Übernachtskultur mit entsprechendem Selektionsmedium und 1% Glucose. Die Übernachtskultur wurde zentrifugiert und das Bakterienpellet in Selektionsmedium resuspendiert. 10% dieser Kultur wurden in Selektionsmedium mit 0.5 mM IPTG gegeben, die Kultur nach 5 h zentrifugiert und das Pellet in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Nach kurzem Aufkochen der Probe und erneuter Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration des Überstandes mit der Amidoschwarz-Methode (2.10.4) bestimmt.

2.10.2 Herstellung von Peptidantikörpern

Zwei Kaninchen wurden mit dem KLH-gekoppelten Peptid 1 (NH₂-CANGPRRPPEPLGAE-CONH₂) immunisiert und zwei weitere Kaninchen mit dem KLH-gekoppelten Peptid 2 (NH₂-

CVDMDGPERGFQGKE-COOH). Die Peptidsynthese und die Immunisierung der Tiere erfolgte durch den Pineda-Antikörper-Service. Dabei folgten der Primärimmunisierung am Tag 1 mehrere Auffrischungen am Tag 20, 30, 40, und 61. Am Tag 61 erfolgte die erste Blutentnahme und die Überprüfung der Immunsereen. Nach einer weiteren Auffrischung am Tag 75 erfolgte am Tag 90 die finale Blutentnahme. Anschließend wurde die totale IgG Fraktion aus diesen Seren aufgereinigt.

2.10.3 Homogenisierung von Hirngewebe und subzelluläre Fraktionierung

Homogenisierungspuffer	0,2 mM CaCl ₂ ; 0,2 mM MgCl ₂ ; 1 mM NaHCO ₃ ; pH 7,9 1 mM Spermidin; 1 µg / ml Turkey egg-white trypsin inhibitor (TEW); 10 µg / ml Soja-Bohnen Trypsin Inhibitoren (SBTI); 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); 0,5 mM Jodacetamid (IAA)
------------------------	---

Das Hirngewebe (1g) wurde mit 1,2 ml/g Homogenisierungspuffer versetzt und einem Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) homogenisiert. Zellkerne und Debris wurden bei 1500 x g (15 min; 4°C) abzentrifugiert und der Überstand durch eine weitere Zentrifugation bei 13000 x g (15 min; 4°C) in eine grobe cytosolische Fraktion und eine grobe Membranfraktion aufgetrennt.

Sollte das Gewebe in einem zwei-dimensionalen Gel eingesetzt werden, wurde das Gewebe mit einem Potter im Homogenisierungspuffer homogenisiert. Zellkerne und Debris wurden bei 1000 x g abzentrifugiert und der Überstand zweimal bei 100.000 x g zentrifugiert. Die daraus resultierenden vereinigten Überstände und das mikrosomale Pellet wurden als Proben für die nachfolgende zwei-dimensionale Auftrennung eingesetzt

2.10.4 Proteinbestimmung mit der Amidoschwarz-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde colorimetrisch nach der Amidoschwarz-Methode nach Popov (Popov et al., 1975) mittels Doppelbestimmung der Proben und einer BSA-Eichreihe durchgeführt. Die Farbdetektion erfolgte bei 620 nm (Ultraspec 1100 pro, Amersham Pharmacia Biotech).

2.10.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2 x SDS Probenpuffer	135 mM Tris, pH 6,8; 4 % SDS; 20% Glycerin 10% 2-Mercaptoethanol; 0,016% Bromphenolblau
10 x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS
Elektrophorese-Puffer	(10 x SDS-PAGE Rotiphorese [®] (Roth))
Coomassie-Brillantblue-Färbelösung	0,125 % Coomassie-Brillantblue R250, 50% Methanol; 10% Eisessig
Entfärbelösung	7% Eisessig; 5% Methanol
Geltrocknungslösung	50% Methanol; 5% Glycerin

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde als SDS-PAGE nach Lämmli (Lämmli, 1970) durchgeführt. Dabei wurden 8-10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA / Gel und einer maximalen Spannung von 250 V (BioRad-System, Protan II, München). Die Proteingele wurden geblottet (2. 10.6) oder mit Coomassie-Brillantblue-Lösung gefärbt (ca. 1 h; RT) und mit Coomassie-Entfärbelösung behandelt. Zur Dokumentation wurden die Gele 15 min in Geltrocknungslösung inkubiert und zwischen Ersatz-Cellulose-Folien (Roth) in einer Trockenapparatur getrocknet.

2.10.6 Western-Blotting und Immundetektion

Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Ponceau S-Färbelösung	0,2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure (TCA)
TBS-T	0,5% Tween-20 in 1 xTBS
TBS-T-MP	5% Magermilchpulver in TBS-T
Nitocellulose-Membran	Amersham Biosciences

Die Proteine aus Polyacrylamidgelen wurden elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zunächst wurden die SDS-Gele in Blotpuffer für 20 min equilibriert and anschliessend in einer Trans-Blot-Cell in Blotpuffer für 1 h (4°C) bei einer Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 350 mA (Trans-Blot-Cell; BioRad, München) geblottet. Der Proteintransfer auf die Membran wurde durch eine Ponceau-Färbung überprüft. Zur Immundetektion wurde die Membran für 1 h bei RT mit TBS-T-MP blockiert und mit dem ersten Antikörper in der gleichen Blockierlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem zweiten HRP-gekoppelten Antikörper in TBS-T verdünnt inkubiert. Anschliessend wurde dreimal mit TBS-T gewaschen und einmal mit TBS. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (Amersham Life Sciences) nach Angaben des Herstellers. Chemiluminiszenz-sensitive Filme (Hyperfilm, Amersham Life Sciences) wurden zur Exposition der Membran und eine automatische Entwicklermaschine (Curix 60, Agfa, Leverkusen) zur Entwicklung der Filme verwendet.

2.10.7 Zweidimensionale Gel-Elektrophorese und massenspektroskopische Analyse von Peptiden

In Zusammenarbeit mit Kathrin Pohlmann (Abteilung Neurochemie) wurden Proteine von Gesamthirnhomogenaten von CS56/BL6 Mäusen in einer zwei-dimensionalen Gel-elektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte durch isoelektrische Fokussierung, bei der die Proteine innerhalb des elektrischen Feldes entlang eines pH-Gradienten wandern, bis ihre Nettoladung und damit auch ihre Migrationsgeschwindigkeit Null ist (Isoelektrischer Punkt). Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte entsprechend ihrer molekularen Masse durch SDS-PAGE (2.10.5). Dieses Verfahren ermöglicht eine detaillierte Auftrennung von Proteinen, bei dem im Idealfall ein Spot auf dem Proteingel einem Protein entspricht. Die Proteine in diesen Gelen wurden entweder durch Färbung mit Coomassie BrilliantBlue G250 oder Silber-Färbung visualisiert oder auf Nitrozellulose-Membranen geblottet.

Die Immundetektion der auf die Membranen geblotteten Proteine erfolgte über eine Inkubation der Membranen mit anti-CHL1-23 Serum, wie in (2.10.6) beschrieben. Die Spots auf den entwickelten Filmen, wurden mit den Spots auf den Coomassie- und silbergefärbten Gelen in Übereinstimmung gebracht. Übereinstimmende Spots wurden aus Coomassie-gefärbten Gelen ausgestochen und über einen tryptischen Verdau (Jimenez et al., 2002) für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Mit der MALDI-Technik (matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation) wird die Ionisation durch einen intensiven Impuls kurzweiliger Laserstrahlung erreicht. Die entstehenden Ionen werden im Massenanalysator entsprechend ihrer Flugzeit nach ihrem Massen / Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und mit Hilfe eines Sekundärelektronenvervielfachers detektiert. Die massenspektrometrische Messung der Proben wurde im Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Center of Neurogenomics and Cognitive Research, Faculty of Earth

and Life Sciences, Vrije Universiteit, De Boelelaan 1085, 1081 HV Amsterdam / Niederlande an einem Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer durchgeführt. Die Spektren aus diesem Verfahren wurden mit dem Spektrum des theoretischen tryptischen Verdaus von CHL1-23 verglichen, um bei Übereinstimmung der aus den Spektren resultierenden Sequenzen Rückschlüsse auf die fehlenden Sequenzabschnitte des Proteins zu ziehen.

2.11 Zellkultur

2.11.1 Kultivierung und transiente Transfektion von COS-7-Zellen

Kulturmedium	DMEM, 10% FKS, 2mM L-Glutamin, 1% Pen-Strep
Einfriermedium	90% Kulturmedium, 10% DMSO

Die Nieren-Fibroblasten-Zelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (COS-7-Zellen) wurde bei 37°C, 5% CO₂ und 90% H₂O-gesättigter Luft kultiviert. Konfluente Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert, wobei eine Teilung der Zellen im Verhältnis von etwa 1:8 nach einmaligem Waschen der Zellen mit HBSS und 5 minütiger Inkubation mit 1% Trypsin (Gibco) in HBSS erfolgte. Bei der transienten Transfektion wurde das liposomale Transfektionsreagenz PolyFect® nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Transfektion erfolgte in 24-well-Gewebekulturplatten, die mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen bestückt waren. Die Fixierung erfolgte ca. 48 h nach der Transfektion.

2.11.2 Immuncytochemie

Blockierpuffer	10% Pferdeserum, 5% Sucrose, 2% BSA
----------------	-------------------------------------

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden die Zellen nach ca. 48 h nach einmaligem Waschen mit PBS mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei 37°C für 20 min fixiert. Anschliessend wurden die fixierten Zellen mit PBS gewaschen und für 30 min blockiert. Der erste Antikörper wurde über Nacht bei 4°C verabreicht. Vor der Verabreichung des zweiten Antikörpers für 90 min bei RT wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Nach mehrfachem Waschen mit PBS erfolgte das Eindeckeln der Zellen mit Vectashield.

2.12 Morphologische und histologische Methoden

2.12.1 Messung der Ventrikelgröße mittels Magnet Resonanz Tomographie (MRT)

In Zusammenarbeit mit Dr. Frank Angenstein (Speziallabor Nicht-Invasive Bildgebung) wurden die Volumina des Gesamthirns und des ventrikulären Systems der Mäuse mittels T₂-gewichtetem anatomischem MRT bestimmt. Das Verfahren wurde, wie in der Arbeit von Angenstein et al. (2004) beschrieben, mit einem Bruker Biospec 47/20 Scanner, ausgerüstet mit einem BGA 12 Gradienten System, bei 4.7 T durchgeführt (Angenstein et al., 2004). Die gewählten Parameter (Wiederholzeit = 1700 ms; Echozeit = 15 ms; Bildfeld 25,6 x 25,6x 9,6 mm; Matrix 256 x 256 x 96) ermöglichten eine nominelle Auflösung von 100 x 100 µm in der Ebene mit einer Schnittdicke von 100 µm. Die Magnet-Resonanz-Bilder wurden mit dem öffentlichen Java-basierten Bildverarbeitungs- und Analyseprogramm Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) ausgewertet, bei dem die Ventrikel durch eine ergänzende 3D-Segmentationssoftware aufgrund der hohen Signalstärke der cerebrospinalen Flüssigkeit automatisch markiert wurden. Das Volumen des vierten Ventrikels wurde getrennt vom übrigen Ventrikulärsystem ausgewertet. Um das Gesamthirnvolumen zu bestimmen, wurde die Fläche des manuell segmentierten Hirns in jedem Schnitt mit der Schnittdicke multipliziert. Die Genotypen der Tiere waren während dieser Auswertung nicht bekannt, um eine vorurteilsfreie volumetrische Bestimmung zu gewährleisten. Im Anschluss an die volumetrischen Größenmessungen erfolgte die statistische Auswertung der Daten.

2.12.2 In situ Hybridisierung (ISH)

2.12.2.1 Anfertigung der Schnittpräparate

Mäuse verschiedener Entwicklungsstadien (E13, E16, P1, P5, P14, P 21, 3 Monate und adult) wurden für die Untersuchung verwandt. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat getötet. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert. Bei embryonalen Mäusen wurde der ganze Kopf in 2-Methylbutan bei – 40°C tiefgefroren, bei den übrigen Mäusen nur die herauspräparierten Hirne. Mit einem Kryostat (Leica, Wetzlar) wurden 14 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Adhäsionsobjektträger (Histobond Superfrost) aufgezogen und bei -70°C gelagert.

2.12.2.2. Konventionelle ISH: Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

Fixierlösung	4% Paraformaldehyd in PBS; pH 7,2
P ₁ DIG	0,1 M Tris-HCL; 0,15 M NaCl; pH 7,5
P ₃ DIG	0,1 M Tris-HCL; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂ ; pH 9,5
P ₄ DIG	10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA; pH 8,0
MBM	0,1 M Tris-HCL; 0,15 M NaCl; 1% Blocking Reagent (Boehringer), 0,5% BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V, Merck)
Prähybridisierungspuffer	2,5 x Denhardt's Lösung; 25 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,25 mg / ml Hefe tRNA; 20 mM NaCl, 50 % Formamid
Hybridisierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 x Denhardt's Lösung; 0,5 mg / ml Hefe tRNA (Roche); 0,1 mg / ml Poly A; 0,33 M NaCl; 0,1 M Dithiothreitol (DTT); 10% Dextran-sulfat; 50% Formamid
Entwicklungspuffer	0,34 mg / ml 4-Nitroblue Tetrazoliumchlorid (NBT); 0,175 mg / ml 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyphosphat (BCIP); 0,25 mg / ml Levamisol (Sigma) in P ₃ -DIG

Die Gewebeschnitte wurden für mindestens 30 min bei 4°C fixiert, danach dreimal mit PBS gewaschen und 5 min in Ethanol 70% inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in H₂O wurden die Schnitte zur Permeabilisierung der Membranen für 5 min in 0,1 M HCl inkubiert. Es erfolgte eine Neutralisation der Präparate durch Waschen mit PBS, bevor sich eine 20minütige Inkubation in 0,25% Essigsäureanhydrid in 0,1M Triethanolamin pH 8,0 anschloss. Nach weiterem Waschen in PBS wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 95%) dehydriert und getrocknet. Danach wurden die Präparate für 3 h im Prähybridisierungspuffer bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Hybridisierung mit Dig-markierten RNA-Sonden bei 55°C über Nacht. Darauf folgten zwei 30 minütige Waschschritte mit vorgewärmten 0,2 x SSC bei 55°C zur Entfernung unspezifischer Bindungen, gefolgt von drei Waschschritten in vorgewärmten 0,1 X SSC/50% Formamid für 90 min bei 55°C. Zur Vorbereitung auf die Antikörper-Applikation wurden die Präparate für 10 min in 0,2 x SSC und 10 min in P₁-Dig bei RT gewaschen. Anschliessend wurden die Schnitte 30 min in MBM blockiert und über Nacht bei 4°C mit Anti-Dig Fab Fragmenten inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit P₁-Dig entfernt. Zur Vorbereitung auf die Signalentwicklung wurden die Schnitte in P₃-Dig gewaschen und für die anschließende Enzymreaktion unter Zugabe des Entwicklungspuffers im Dunkeln

inkubiert. Durch Waschen der Schnitte in P4-Dig wurde die Reaktion gestoppt und die Präparate in Fluromount eingedeckelt.

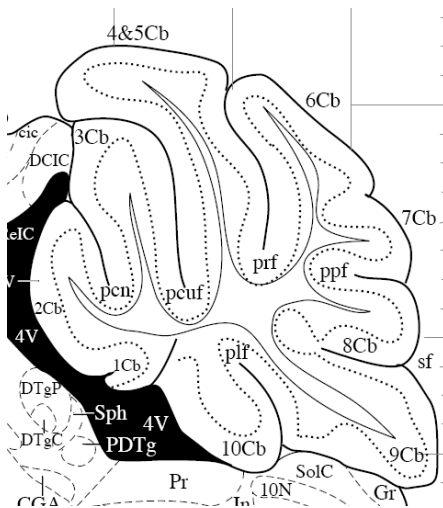
2.12.3 Perfusion

Chloralhydrat:	7% Chloralhydrat (Merck) in physiologischer Kochsalzlösung
Fixierlösung:	4% Paraformaldehyd in PBS; pH 7,4
Natrium-Sulfid-Lösung	5,85g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ + 5,95g NaH_2PO_4 ad 1000 ml H_2O

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Chloralhydrat betäubt und mit einer peristaltischen Pumpe (Ecos, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim) über die linke Herzkammer zuerst mit PBS und anschliessend mit Fixierlösung (1 ml/g Körpergewicht) perfundiert. Für die Timm's Färbung wurde anschliessend noch mit Natrium-Sulfid-Lösung (1 ml/g Körpergewicht) perfundiert.

2.12.4 Größenmessungen am Cerebellum

Das Gewebe wurde nach der Perfusion herauspräpariert und für 24 h in PFA 4% postfixiert. Anschliessend wurden mit einem Vibratom 100 μm dicke Sagittalschnitte angefertigt und in PBS aufgefangen. Die drei Schnitte, die in Übereinstimmung mit dem Paxinos Maushirn Atlas die Mittellinie des Hirns am besten repräsentierten, wurden zur Messung der Fläche des cerebellaren Vermis herangezogen.



(Atlas von Paxinos & Franklin (2001))

Abb. 2: Schematische Darstellung des cerebellaren Vermis in der midsagittalen Ebene

Cb1 bis Cb 10 bezeichnen die Lobuli des cerebellaren Vermis

Mit einem Mikroskop (Zeiss, Jena), das mit einem Neurolucida-System (Mikrobrightfield, Magdeburg) ausgerüstet war, wurden die Fläche des gesamten Vermis und der einzelnen Lobuli (1-10) gemessen. Die Flächen der Lobuli 1 und 2, sowie 4 und 5 als auch 6 und 7 wurden bei den Einzelmessungen zusammengefasst und statistisch ausgewertet.

2.12.5 Kresylviolett- Färbung

Acetatpuffer	0.05 M Natriumacetat in H ₂ O; pH 4,0 - 4,1
Kresylviolett	0,5% in H ₂ O; pH 4,0 - 4,2

Die Gewebeschnitte auf dem Objektträger wurden 5 min in Acetatpuffer inkubiert, danach 2 min in Kresylviolettlösung gefolgt von 2 min Inkubation in Acetatpuffer. Danach wurden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%, 70%, 96%) getaucht, zweimal in Isopropanol/Ethanol (2:1) für 5 min inkubiert, in Xylol gewaschen (Roth) und mit Entellan (Merck) eingebettet.

2.12.6 Neutralrotfärbung

Neuralrot 1% Neuralrot in H₂O, (Fluka)

Die Gewebeschnitte auf dem Objektträger wurden 2-5 min in der Färbelösung inkubiert. Danach wurden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe getaucht (70%, 80%, 100%, 100%), zweimal in Xylol gewaschen und mit Entellan (Merck) eingebettet.

2.12.7 Timms-Färbung

Sucroselösung 15 % Sucrose in PBS
Entwickler 0,12 M Citronensäure-Monohydrat; 0,08 tri-Natriumcitrat (wasserfrei);
1,2 mM Gummi Arabikum; 0,15M Hydrochinon; 0,05 M AgNO₃

Nach der Perfusion (siehe 2.12.3) wurden die Hirne herauspräpariert und für zwei Nächte in PFA 4% nachfixiert. Anschliessend wurden die Hirne über Nacht in Sucroselösung inkubiert und danach in 2-Methylbutan bei – 40°C gefroren und bei -20°C gelagert. Mit einem Kryostat wurden 25 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Adhäsionsobjektträger (Histobond Superfrost) aufgefroren. Zur Vorbereitung auf die Färbereaktion wurden die Schnitte 15 min in 96%igem Ethanol inkubiert, je 2 min durch eine absteigende Alkoholreihe (96%, 70%, 50%) getaucht und in destilliertem Wasser rehydriert. Die Farbreaktion erfolgte in frisch angesetztem Entwickler für 45 min bei RT im Dunkeln. Nach 30 min Spülen unter Leitungswasser wurden die Schnitte für 20 min in Fixierlösung (Hypamfix, Illford, UK) fixiert. Danach wurden die Objektträger 30 min in Ethanol 70% gespült, mit Neuralrot gegengefärbt (siehe 2. 12.6) und in Entellan eingebettet.

2.12.8 Immunhistochemie

2.12.8.1.1 Schnittpräparate für Immunhistochemische Färbungen

Sucroselösung: 30% Sucrose in PBS

Die Gehirne wurden herauspräpariert und in Fixierlösung (PFA 4%) bei 4°C nachfixiert. Für die Färbung von CHL1, NrCAM und Synaptophysin betrug die Zeit der Nachfixation 3-6 h. Die anschließende Lagerung erfolgte in PBS bei 4°C. Mit einem Vibratom (Leica) wurden 40 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt und in PBS aufgefangen. Für die Färbung von Calbindin und des Lectins DBA erfolgte die Nachfixation über Nacht. Anschließend wurde das Gewebe in Sucroselösung über Nacht bei 4°C inkubiert und bei – 40°C in 2-Methylbutan eingefroren und bei – 20°C gelagert. Mit einem Kryostat wurden 40 µm (Calbindin-Färbung) und 60 µm (DBA-Färbung) dicke Schnitte angefertigt und in PBS aufgefangen.

2.12.8.2 Immunhistochemische Färbungen und Lectin-Färbung

Blockierpuffer: 5% BSA (Roth) in PBS

Inkubationspuffer 1: 0,25% BSA; 0,4% Triton X-100; 0,05% NaN₃ in PBS

Inkubationspuffer 2: 0,25% BSA; 0,2% Triton X-100; 0,05% NaN₃ in PBS

Die Schnitte wurden zur Entwässerung und Permeabilisierung 15 min in Methanol/PBS mit 1% H₂O₂ inkubiert und danach mehrmals mit PBS gewaschen. Anschliessend wurden die Schnitte für 1 h in Blockierpuffer bei RT blockiert und der erste Antikörper oder Biotin-gekoppeltes DBA über Nacht appliziert. Für die Färbung von Calbindin, CHL1 und DBA erfolgte diese Inkubation in Inkubationspuffer 1; für die Färbung von NrCAM erfolgte sie in Inkubationspuffer 2. Nach mehrfachem Waschen wurden die mit anti-Calbindin, anti-CHL1 und anti-Synaptophysin Antikörper inkubierten Schnitte mit Biotin-gekoppeltem zweiten Antikörpern inkubiert. Für die Calbindin-Färbung wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (Vectastain Elite ABC-Kit) für 1 h inkubiert und nach mehrfachem Waschen die Farbreaktion mit Diaminobenzidin durchgeführt. Nach dem Stoppen der Farbreaktion mit PBS und dem Aufziehen auf Superfrost Plus Objektträger wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%) entfettet und nach zweimaligem Spülen in Xylol mit Entellan eingebettet. Für die CHL1-, DBA- und

Synaptophysin-Färbung wurde für 45 min CyTM3-gekoppeltes Streptavidin (Dianova, Hamburg) 1:100 in PBS appliziert, anschliessend die Schnitte mehrfach gewaschen, auf Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingebettet. Für die NrCAM-Färbung wurden die Schnitte mit anti-Kaninchen Alexa Fluor 568 für 45 min inkubiert und ebenfalls auf Objektträger aufgezogen und mit Vectashield eingebettet.

2.12.9 Mikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen erfolgten an einem Binokular (Zeiss, Jena) ausgerüstet mit einer Digitalkamera (Powershot S40, Canon) und einem Zeiss Axioskop Mikroskop, ausgestattet mit einem Neurolucida System (MikroBrightfield, Magdeburg). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten an einem Leica DM RXE Mikroskop, ausgerüstet mit einer Spot RT cooled CCD Kamera (Visitron Systems, Puchheim). Die digitalen Bilder wurden mit der Meta View Software (Visitron Systems) erstellt. Für konfokal mikroskopische Aufnahmen wurde ein Leica TSC4D Mikroskop benutzt.

2.13 Verhaltenstests

2.13.1 Akustische Schreckreaktion und Präpuls-Inhibition

Zur Messung sensorimotorischer Informationsverarbeitung wurde die Präpuls-Inhibition der akustischen Schreckreaktion bei 18 Wildtypmäusen, 12 CHL1-defizienten, 20 NrCAM-defizienten und 12 CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen in einem Schreckreaktionsbox-System (TSE) gemessen. Akustischer Schreckreiz und Präpuls-Stimuli wurden bei einem Hintergrundrauschen von 70 dB verabreicht. Der akustische Schreckreiz (50 ms, 120 dB) wurde den Mäusen mit und ohne vorausgehenden Präpuls-Stimulus (30 ms, 100 ms vor dem Schreckstimulus) geboten, der in acht verschiedenen Intensitäten (73 bis 94 dB, in 3-dB Schritten) auftrat. Nach der Habituation in der Box für drei Minuten, erfolgten zwei Schreckreaktionsdurchgänge. Diese wurden in pseudorandomisierter Reihenfolge von 10 Schreckreaktionsdurchgängen und 5 Schreckreaktionsdurchgängen mit jeder der Präpuls-Intensitäten gefolgt. Die Intervalle zwischen den Durchgängen variierten stochastisch

zwischen 5 und 30 Sekunden. Die Schreckreaktion wurde über die reflexartige Muskelkontraktion der Mäuse mittels einer Sensorplattform gemessen.

2.13.2 Rota-Rod

Eine beschleunigende Rotierender-Stab (Rota-Rod) Apparatur (TSE) wurde zur Messung der Motorkoordination eingesetzt. Die 18 Wildtypmäuse, 12 CHL1-defizienten, 20 NrCAM-defizienten und 12 CHL1/NrCAM-doppel-defizienten Mäuse wurden zwei Trainingseinheiten am ersten Tag unterzogen. Die Geschwindigkeit der Rota-Rod Apparatur wurde innerhalb von 5 Minuten von 4 Umdrehungen pro Minute (r.p.m.) auf 40 r.p.m. beschleunigt und der zeitliche Abstand zwischen den Trainingseinheiten betrug drei Stunden. Nach einer Pause von zwei Tagen wurden die Tiere mit einer konstanten Umdrehungsgeschwindigkeit von 16, 24, 32 und 40 r.p.m. für maximal 5 Minuten pro Umdrehungsgeschwindigkeit getestet. Mäuse, die innerhalb von 30 sec vom Stab herunterfielen, wurden innerhalb der 5 Minuten noch maximal zwei weitere Male auf den Stab gesetzt.

2.14. Statistische Auswertungen

Die Daten aus Größenbestimmung des Ventrikelsystems, des Hirns und des cerebellaren Vermis wurden mit einer Ein-Weg-ANOVA mit dem Genotyp als Faktor analysiert. Die Verhaltensdaten der Schreckreaktion, der Präpuls-Inhibition und des Rota-Rod Tests wurden ebenfalls mit einer Ein-Weg-ANOVA mit dem Genotyp als Faktor analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Präpuls-Inhibition und des Rota-Rod Tests mit einer ANOVA mit wiederholten Messungen (mit den Faktoren Genotyp und Sitzung). Bei der Post hoc Analyse der Daten wurde beim Vergleich der Mittelwerte der Fischer-Test verwendet. Ein P-Wert kleiner als 0.05 ($p < 0,05$) wurde als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Interaktionspartner von CHL1: CHL1-23

Um mögliche Interaktionspartner von CHL1 zu finden, hat Frau Dr. Petra Dirks eine adulte Rattenhirn-cDNA-Bibliothek mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System durchgemustert. Mit der intrazellulären Domäne von CHL1 als bait sind bei diesem Screen $3,4 \times 10^5$ Transformanten hinsichtlich ihres Interaktionsphänotyps untersucht worden. Über Retransformationsexperimente wurden Interaktionsphänotypen verifiziert und falsch-positive Klone aussortiert. Von 25 untersuchten Hefekolonien kodierten 11 Klone für mitochondriale mRNA. Nur zu einem Klon, als CHL1-23 bezeichnet, konnte der Datenbankeintrag eines EST-Klons mit einer Homologie im 5' Bereich gefunden werden. Auf genomischer Ebene konnte die Sequenz von CHL1-23 dem Ratten-Chromosom 17 und dem Maus-Chromosom 18 zugeordnet werden. Weitere Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybridssystem zeigten eine Interaktion von CHL1-23 mit der intrazellulären Domäne von L1 und Neurofascin. Eine Interaktion mit NrCAM konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Start-Methionin der Sequenz von CHL1-23 wurde nicht gefunden.

In dem Zeitraum zwischen dem Abschluss der Arbeit von Dr. Petra Dirks und dem Beginn dieser Arbeit ist die Zahl der EST-Klone umfangreicher geworden und die Sequenzierung der Genome weiter fortgeschritten.

3.1.1 Datenbankanalyse von CHL1-23

Zahlreiche expressed sequence tag (EST) Klone aus Ratte, Maus und Mensch stimmen teilweise mit der Sequenz von CHL1-23 überein. Diese Klone wurden aus embryonalen und adulten Hirngeweben, aus Hoden- und Muskelgeweben isoliert und deuten darauf hin, dass CHL1-23 auch außerhalb des Gehirns exprimiert wird.

Abb. 3 zeigt die in Sequenzdatenbanken vorhandenen EST-Klone aus Ratte. Es gibt keinen Klon, der mit der gesamten Sequenz von CHL1-23 übereinstimmt. EST-Klone, die einen Bereich 5' von Exon A enthalten, gibt es ebenfalls nicht. Alle gefundenen Klone brechen im 5' Bereich an derselben Stelle in Exon A ab, was darauf hindeutet, dass der Sequenzabbruch technische Ursachen haben kann. Die Exons von CHL1-23 sind teilweise nur unvollständig durch die Ratten-EST-Klone repräsentiert und zusätzlich weisen die Sequenzen einiger Klone

alternativ gespleisste Exons auf. Es werden insgesamt fünf alternative Exons zwischen den Exons B und C von CHL1-23 gefunden, die alternative Spleissvarianten darstellen können.

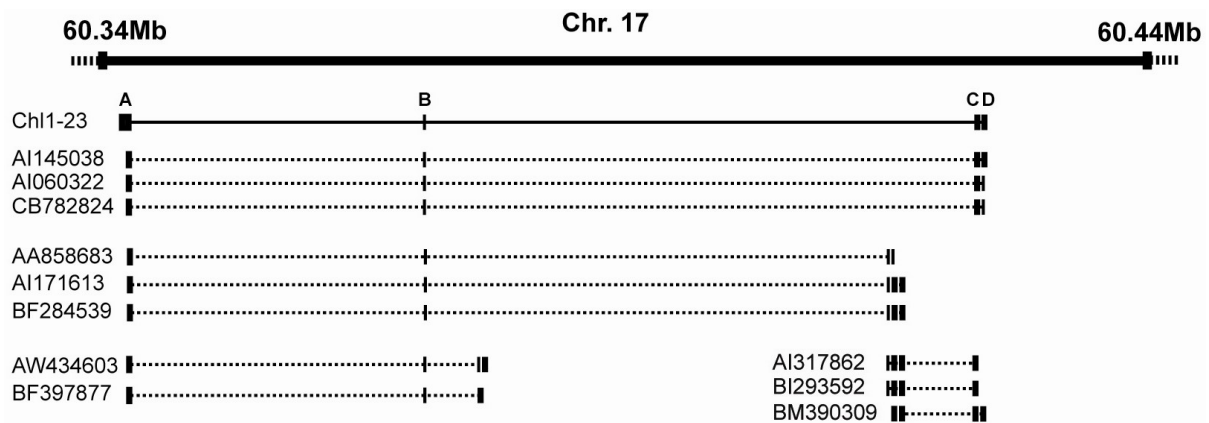


Abb. 3: EST-Klone aus Ratte

Das Chromosom 17 der Ratte ist durch einen Balken dargestellt. Rechteckige Kästen kennzeichnen die Lage der Exons in den Sequenzen. Die Sequenz von CHL1-23 ist durch eine durchgehende Linie markiert und die Exons sind mit den Buchstaben A-D beschriftet. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die EST-Klone der Ratte, die mit ihrem Datenbankeintrag aufgeführt sind. Kein EST-Klon deckt die Sequenz von CHL1-23 vollständig ab. Die Exonstrukturen der EST-Klone zeigen insgesamt fünf mögliche alternativ gespleisste Exons.

In Abb. 4 sind EST-Klone aus Ratte, Maus und Mensch im Vergleich dargestellt. Die EST-Klone der Ratte sind stellvertretend durch den EST-Klon AI145038 mit der größten Übereinstimmung mit CHL1-23 dargestellt (dicker schwarzer Balken). Es gibt zahlreiche EST-Klone aus Maus, die eine hohe Identität mit der Sequenz von CHL1-23 aufweisen. Die in Abb. 4 ausgewählten Mausklone, die die Gesamtheit der vorhandenen Mausklone am besten widerspiegeln, stimmen nur mit Bereichen aus Exon A und B von CHL1-23 überein (dünne schwarze Balken). Die zwei Klone enthalten einen Sequenzbereich von etwa 80 Basenpaare (bp) der zwischen den Exons A und B liegt und in der Sequenz von CHL1-23 nicht enthalten ist. Außerdem enthalten diese Klone Sequenzen, die etwa 70 bp weiter 5' von Exon A lokalisiert sind und damit fehlende 5' Bereiche der Ratten EST-Klone ergänzen können. Allerdings weisen auch diese Sequenzen kein Start-Methionin auf. In der humanen EST-Datenbank sind insgesamt nur drei EST-Klone eingetragen, die mit einem Teil des Exons A übereinstimmen (graue Balken).

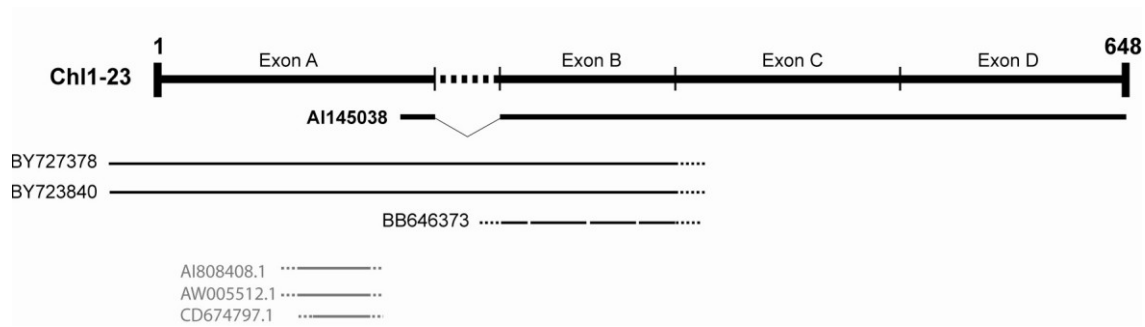


Abb. 4: EST-Klone in Ratte , Maus und Mensch

Die Exonstruktur von CHL1-23 ist durch einen schwarzen Balken, auf dem die Exons markiert sind, dargestellt. EST-Klone aus Ratte (schwarzer dicker Balken), Maus (schwarzer dünner Balken) und Mensch (graue Balken) sind mit ihrem Datenbankeintrag aufgeführt. Bereiche der EST-Klone mit geringer Übereinstimmung zu der Sequenz mit CHL1-23 sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die zwei Klone aus der Maus weisen einen Sequenzabschnitt vor Exon B auf, der mit CHL1-23 nicht übereinstimmt und zusätzlich einen Abschnitt, der im 5' Bereich von Exon A liegt. Die humanen Klone stimmen nur mit einem Abschnitt in Exon A überein.

Das cDNA-Insert von CHL1-23 umfasst 670 bp und kann vier Exons (A-D) auf Chromosom 17 der Ratte zugeordnet werden. Die Sequenz weist ebenfalls eine Übereinstimmung mit dem Chromosom 18 der Maus und dem Chromosom 10 des Menschen auf. Basierend auf dem Leseraster aus dem Hefe-Zwei-Hybrid System, ist das auf dieser Sequenz lokalisierte offene Leseraster dieser Sequenz 115 Aminosäuren (AS) lang und endet in Exon C (Abb. 5).

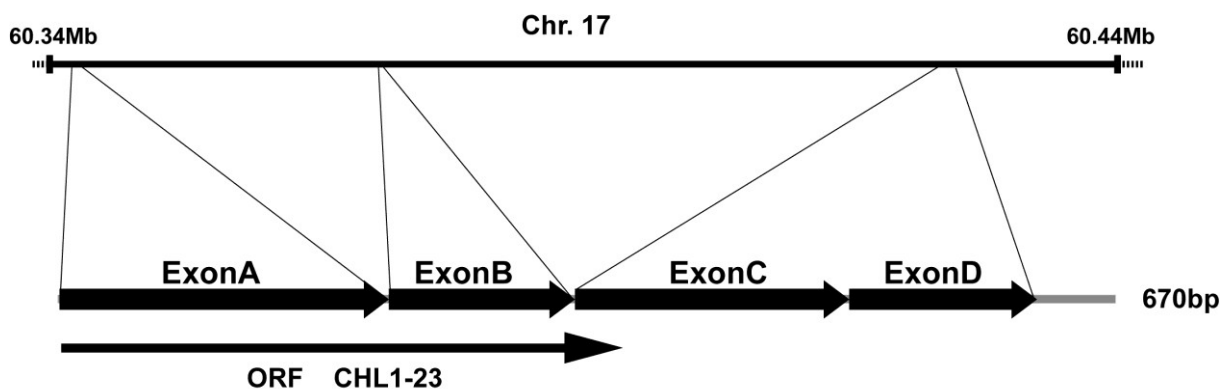


Abb. 5: Exonstruktur und genomische Lokalisation von CHL1-23

Das Chromosom 17 der Ratte ist durch einen Balken gekennzeichnet. Exons und offenes Leseraster sind durch Pfeile dargestellt. Die Sequenz von CHL1-23 ist 670 Nukleotide lang und weist 4 Exons auf. Das offene Leseraster endet in Exon C. Abkürzung: ORF, offenes Leseraster

Genomisch ist die Nukleotidsequenz von CHL1-23 ein Teil des vorhergesagten unvollständigen Gens Q8C819 in der Ratte, das 3' von dem Transkriptionsfaktor TCF8 auf demselben Strang, dem Plus-Strang, liegt. Die Vorhersage dieses möglichen Gens basiert zum Teil auf der Übereinstimmung chromosomaler Sequenzen von Ratte und Maus im Bereich von Exon A. Daher ist dieser Abschnitt in Abb. 6 im Genom der Ratte wahrscheinlich auch als Q8C819-MOUSE bezeichnet worden. Im synthetischen Abschnitt auf Chromosom 18 der

Maus liegt Q8C819 im 5'-Bereich von TCF8 und ist auf dem Minus-Strang codiert. Der Anfang der Sequenz von Q8C819 liegt hier im ersten Intron von TCF8. Der synthene Bereich im Menschen ist auf Chromosom 10 lokalisiert, wird von zahlreichen EST-Klonen abgedeckt und liegt wie in der Maus 5' von TCF8. Wie in der Maus liegt der bisher annotierte Anfang der Sequenz von Q8C819 im ersten Intron von TCF8 und überlappt leicht mit dem Transkriptionsfaktor auf dem Gegenstrang. Auf der Grundlage der bisher bekannten EST-Klone wird in der Datenbank ein unbekanntes unvollständiges Protein für Ratte und Maus vorhergesagt Für den Menschen ist jedoch bisher noch kein Protein vorhergesagt worden (Abb. 6).

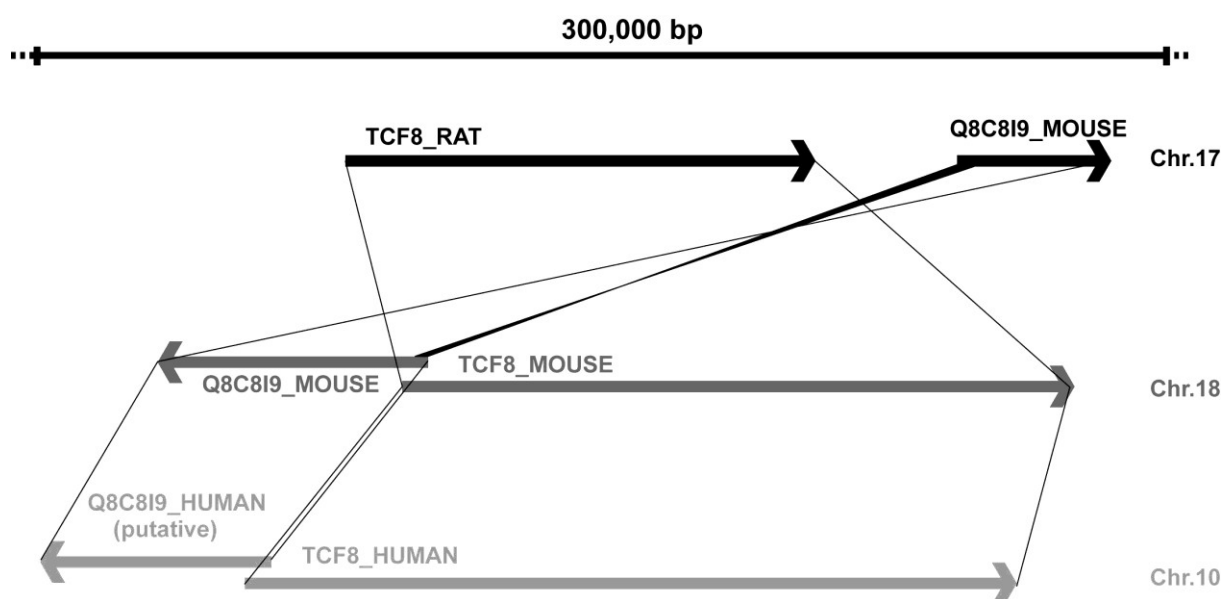


Abb. 6: Genomische Lokalisation von Q8C819 in synthenen Bereichen von Ratte, Maus und Mensch

Der Balken repräsentiert die genomische Ausdehnung der dargestellten Genbereiche. Die Orientierung von Q8C819 und TCF8 ist mit Pfeilen in Ratte (schwarz), Maus (grau) und Mensch (hellgrau) dargestellt. Im Gegensatz zu der Orientierung in der Ratte ist Q8C819 in Maus und Mensch auf dem Gegenstrang codiert. Der Ausdruck „putativ“ soll verdeutlichen, dass in der Datenbank noch kein entsprechendes Protein vorhergesagt ist.

Das unbekannte, unvollständige Protein Q8C819 in Ratte und Maus stimmt teilweise mit der Aminosäuresequenz von CHL1-23 überein und weist zwei mögliche Transmembrandomänen auf. Der Bereich mit der größten Übereinstimmung bricht jedoch nach dem Exon A ab (Pfeil in Abb.7) und schließt den Bereich der möglichen Transmembrandomänen nicht mit ein (Abb. 7).

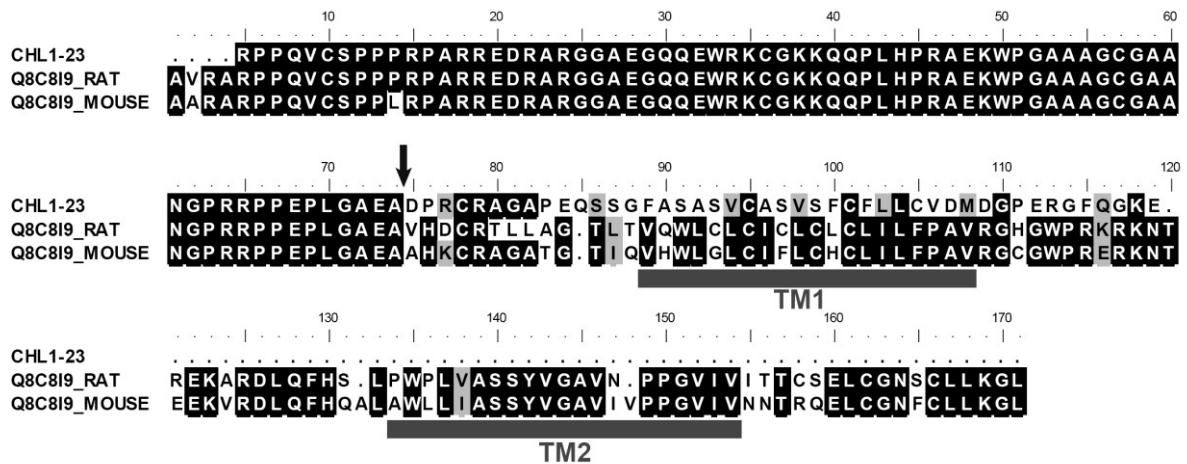


Abb. 7: Partielle Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von CHL1-23 mit Q8C819

Aminosäuresequenzen von CHL1-23 und dem vorhergesagten, unvollständigen Protein Q8C819 in Ratte und Maus. Identische Bereiche sind schwarz unterlegt und ähnliche Bereiche grau. Die Aminosäuresequenz von CHL1-23 stimmt mit der Sequenz des vorhergesagten, unvollständigen Proteins Q8C819 bis zum Ende des Exons A (Pfeil) überein. Für Q8C819 sind zwei Transmembrandomänen vorhergesagt und als graue Balken dargestellt. Abkürzungen: TM1, Transmembrandomäne 1; TM2, Transmembrandomäne 2

3.1.2 Screen einer cDNA Bank, RT-PCR und RACE

Um die cDNA von CHL1-23 zu vervollständigen, wurde eine adulte Maushirn cDNA Bank (Rapid-Screen cDNA Library Panel: Mouse Adult Brain; OriGene Technologies, Inc.; Rockville, Maryland), die auf die Identifikation langer cDNAs und ihrer 5'Enden ausgerichtet ist, durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit zwei genspezifischen Primern gescreent. Nach mehrfachen Versuchen konnte kein entsprechendes PCR-Produkt erzeugt werden. Im darauf folgenden Ansatz wurde eine weitere Maus cDNA Bank (Marathon-Ready™ cDNA; Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) als Ausgangsmaterial für eine 5'RACE (rapid amplification of cDNA ends) benutzt. Diese cDNA war bereits mit denen für diese Methode vorgesehenen Adaptoren versehen, und das gewünschte Produkt sollte über eine PCR mit einem genspezifischen Primer und einem Adaptorprimer und nachfolgender nested-PCR der Produkte aus der ersten PCR detektiert werden. Dieser Ansatz führte jedoch nur zu unspezifischen PCR-Produkten. Im Anschluss daran erfolgte die Isolation von mRNA aus einem Gehirn einer 14 Tage alten Maus. In einem weiteren RACE-Ansatz wurde diese mRNA mit einem genspezifischen antisense Primer revers transkribiert. Da die Sequenz von CHL1-23 in ihrem 5'Bereich GC-reich ist (streckenweise über 80%), erfolgte dieser Schritt mit einer reversen Transkriptase, die bei 55°C arbeiten kann und somit die Transkription über mögliche sekundärstruktureiche Abschnitte hinweg erleichtert. Danach

wurde die mRNA degradiert und der cDNA ein poly-A Anker angefügt und die PCR mit einem genspezifischen nested-Primer und einem oligo-dT Ankerprimer durchgeführt. Anschließend wurde das Produkt in einer weiteren PCR mit einem genspezifischem *nested*-Primer und einem nested-Ankerprimer amplifiziert. Auch diese Methode führte nur zu unspezifischen PCR-Produkten. Daher erfolgte der nächste RACE-Versuch mit der Capfinder-Strategie. Bei dieser Methode werden nur cDNAs mit voller Länge in der RACE eingesetzt, da freie 5'OH-Enden durch das Enzym calf internal phosphatase (CIP) degradiert werden und nur durch capping geschützte mRNAs übrig bleiben. Die caps werden mit Hilfe der Nikotinsäure-Pyrophosphatase abgespalten und ein Adaptor mit bekannter Sequenz angelagert. Nach der reversen Transkription erfolgt die PCR mit einem genspezifischen Primer und dem Adaptorprimer am 5' Ende und darauf folgt eine weitere nested-PCR. Da wieder nur unspezifische PCR-Produkte erfasst wurden, erfolgte ein weiterer Versuch mit einer thermostabilen Polymerase, die auch reverse Transkriptaseaktivität aufweist. Dieses Enzym wurde für die reverse Transkription bei 70°C eingesetzt, um mögliche störende Sekundärstrukturen der mRNA aufzulösen. Auch diese Methode blieb erfolglos. Neben den in den entsprechenden RACE-Kits empfohlenen Kontrollen, wurde zur Kontrolle der Ausgangsmaterials die mRNA mit oligo-dT Primern revers transkribiert und ein Teil der cDNA von CHL1-23 mit zwei genspezifischen Primern amplifiziert und die PCR-Produkte kloniert und sequenziert.

3.1.3 Expression von CHL1-23 mRNA während der Entwicklung

Ein weiterer Nachweis der Transkripte von CHL1-23 fand durch eine *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden statt. Die entwicklungsabhängige Expression von CHL1-23 wurde zu den embryonalen Zeitpunkten E13, E16 und den postnatalen Zeitpunkten P1, P5, P14, P21, 3 Monate und 15 Monate untersucht und im gesamten Hirn (E13) und in verschiedenen Hirnregionen wie dem olfaktorischen Bulbus, cerebralen Cortex, Hippocampus, Thalamus und Cerebellum dargestellt.

Die Expression von CHL1-23 konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten in jeder Hirnregion detektiert werden. Während der Embryonalentwicklung am Embryonaltag 13 waren die Transkripte besonders stark in den sich entwickelnden Strukturen vom olfaktorischen Bulbus, cerebralen Cortex, Hippocampus und dem basalen Vorderhirn in der Nähe der lateralen Ventrikel exprimiert (Abb. 8). Starke Expression konnte jedoch auch außerhalb des Gehirns nachgewiesen werden (Pfeil in Abb.8)

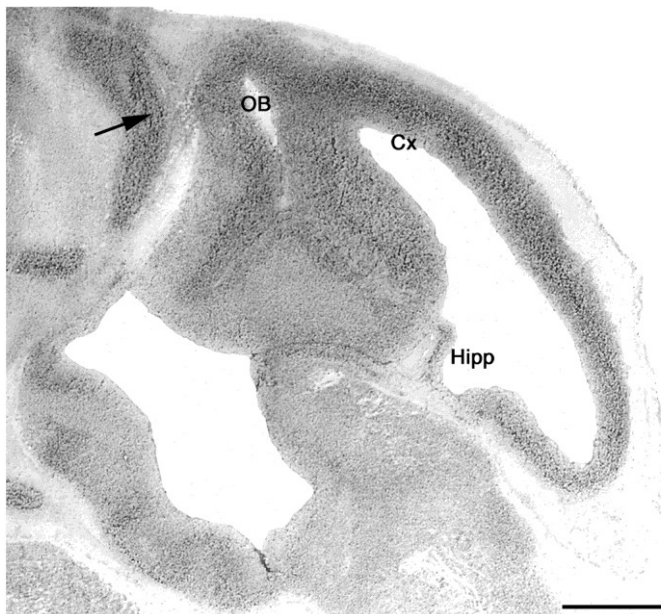


Abb. 8: Expression von CHL1-23 am Embryonaltag 13
CHL1-23 mRNA ist im olfaktorischen Bulbus (OB), dem sich entwickelnden cerebralen Cortex (Cx) und Hippocampus (Hipp) stark exprimiert. Außerhalb des Gehirns wird ebenfalls starke CHL1-23 Expression detektiert (Pfeil). Maßeinheit: 300 μ m.

In den postnatalen Stadien P5, P14 und 15 Monate war die vorwiegend neuronale Expression von CHL1-23 in allen untersuchten Regionen detektierbar (Abb. 9). Eine eindeutige Veränderung der Expressionsstärke war jedoch nur im Hippocampus und im Thalamus zu beobachten. In anderen Strukturen wie im olfaktorischen Bulbus und im Cerebellum ist die unterschiedliche Erscheinung der Struktur am Tag P5 auf deren unvollständigen Entwicklungsstand zurückzuführen und eine quantitative Aussage zur Expression im Vergleich mit späteren Stadien ist daher schwierig.

Im olfaktorischen Bulbus ist CHL1-23 zu diesen Zeitpunkten in der glomerulären Schicht und in der Körnerzellschicht exprimiert und wird ab P14 auch in der Mitralzellschicht detektiert. Im cerebralen Cortex ist die Expression in jeder der sechs neuronalen Schichten in etwa gleichem Ausmaß vertreten. Die Expression von CHL1-23 im Hippocampus wird in den Körnerzellen der Gyrus Dentatus, den Hilus, den Pyramidenzellen des Ammonshorns (CA1-CA3), im Stratum oriens und dem Subiculum detektiert. Am Tag P14 ist die Expression gegenüber dem Tag P5 verstärkt und nach 15 Monaten deutlich geringer als in den Stadien zuvor. In den zahlreichen Kernen des Thalamus folgt die entwicklungsabhängige Expression einem ähnlichen Zeitverlauf. In einigen Zellen ist die Expression am Tag P14 gegenüber Tag P5 verstärkt und nimmt nach 15 Monaten deutlich ab. In der sich entwickelnden Struktur des Cerebellums ist CHL1-23 in der äusseren und in der inneren Körnerzellschicht vertreten, sowie in einigen tiefen Cerebellarkernen. Zu den späteren Zeitpunkten wird die Expression in den tiefen Cerebellarkernen, in den Purkinjezellen, der Körnerzellschicht und in der molekularen Schicht detektiert (Abb. 9).

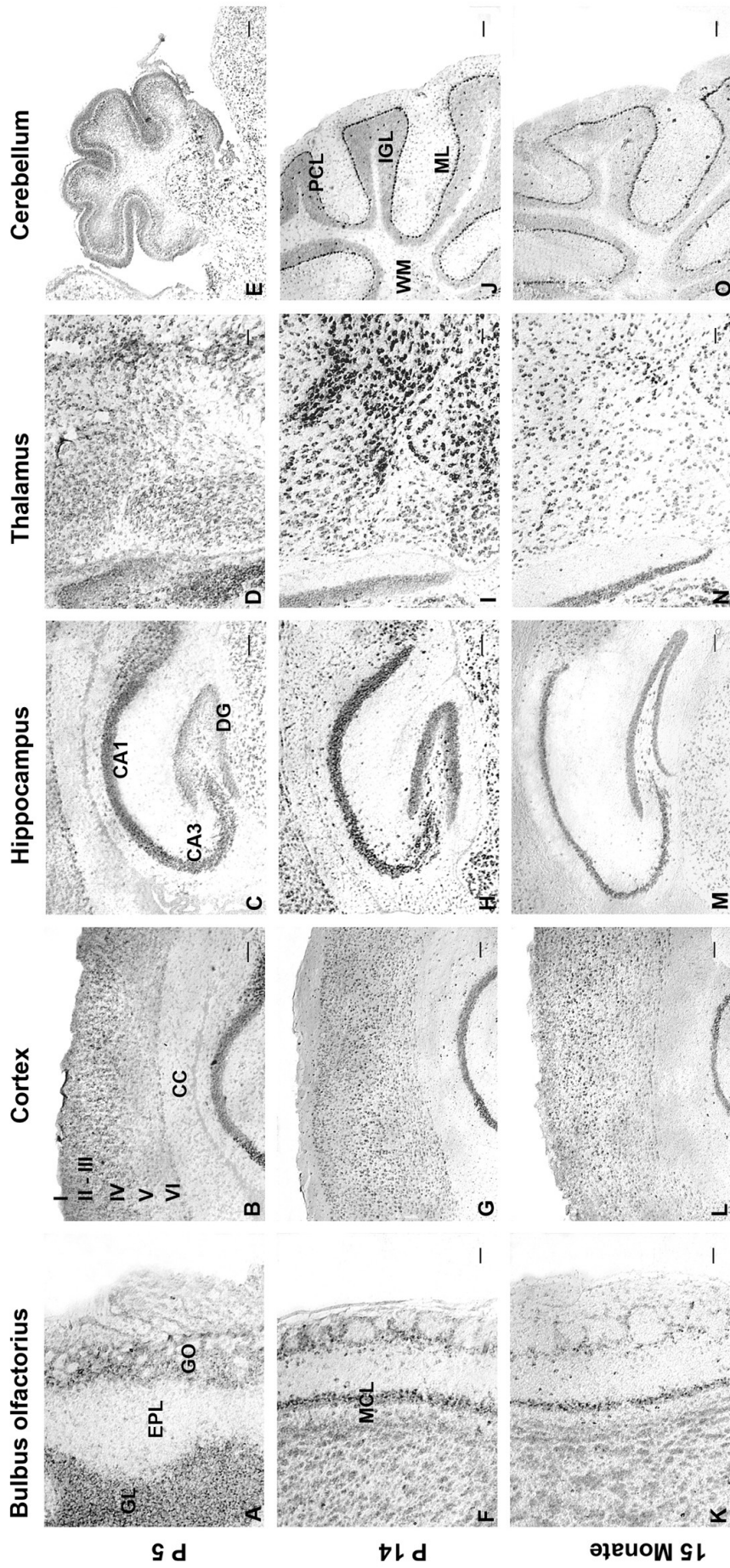


Abb. 9: Postnatale entwicklungsabhängige Expression von CHL1-23
 CHL1-23 wurde zu den Zeitpunkten P5, P14 und 15 Monate in allen untersuchten Hirnregionen detektiert. Im Gegensatz zum olfaktorischen Bulbus, dem cerebralen Cortex und dem Cerebellum zeigen Hippocampus und Thalamus eine verstärkte Expression von CHL1-23 zum Zeitpunkt P14 in ähnlich ausgeprägten Bereichen. Abkürzungen: I-VI: corticale Schichten I-IV; CA1 und CA3: Regionen des Ammonshorns; CC: Corpus Callosum; EPL: äussere plexiforme Schicht; DG: Gyrus Dentatus; GL: Körnerzellschicht; GO: glomeruläre Schicht; IGL: innere Körnerzellschicht; MCL: Mitralzellschicht; ML: Molekularschicht; PCL: Purkinjezellschicht; WM: weisse Substanz; Masseinheit: 100 µm

3.1.4 Interaktion im Hefe-Zwei-Hybridssystem

Um die Interaktion von CHL1-23 mit CHL1 weiter einzugrenzen, wurden Konstrukte kloniert, die einzelne Exons und Exonkombinationen von CHL1-23 enthielten. In der Tab. 1 sind die Ergebnisse der getesteten Konstrukt-Kombinationen dargestellt. Die schon beschriebene Interaktion von CHL1-23 mit CHL1 konnte bestätigt werden und ebenso das Ausbleiben der Interaktion mit NrCAM. Es zeigte sich weiterhin, dass die von den Exons A, B und C codierten Proteine von CHL1-23 allein für eine Interaktion mit CHL1 nicht ausreichen. Für die Interaktion mit CHL1 werden die von den Exons A und B codierten Proteine zusammen benötigt. Die von Exon C codierten Aminosäuren sind für diese Interaktion nicht relevant.

	Wachstumstest		
	CHL1	NrCAM	pGBK – T7
CHL1 – 23 <i>full length</i>	+++	-	-
Exon ABC	+++	-/-	-/-
Exon AB	+++	-/-	-/-
Exon A	-	-/-	-/-
Exon B	-	-/-	-/-
Exon C	-	-/-	-/-
pACT 2	-	-/-	-/-

Tab. 1: Interaktion von CHL1-23 mit CHL1 im Hefe-Zwei-Hybrid System

Test einer Interaktion von CHL1-23 und weiteren Konstrukten von CHL1-23 mit den intrazellulären Domänen von CHL1 und NrCAM. Für eine Interaktion von CHL1-23 mit CHL1 werden die von den Exons A und B codierten Proteine benötigt. Eine Interaktion von CHL1-23 mit NrCAM findet nicht statt. Starkes Wachstum der Kolonien ist durch +++ dargestellt, kein Wachstum durch – und nicht getestete Interaktion durch -/-.

3.1.5 Transfektion von COS-7 Zellen

Um die Interaktion von CHL1-23 mit CHL1 in einem weiteren System zu testen, wurden COS-7 Zellen transient mit CHL1-23 und CHL1 transfiziert. GFP-CHL1-23 Fusionsproteine werden im cytoplasmatischen Bereich detektiert. Sie bilden kleine bis sehr große Aggregate, die bis auf den Zellkern, den gesamten übrigen intrazellulären Bereich auszufüllen scheinen. CHL1 wurde mit CHL1 Antikörpern angefärbt und ist im Gegensatz zu CHL1-23 nur an der Plasmamembran lokalisiert. In kotransfizierten Zellen ist keine Kolo­kalisierung von CHL1-23 mit CHL1 erkennbar. Daher kann dieser Ansatz keine weitere Bestätigung der Interaktion beider Moleküle liefern (Abb.10).

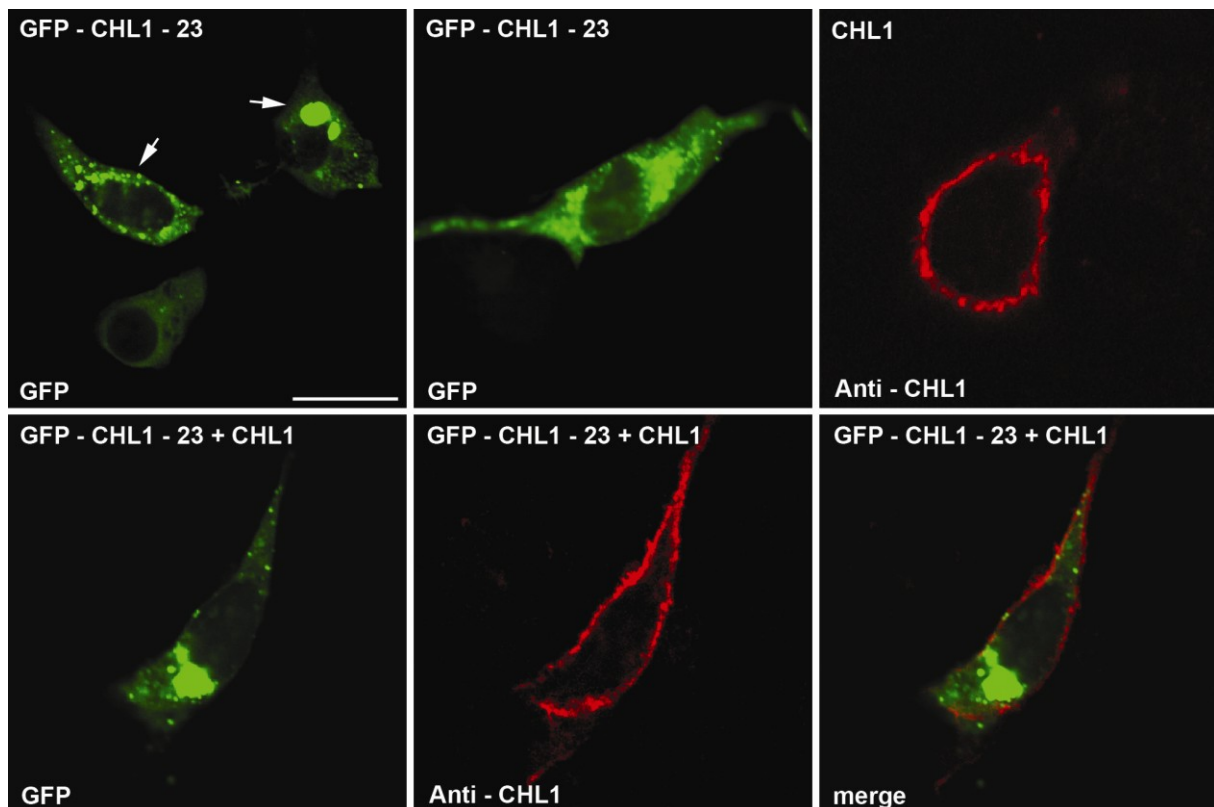


Abb. 10: Transiente Transfektion von COS-7 Zellen

Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation von GFP-CHL1-23 und CHL1 in transient transfizierten COS-7 Zellen. GFP-CHL1-23 wird in Aggregaten unterschiedlicher Größe im Cytoplasma detektiert, während CHL1 durch eine Färbung mit einem CHL1 Antikörper ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert ist. Die Maßeinheit entspricht 20 µm.

3.1.6 Erzeugung von Peptidantikörpern gegen CHL1-23

Um CHL1-23 auf der Proteinebene zu charakterisieren wurden Peptidantikörper gegen CHL1-23 erzeugt. Die Herstellung der Peptidantikörper erfolgte durch den Pineda Antikörper Service. Die Peptidsequenz von CHL1-23 wurde auf ihre Antigenizität überprüft und die zwei am besten geeigneten Sequenzen von 16 Aminosäuren für die Herstellung der entsprechenden Peptide ausgewählt und an das Trägerprotein KLH gekoppelt. Die Sequenz von Peptid 1 lautet: **A N G P R R P P E P L G A**. Die Sequenz von Peptid 2 lautet: **C V D M D G P E R G F Q G K E Stop**.

Von acht zur Auswahl gestellten Präimmunseren wurden die Präimmunseren von vier Kaninchen ausgewählt, deren Immunreaktivität auf einem Western Blot mit Maushirnhomogenat am Geringsten ausgeprägt war. Es erfolgte darauf die Immunisierung von zwei der ausgewählten Kaninchen mit Peptid 1 und die Immunisierung von zwei weiteren Kaninchen mit Peptid 2. Da die vier Antiseren das Glutathion-S-Transferase-CHL1-23-Fusionsprotein (GST-FP) im Western Blot am Tag 60 nach der Immunisierung erkannten, erfolgte die Ausblutung der Tiere am Tag 90 nach der Immunisierung. Im Anschluss daran wurde die gesamte IgG-Fraktion der Immunseren aufgereinigt. Die Bezeichnung der aus der Immunisierung mit dem ersten Peptid gewonnenen Antikörper ist 1.1 und 1.2. Die Antikörper aus der Immunisierung mit dem zweiten Peptid sind als 2.1 und 2.2. bezeichnet worden.

Im Zeitraum der Immunisierung der Kaninchen durch den Antikörperservice wurden GST-Proteine und GST-FP in Bakterien hergestellt. GST hat ein Molekulargewicht von 29 kDa. Die Peptidsequenz, die dem cDNA-Insert von CHL1-23 entspricht, hat ein von 13 kDa. Das GST-CHL1-23 Fusionsprotein hat daher ein Molekulargewicht von 42 kDa. Abbildung 11 zeigt einen Western Blot, mit dem GST-Proteine und GST-FP aus E. Coli Lysaten mit einem anti-GST Antikörper nachgewiesen werden können. Lysate von IPTG-induzierten Kulturen sind im Vergleich zu uninduzierten Kulturen dargestellt. GST wird von den Antikörpern bei etwa 30 kDa erkannt, das FP liefert dagegen mehrere Banden. Die höchste Bande läuft bei über 40 kDa und repräsentiert wahrscheinlich das GST-FP in voller Länge, während die Banden darunter einen Abbau des Fusionsproteins anzeigen. In einem mit Coomassie gefärbten Gel treten von den Lysaten der GST und GST-CHL1-23 exprimierenden Kulturen vergleichbare Banden wie im Western Blot gegenüber den Lysaten der nicht induzierten Kulturen hervor (Abb. 11 A und B).

Abbildung 11 C zeigt einen Western Blot mit GST und GST-CHL1-23 Fusionsproteinen aus Bakterienlysaten. Alle vier Antikörper erkennen das GST-Fusionsprotein auf gleicher Höhe zwischen 33 und 40 kDa, während GST allein nicht erkannt wird. Das GST-Fusionsprotein zeigt gegenüber der zu erwartenden Größe von 42 kDa ein abweichendes Laufverhalten. Die etwas kleinere Bande ist möglicherweise das vorherrschende Abbauprodukt des ursprünglichen Fusionsproteins. Bei den weiteren schwach ausgeprägten Banden zwischen 33 und 40 kDa von den Antikörpern 1.1 und 1.2 könnte es sich ebenfalls um geringe Mengen des Fusionsproteins oder um eine Kreuzreaktivität handeln. Die Banden bei 55 kDa erscheinen unabhängig vom Vorhandensein des Fusionsproteins und sind damit ebenfalls einer Kreuzreaktivität mit weiteren Proteinen aus dem Bakterienlysaten zuzuschreiben. Die Möglichkeit, dass CHL1-23 von Bakterien exprimiert wird, kann aufgrund eines Sequenzvergleichs in den Datenbanken ausgeschlossen werden.

Die Immunreaktivität der vier Antikörper auf Western Blots mit Maushirnhomogenaten ist in Abb. 11 D dargestellt. Für die Antikörper 2.1 und 2.2. ist auch ihre Immunreaktivität auf Blots mit Rattenhirnhomogenaten im Vergleich dargestellt. Diese Antikörper sind aus der Immunisierung mit dem zweiten Peptid hervorgegangen und die zugrunde liegende Sequenz des Peptids weicht in der Maus von der Ratte ab. Bis auf den Antikörper 1.2 liefert die Immunreaktivität der übrigen Antikörper ein deutliches Bandenmuster, das sich zwischen etwa 30 kDa und 90 kDa erstreckt. Der Vergleich zwischen Ratte und Maus lässt dabei ein ähnliches Muster erkennen. Die vollständige Sequenz von CHL1-23 ist jedoch nicht bekannt und daher auch nicht die zu erwartenden Bandengrößen des Proteins im Western Blot. Eine Zuordnung der von den Antikörpern erkannten Banden zu dem Protein CHL1-23 ist dadurch unmöglich. Da bei der Verdünnung von 1: 10000 eine deutliche Immunreaktivität der Antikörper 1.1, 2.1, 2.2. nachgewiesen wird, handelt es sich vermutlich um eine spezifische Reaktionen.

Da das Bandenmuster des Antikörpers 1.1 am klarsten strukturiert ist, wurde für diesen Antikörper ermittelt, wie die Immunreaktivität zwischen der groben Membranfraktion und dem Überstand verteilt ist. Aus Abb. 11 E geht hervor dass die Immunreaktivität dieses Antikörpers in beiden Fraktionen zu finden ist. Das Bandenmuster im Überstand ist dabei vielfältiger als das Bandenmuster in der groben Membranfraktion und erstreckt sich zwischen ca. 50 bis 70 kDa.

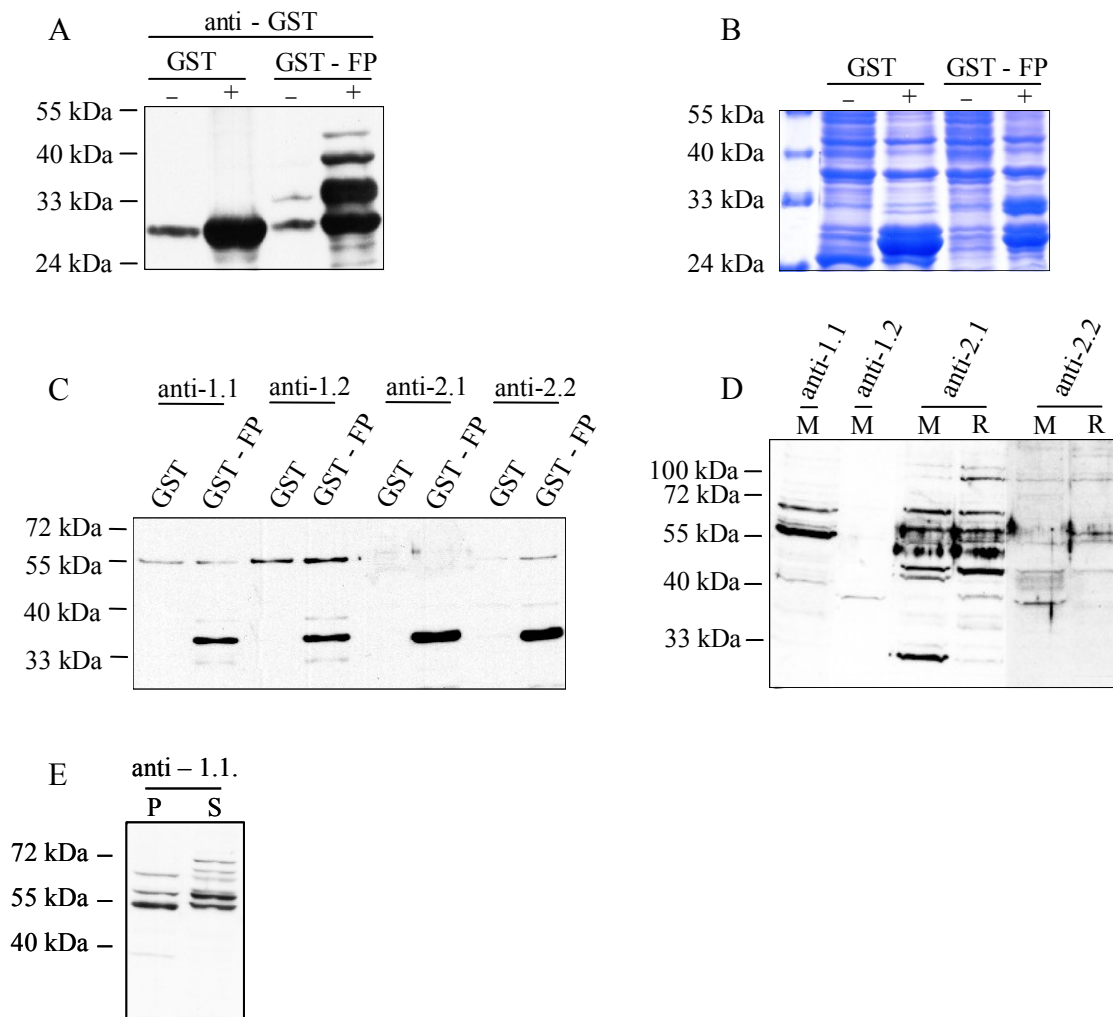


Abb. 11: CHL1-23 Peptidantikörper

(A) Western Blot mit 10 μ g E. Coli Lysat von induzierten (+) und uninduzierten (-) Kulturen, die mit GST und GST-CHL1-23 (GST-FP) transformiert wurden. GST Antikörper erkennen GST und GST-CHL1-23 in den Lysaten induzierter Kulturen und in geringen Umfang auch in den uninduzierten Kulturen. Das Bandenmuster von GST-CHL1-23 deutet auf den Abbau des Fusionsproteins hin. (B) Coomassie-gefärbtes Gel mit 20 μ g E. Coli Lysat von mit GST und GST-CHL1-23 (GST-FP) transformierten induzierten (+) und uninduzierten (-) Kulturen. In den Lysaten der induzierten Kulturen tritt ein ähnliches Bandenmuster hervor wie im Western Blot (A). (C) Western Blot mit 0,2 μ g E. Coli Lysat von Kulturen, die GST und GST-CHL1-23 (GST-FP) exprimieren. Die Antikörper 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 erkennen eine GST-CHL1-23-Bande zwischen 33 und 40 kDa. GST wird nicht erkannt. Andere schwache Banden werden von den Antikörpern 1.1, 1.2 und 2.2 erkannt. Eine Bande bei 55 kDa wird unabhängig von der Expression von GST-CHL1-23 erkannt. (D) Western Blot mit 20 μ g Hirnlysaten. Die Antikörper 1.1, 1.2, 2.1, 2.2 (Verdünnung 1: 10000) erkennen mit Ausnahme von 1.2 ein deutliches Bandenmuster in Maushirnlysaten (M). Für die Antikörper 1.1 und 1.2 sind die Bandenmuster auch mit Rattenhirnlysaten (R) dargestellt. (E) Western Blot mit 20 μ g der Membranfraktion (P) und des Überstandes (S) von Maushirnhomogenaten. Der Antikörper 1.1 erkennt CHL1-23 in beiden Fraktionen.

3.1.7 Zwei-dimensionale Auftrennung von Proteinen und massenspektrometrische

Analyse

Die zwei-dimensionale Auftrennung von Proteinen wurde benutzt, um über die massenspektrometrische Analyse von Proteinen, die der CHL1-23 Antikörper 1.1. erkennt, noch fehlende Peptidsequenzen von CHL1-23 zu ermitteln

Dazu wurde das Maushirnhomogenat einer subzellulären Fraktionierung unterzogen und das daraus resultierende mikrosomale Pellet und der Überstand getrennt analysiert. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung von Proteinen nach dem Isoelektrischen Punkt zwischen pH 3 und pH 11. Die Auftrennung in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht trennte Proteine zwischen ca. 10 und 100 kDa. Abbildung 12 zeigt zwei-dimensional aufgetrennte Proteine aus beiden Fraktionen des Maushirnhomogenates. Abb. 12 A zeigt die Proteine der Auftrennung des mikrosomalen Pellets, die von dem Antikörper 1.1 im Western Blot angefärbt wurden. Übereinstimmende Spots sind im Coomassie-gefärbten Gel (B) für die massenspektrometrische Analyse ausgestochen worden. In Abb. 12 C sind die Proteine der Auftrennung des Überstandes, die der Antikörper 1.1 detektiert, im Western Blot dargestellt. Auch von dieser Fraktion sind übereinstimmende Spots im Coomassie-Gel ausgestochen worden. Die vom Antikörper detektierten Spots beider Fraktionen weisen Isoelektrische Punkte zwischen ca. pH 5 und pH 9 auf und haben ein Molekulargewicht zwischen 20 und über 70 kDa. Diese Angaben sind eher grobe Schätzungen, da Blots und Coomassie-Gele durch behandlungsbedingte Größenverzerrungen nicht genau in Übereinstimmung gebracht werden können. Die Proteine dieser Spots wurden nach ihrer Aufarbeitung einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Der Vergleich der Massenspektren aus dem theoretischen tryptischen Verdau der bekannten Sequenz von CHL1-23 mit den Massenspektren der Proteine der ausgestochenen Spots zeigt keine Übereinstimmung. Daher gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass in einem der ausgestochenen Spots das Protein CHL1-23 enthalten ist und eine Sequenzierung dieser Proteine wurde daher nicht durchgeführt.

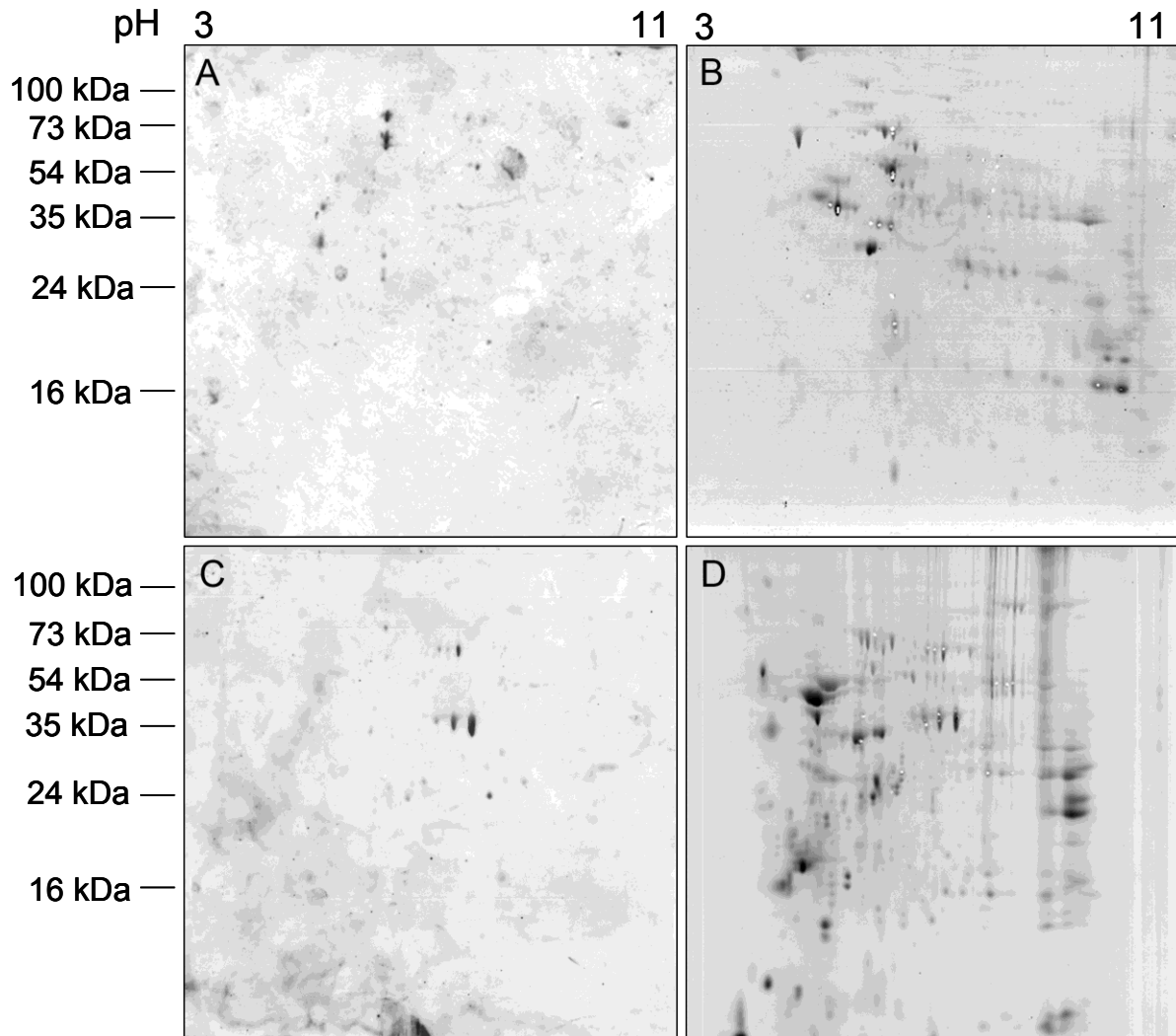


Abb. 12: Zwei-dimensionale Auftrennung von Proteinen

Western Blots (A,C) und Coomassie-Gele (B, D) mit 500 µg Protein. In der ersten Dimension erfolgte die Auftrennung von Proteinen mit einem isoelektrischen Punkt zwischen pH 3 und pH 11 und in der zweiten Dimension die Auftrennung von Proteinen zwischen ca. 10 bis 100 kDa. Übereinstimmende Spots aus der mikrosomalen Fraktion, die der CHL1-23 Antikörper 1.1 im Western Blot erkennt (A), sind im Coomassie-gefärbten Gel dieser Fraktion (B) ausgestochen worden. Mit den Spots aus der Fraktion des Überstandes ist genauso verfahren worden (C, D).

3.2 Morphologische Veränderungen bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen: Proteinexpression und axonale Wegfindung, ventrikuläres System und Cerebellum

In dieser Arbeit wurden CHL1-defiziente Mäuse (Montag-Sallaz et al., 2002) und NrCAM-defiziente Mäuse aus dem Labor von Dr. F. Rathjen (More et al.; 2001) untersucht. Durch das Kreuzen von CHL1-defizienten Mäusen mit NrCAM-defizienten Mäusen erfolgte die Zucht von CHL1/NrCAM-doppel-defizienten Mäusen. Die Genotypen der einzel- und doppelmutanten Mäuse wurde durch Isolation von genomischer DNA aus Schwanzgewebe mit nachfolgender Genotypisierungs-PCR identifiziert (siehe Anhang).

Auf der Grundlage der Arbeiten von Montag-Sallaz et al. (2002) und Sakurai et al. (2001) erfolgte in dieser Arbeit ein Vergleich von adulten CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen bezüglich der Proteinexpression und der axonalen Wegfindung im Hippocampus und olfaktorischen Bulbus und der Morphologie des ventrikulären Systems und des Cerebellums.

3.2.1 Expression von CHL1 und NrCAM im Hippocampus und olfaktorischem Bulbus

Im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus wurden die Proteinexpressionsmuster von CHL1 und NrCAM in Sagittalschnitten adulter Wildtypmäuse untersucht (Abb. 13).

Die Moosfasern im Hippocampus sind die Axone der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* und projizieren in die hippocampale CA3 Region (Übersichtsartikel: Amaral und Witter 1989; Forster et al., 2006; Frotscher et al., 2006). CHL1 ist hauptsächlich auf diesen Moosfasern und im *Subiculum* exprimiert. Eine deutliche Expression ist ebenfalls in der inneren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* und im *Stratum oriens* des Ammonshorns zu erkennen. Der übrige Hippocampus ist mit Ausnahme der Körner- und Pyramidalzellschicht schwach diffus gefärbt. Im Gegensatz zu der Expression von CHL1 ist NrCAM in diffuser Weise in vielen Bereichen des Hippocampus stark exprimiert, ohne dass sich die Moosfasern von den übrigen Strukturen abheben. Eine verstärkte Expression umrandet einige Körnerzellen und Pyramidenzellen, deren Zellkörper nicht gefärbt sind. Im *Stratum lacunosum-moleculare* ist die Färbung etwas schwächer ausgeprägt. Zur Kontrolle dieser Färbungen wurden auch die Hippocampi CHL1- und NrCAM-defizienter Mäuse mit entsprechenden Antikörpern gegen CHL1 bzw. NrCAM gefärbt. In diesen Färbungen ist nur ein schwacher unspezifischer

Hintergrund zu erkennen, der die Interpretation der übrigen Färbungen nicht in Frage stellt (Abb. 13).

Im nasalen Riechepithel liegen die primären olfaktorischen sensorischen Neurone, deren Axone in die glomeruläre Schicht des olfaktorischen Bulbus projizieren (Übersichtsartikel: Mori et al., 1999; Mombaerts, 2006) (Abb. 14). Dort verzweigen sich diese Axone innerhalb eines Glomerulus und projizieren dort auf die Dendriten der Mitral- und Tufted-Zellen. Obwohl CHL1-mRNA im olfaktorischen Bulbus nicht exprimiert wird (in situ Hybridisierung; Montag-Sallaz et al.; 2002), ist die Proteinexpression auf den einwachsenden primären sensorischen Neuronen zu erkennen. Die Proteinexpression von NrCAM zeigt im Gegensatz zu der Expression von CHL1 ein komplementäres Muster: NrCAM ist im gesamten olfaktorischen Bulbus exprimiert außer in der glomerulären Schicht. Nur einige periglomeruläre Zellen an der Grenze zur äußeren plexiformen Schicht sind von NrCAM-Färbung umrandet und bilden eine Ausnahme.

Sowohl der Hippocampus als auch der olfaktorische Bulbus sind Hirnregionen, die klar abzugrenzende axonalen Projektionen aufweisen. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde in beiden Regionen die axonale Wegfindung der einzel- und doppelmutanten Mäuse exemplarisch untersucht.

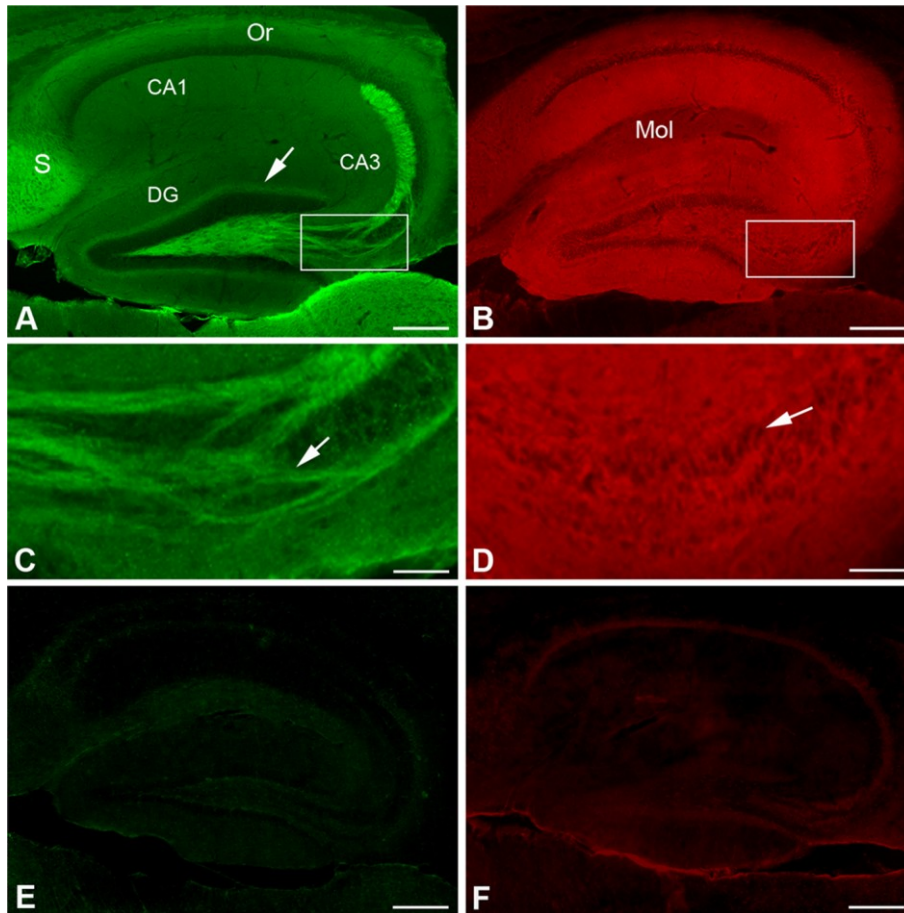


Abb. 13: Expression von CHL1 und NrCAM im Hippocampus

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Färbungen von CHL1 (A, E) und NrCAM (B, F) in hippocampalen Sagittalschnitten adulter Wildtypmäuse (A-D), CHL1-defizienter Mäuse (E) und NrCAM-defizienter Mäuse (F). Darstellung der jeweiligen Ausschnitte in A und B in höherer Auflösung (C und D). In Wildtypmäusen ist CHL1 hauptsächlich auf den Moosfasern (Pfeil in C) und im *Subiculum* exprimiert. In geringerem Ausmaß ist CHL1 auch in der inneren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* (Pfeil in A) und im *Stratum oriens* des Ammonshorns exprimiert. Der übrige Hippocampus ist mit Ausnahme der Körner- und Pyramidenzellschicht schwach diffus gefärbt (A, C). NrCAM ist im Hippocampus von Wildtypmäusen in den meisten Regionen gleichmäßig stark exprimiert, ohne das sich die Moosfasern abheben (B, D). Im *Stratum lacunosum-moleculare* ist die Färbung schwächer ausgeprägt. Die Körner- und die Pyramidenzellschicht sind nicht gefärbt (B, Pfeil in D). Die Färbung von CHL1 in CHL1-defizienten Mäusen (E) und die Färbung von NrCAM in NrCAM-defizienten Mäusen (F) weist nur einen schwachen unspezifischen Hintergrund auf. Abkürzungen: CA1 und CA3, Regionen des Ammonshorns; DG, *Gyrus dentatus*; Mol, *Stratum lacunosum-moleculare*; Or, *Stratum oriens*; S, *Subiculum*. Maßeinheiten: 100 μm (A, B, E, F); 25 μm (C, D).

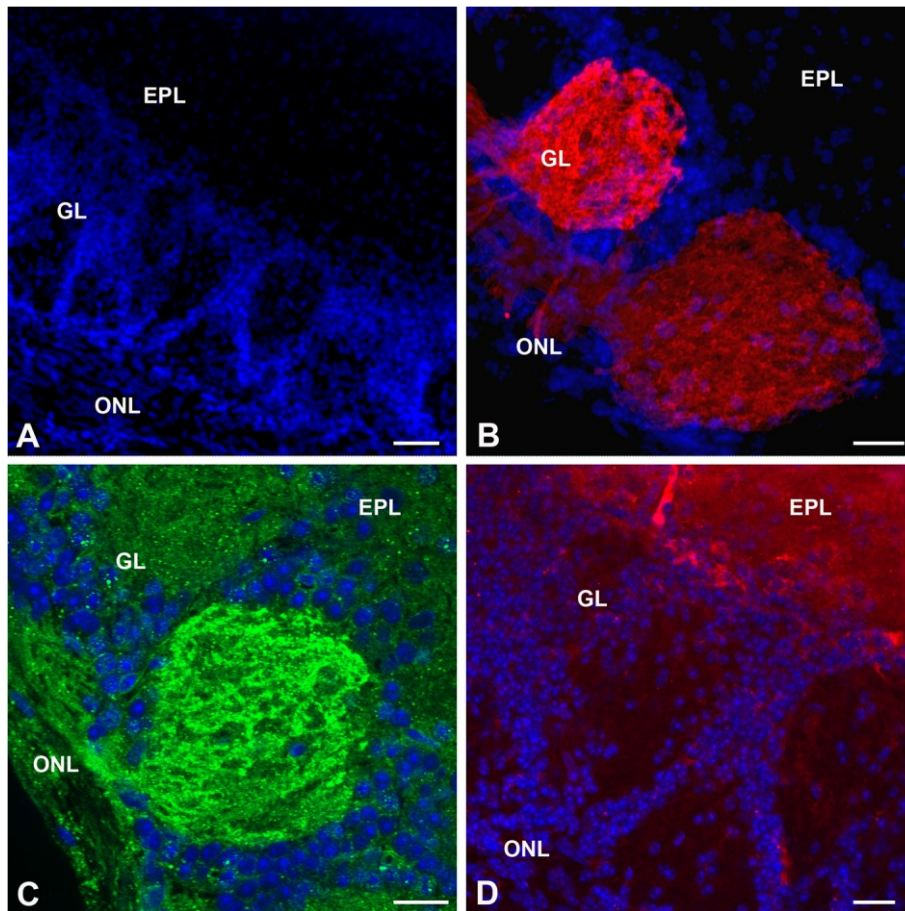


Abb. 14: Färbung von DBA, CHL1 und NrCAM im olfaktorischen Bulbus

Konfokalmikroskopische Bilder frontaler Schnitte des olfaktorischen Bulbus adulter Wildtypmäuse. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (A-D). (A) Übersicht über die Laminierung des olfaktorischen Bulbus. (B) DBA-Färbung sensorischer olfaktorischer Axone in olfaktorischen Glomeruli (rot). Immunhistochemische Färbung von CHL1 (C, grün) und NrCAM (D, rot) im olfaktorischen Bulbus. Die Färbung von DBA und CHL1 befindet sich ausschließlich auf den sensorischen olfaktorischen Axonen, während die Färbung von NrCAM in der äußeren plexiformen Schicht und um periglomeruläre Zellen in direkter Nähe dieser Schicht zu erkennen ist. Abkürzungen: ONL, olfaktorische Nervschicht; GL, glomeruläre Schicht; EPL, äußere plexiforme Schicht. Maßeinheiten: 25 μm .

3.2.2 Hippocampale Moosfaserprojektionen

Die hippocampalen Moosfasern bilden Faserbündel, die in zwei Hauptbündeln geordnet in die CA3 Region des Ammonshorns projizieren (Übersichtsartikel: Anderson et al., 1971; Forster et al., 2006; Frotscher et al., 2006). Ein suprapyramidales und ein feineres kürzeres infrapyramidales Faserbündel terminieren hauptsächlich auf den proximalen Dendriten der CA3-Pyramidenzellen im *Stratum lucidum*. Obwohl einige infrapyramidale Faserbündel den Bereich der Somata der Pyramidalneurone kreuzen, um zu dem darüberliegenden suprapyridalen Faserbündel aufzuschließen, sind beide Bündel deutlich voneinander abgegrenzt. In dieser Arbeit wurde die Bündelung der Moosfasern und die Laminierung der Moosfaserterminalien in den einzel- und doppelmutanten Mäusen untersucht.

3.2.2.1 Calbindin-Färbung: Bündelung der Moosfasern

Calbindin-D28k ist ein Calcium-bindendes Protein, das außer von den Moosfasern auch im übrigen *Gyrus dentatus*, in der Pyramidenzellschicht der CA1 und CA2 Region und einigen Interneuronen und Korbzellen exprimiert wird (Sloviter, 1989; Villa et al., 1994). In dieser Arbeit ist die Färbung von Calbindin zur Analyse der Moosfaserbündelung eingesetzt worden (Abb. 15). Sowohl Wildtypmäuse als auch NrCAM-defiziente Mäuse weisen ein klar zu erkennendes suprapyramidales und infrapyramidales Moosfaserbündel auf. Während sich die NrCAM-defizienten Mäuse hinsichtlich der Bündelung der Moosfasern nicht von den Wildtypmäusen unterscheiden, weisen CHL1-defiziente und CHL1/NrCAM-defiziente Mäuse gehäuft kleinere Faserbündel auf, die zwischen dem supra- und infrapyridalen Bündeln kreuzen und teilweise durch einen nur losen Zusammenhalt der Bündel gekennzeichnet sind. Die Abweichungen in der Bündelung dieser Fasern treten im lateralen Bereich des Hippocampus deutlicher hervor und lassen sich nur über den Vergleich mehrerer Schnitte von einer Maus ermitteln.

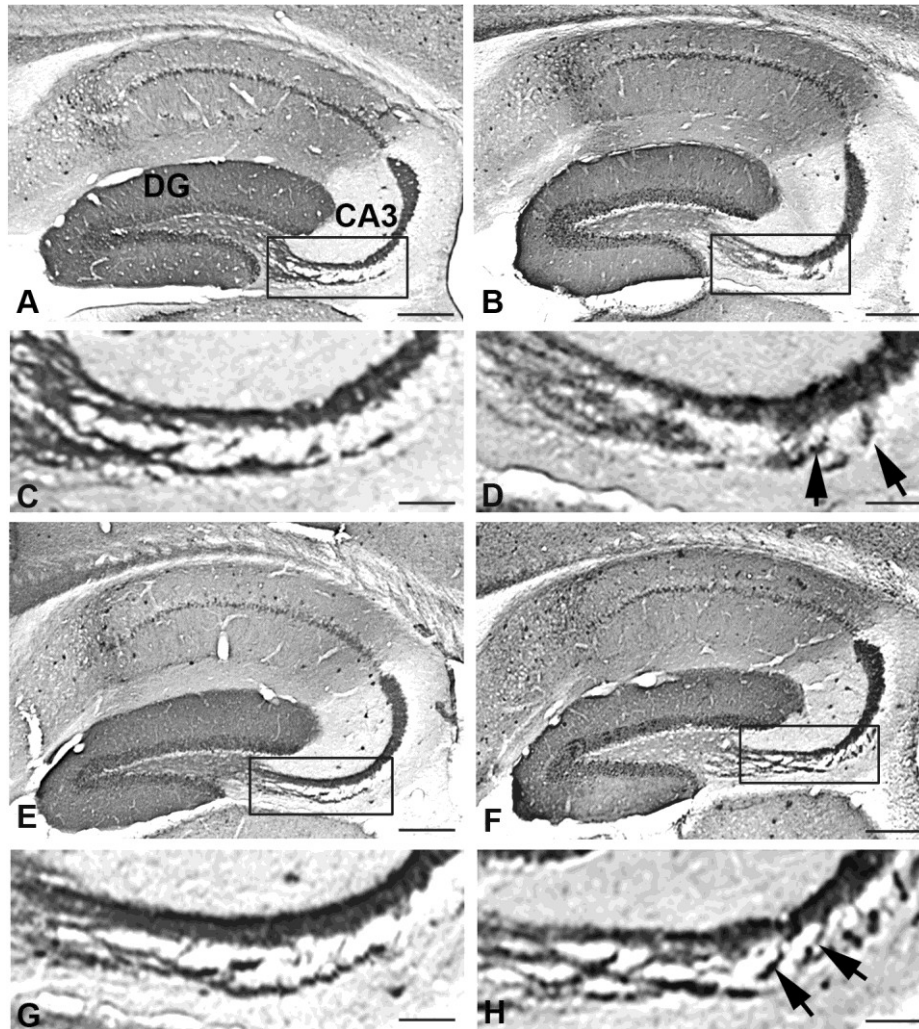


Abb. 15: Hippocampale Moosfaserbündelung: Wildtypmäuse, CHL1-defiziente, NrCAM-defiziente und doppelmutante Mäuse

DAB-markierte Calbindin-Färbung hippocampaler Moosfasern in Sagittalschnitten adulter Mäuse. Darstellung der jeweiligen Ausschnitte in A ,B, E, F in höherer Auflösung in C, D, G, H. Wildtypmäuse (A, C) und NrCAM-defiziente (E, G) weisen eine geordnete Struktur der Moosfaserbündel auf, während bei CHL1-defizienten (B, D, Pfeile) und CHL1/NrCAM-defizienten (F, H, Pfeile) Mäusen die Struktur dieser Moosfaserbündel beeinträchtigt ist. Abkürzungen: CA3, Regionen des Ammonshorns; DG, *Gyrus dentatus*. Maßeinheiten: 100 μm (A, B, E, F); 30 μm (C, D, G, H).

3.2.2.2 Timms- und Synaptophysin-Färbung: Laminierung der Moosfaserterminalien

Zusätzlich zur Bündelung der Moosfasern wurde auch die Laminierung der axonalen Terminalien untersucht (Abb. 16). Moosfasern der hippocampalen Körnerzellen werden für die Neurone mit dem höchsten Gehalt an chelatierbarem Zink in den synaptischen Terminalien gehalten. Bei der Timms-Färbung des Hippocampus werden hauptsächlich Zink und geringe Mengen anderer Schwermetalle mit Natriumsulfid präzipitiert. Silbernitrat wird diesen Präzipitaten beigefügt und zu Silber reduziert, wodurch sich der Zinkgehalt der Moosfaserterminalien visualisieren lässt (schwarz) (Frederickson und Danscher 1990).

In Wildtypmäusen enden die Moosfaserterminalien größtenteils im proximalen Bereich der Pyramidenzellendriten über- und unterhalb der Pyramidenzellkörper der CA3-Region. Während die NrCAM-defizienten Mäuse bezüglich der Laminierung dieser Faserterminalien nicht von Wildtypmäusen zu unterscheiden sind, fallen CHL1-defiziente und doppelmutante Mäuse durch eine Anreicherung dieser Terminalien im Bereich der Pyramidenzellsomata auf. Die Färbung von Synaptophysin ist eine weitere Methode, die Endigungen der Moosfasern zu detektieren. Synaptophysin ist ein in allen Neuronen ubiquitär exprimiertes Glykoprotein synaptischer Vesikel. Im Vergleich mit der Timms-Färbung können die Terminalien der Moosfasern mit Synaptophysin detaillierter dargestellt werden.

In Wildtypmäusen ist aufgrund der Anreicherung von Moosfaserterminalien besonders das *Stratum lucidum* der CA3-Region durch die Färbung von Synaptophysin hervorgehoben (Smith et al., 2000) (Abb. 17). In der Schicht der Pyramidenzellkörper werden Moosfaserterminalien nur vereinzelt detektiert. Die Laminierung der Terminalien in NrCAM-defizienten Mäusen ist von Wildtypmäusen nicht zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu weisen CHL1-defiziente und doppeldefiziente Mäuse viele verstreute Terminalien in der gesamten CA3 Region auf. Da diese Terminalien die Somata der Pyramidenzellkörper säumen, handelt es sich wahrscheinlich um Projektionen dieser Moosfasern auf Pyramidenzellkörper (Abb. 17). Die Synaptophysin Färbung steht somit im Einklang mit den Ergebnissen der Timms-Färbung bei Wildtypmäusen und mutanten Mäusen. Beide Färbungen stellen zusätzlich zu der abweichenden Bündelung der Moosfasern durch die Calbindin-Färbung eine abweichende Laminierung der Faserterminalien dar, die auf eine fehlerhafte Projektion einiger Moosfasern auf Pyramidenzellkörper schließen lässt.

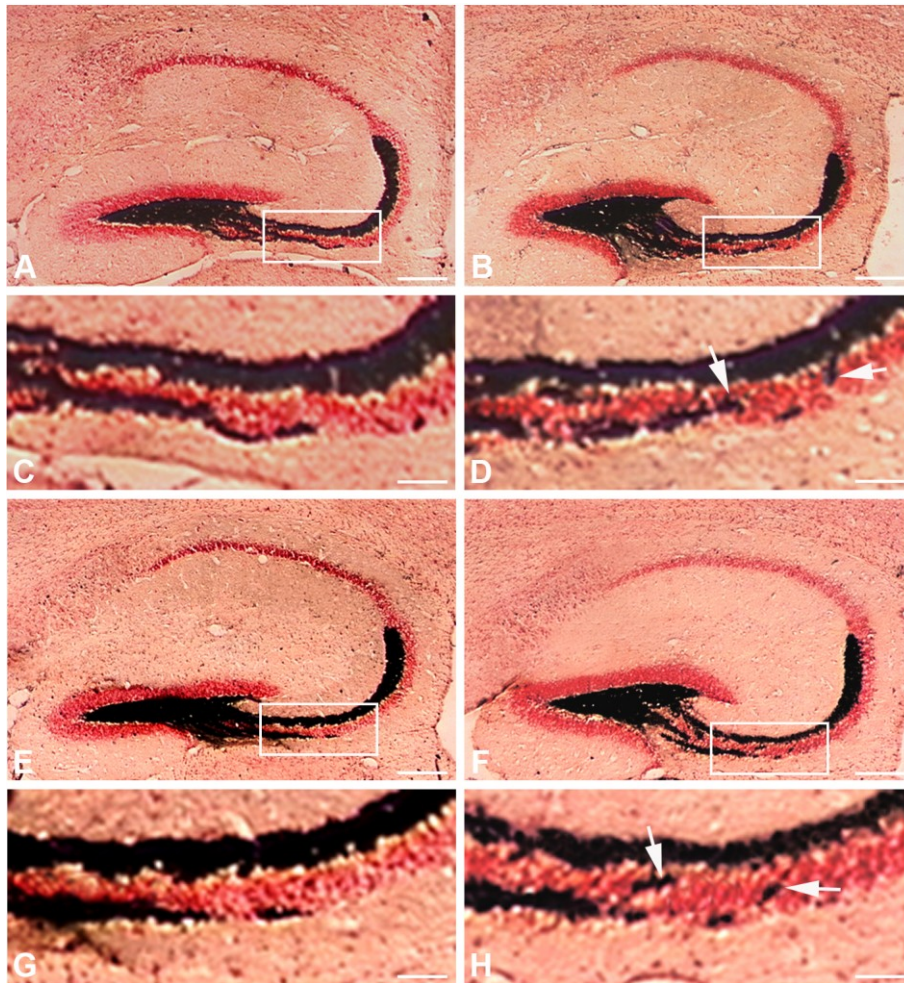


Abb. 16: Hippocampale Moosfaserterminalien: Wildtypmäuse, NrCAM-defiziente, CHL1-defiziente und doppelmutante Mäuse

Timms-Färbung hippocampaler Moosfaserterminalien in Sagittalschnitten adulter Mäuse; Gegenfärbung mit Neutralrot. Darstellung der jeweiligen Ausschnitte in A, B, E, F in höherer Auflösung in C, D, G, H. Wildtypmäuse (A, C) und NrCAM-defiziente Mäuse (E, G) weisen eine starke Laminierung der Moosfaserterminalien (schwarz) auf, die hauptsächlich im Bereich der Dendriten der Pyramidenzellen zu finden sind. Bei CHL1-defizienten (B, D, Pfeile) und CHL1/NrCAM-defizienten (F, H, Pfeile) Mäusen ist diese Laminierung beeinträchtigt und Terminalien sind verstärkt im Bereich der Somata der Pyramidenzellen zu finden (C, D, G, H). Maßeinheiten: (A, B, E, F) 100 μm ; (C, D, G, H) 25 μm .

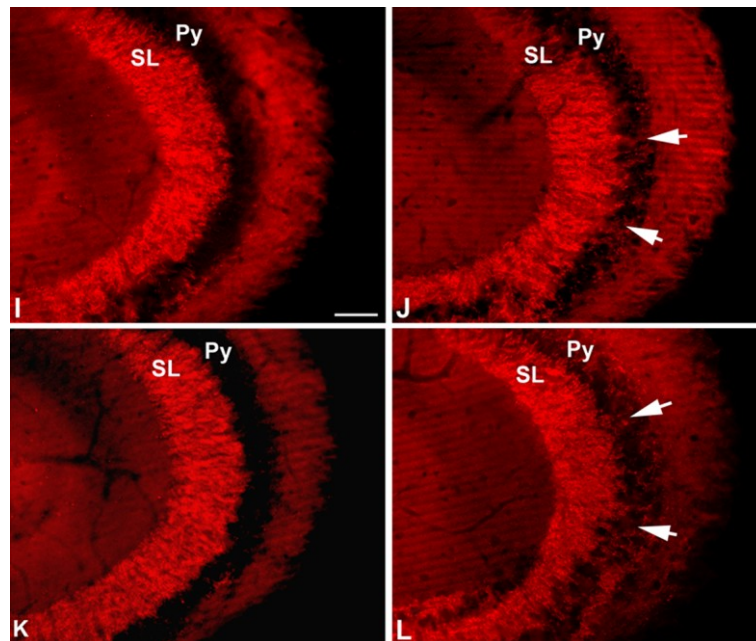


Abb. 17: Moosfaserterminalien in CA3: Wildtypmäuse, NrCAM-defiziente, CHL1-defiziente und doppelmutante Mäuse

Synaptophysin-Färbung hippocampaler Moosfaserterminalien in Sagittalschnitten der CA3 Region adulter Mäuse. Bei Wildtypmäusen (A) und NrCAM-defizienten Mäusen (C) sind fast alle Moosfaserterminalien im *Stratum lucidum* zu finden, während die Schicht der Pyramidenzellkörper weitgehend frei bleibt. Bei CHL1-defizienten (B, Pfeile) und CHL1/NrCAM-defizienten (D, Pfeile) Mäusen ist diese Laminierung dieser synaptischen Terminalien beeinträchtigt und viele einzelne Moosfaserendigungen werden im somatischen Bereich der Pyramidenzellen gefunden. Abkürzungen: Py, Pyramidenzellschicht; SL, *Stratum lucidum*. Maßeinheit: 25 μm .

3.2.3 Projektionen primärer olfaktorischer sensorischer Neurone

Während der Entwicklung wachsen die Axone der primären sensorischen Neurone des nasalen Riechepithels in den olfaktorischen Bulbus ein (Übersichtsartikel: Mori et al., 1999; Mombaerts, 2006) (Abb. 18). Dort verzweigen sich die Axone in den Glomeruli und terminieren auf Mitral- und Tufted-Zellen. Bis zum postnatalen Tag 5 werden bei Wildtypmäusen Axone gefunden, die nicht innerhalb der Glomeruli der glomerulären Schicht sondern in der äußeren plexiformen Schicht terminieren oder sich in mehr als einem Glomerulus verzweigen. Zu späteren Zeitpunkten dagegen projiziert ein Axon zu genau einem einzigen Glomerulus und terminiert auch ausschließlich in diesem (Royal and Key, 1999; Kim and Greer, 2000).

3.2.3.1 DBA- Färbung

Um die Axone der primären sensorischen Neurone darzustellen, wurden sie mit dem Lectin *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) angefärbt (Abb. 14; Abb. 18). DBA ist das Lectin einer indischen Leguminose mit einer hohen Affinität zu N-acetyl- α -D-Galaktosaminen. Durch die Färbung mit diesem Lectin kann eine Subpopulation der in den Bulbus der Maus projizierenden Axone dargestellt werden, die repräsentativ für die Gesamtpopulation sein soll (Tenne-Brown and Key, 1999). In adulten Tieren weisen im Gegensatz zu Wildtypmäusen sowohl CHL1-defiziente, als auch NrCAM-defiziente und CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse Axone auf, die über die Glomeruli in die äußere plexiforme Schicht hinausschießen und sich in mehr als einem Glomerulus verzweigen (Abb. 18).

3.2.4 Größe des ventrikulären Systems

Nach zehnmalem Rückkreuzen der CHL1-defizienten Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund zeigte eine qualitative histologische Untersuchung dieser Tiere eine Vergrößerung der lateralen Ventrikel (Montag-Sallaz et al., 2002). In dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Angenstein (Speziallabor für nicht-invasive bildgebende Verfahren; Institut für Neurobiologie) das gesamte ventrikuläre System mittels Magnet-Resonanz-Tomographie untersucht und die Ventrikelgrößen der einzelmutanten und doppelmutanten Mäuse quantifiziert. Die Anwendung dieser Methode ermöglicht eine effiziente und von histologischen Artefakten freie Untersuchung lebender Mäuse.

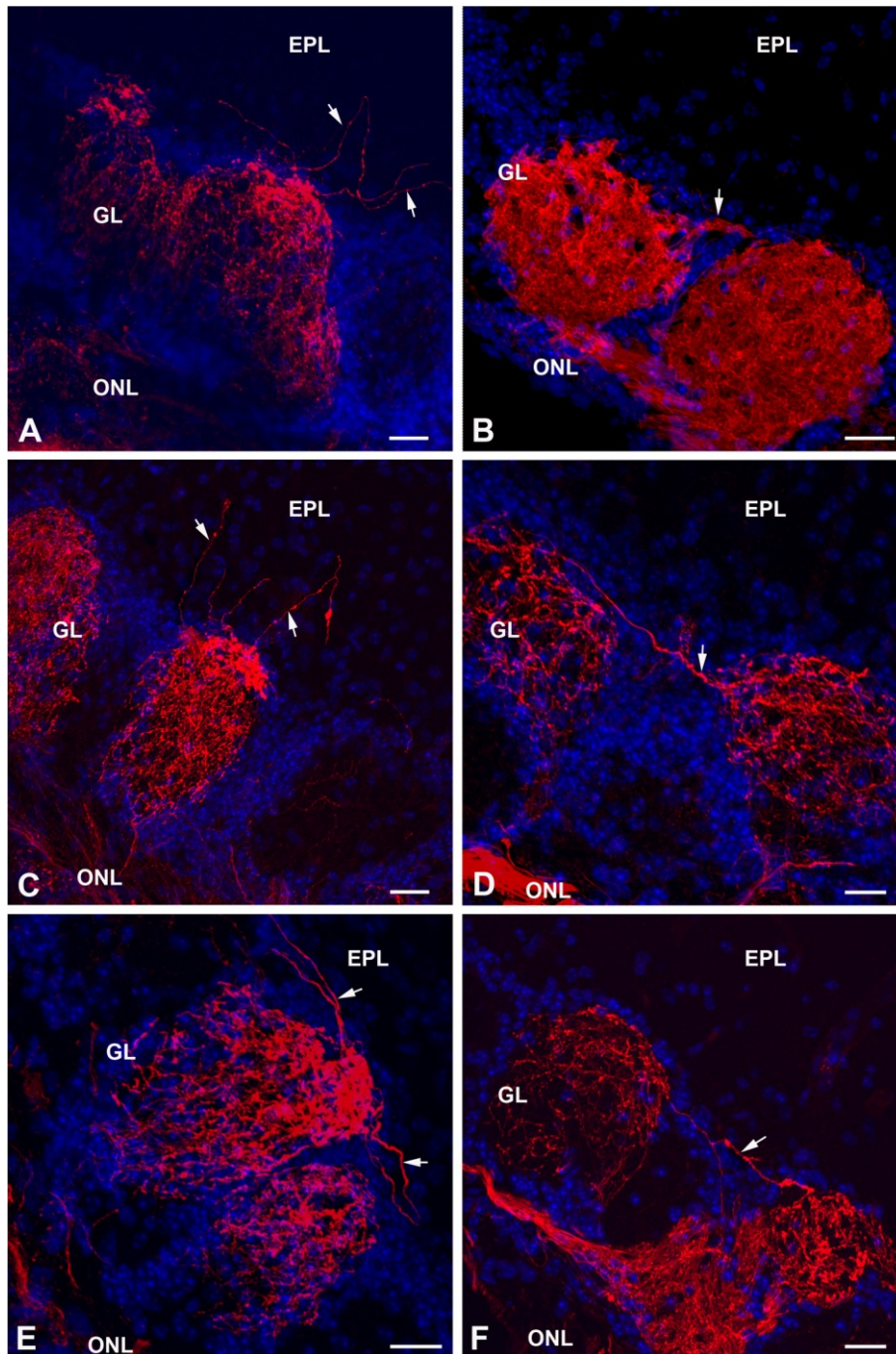


Abb. 8: Olfaktorische axonale Projektionen: NrCAM-defiziente, CHL1-defiziente und doppelmutante Mäuse

Konfokalmikroskopische Aufnahmen frontaler Schnitte des olfaktorischen Bulbus adulter CHL1-, NrCAM- und CHL1/NrCAM-doppeldefizienter Mäuse. Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau) und die axonalen Projektionen sensorischer olfaktorischer Neurone mit DBA (rot) (A-F). Bei CHL1-defizienten (A, B), NrCAM-defizienten (C, D) und doppelmutanten Mäusen (E, F) projizieren einige olfaktorische Axone durch die glomeruläre Schicht hindurch und terminieren in der äußeren plexiformen Schicht (A, C, E) oder verbinden zwei Glomeruli (B, D, F). Abkürzungen: ONL, olfaktorische Nervschicht; GL, glomeruläre Schicht; EPL, äußere plexiforme Schicht. Maßeinheiten: 25 μ m

In den Einzel- und Doppelmutanten wurden die Volumina der Hirne und der Ventrikel gemessen. Dieses Verfahren bestätigte die Erweiterung der Ventrikel der CHL1-defizienten Mäuse. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen waren die Ventrikel der CHL1-defizienten Mäuse signifikant ($F_{(3,56)} = 25,150$; $p < 0,0001$) um etwa 33% vergrößert, während die Ventrikel der NrCAM-defizienten Mäuse signifikant ($F_{(3,56)} = 25,150$; $p < 0,034$) um etwa 20% verkleinert waren. Die Ventrikel der doppelmutanten Mäuse hatten eine ähnliche Größe wie die der Wildtypmäuse (Abb. 19). Zur räumlichen Veranschaulichung des ventrikulären Systems sind in Abb. 20 die Ventrikel der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse dreidimensional dargestellt (Abb. 20). Die Hirnvolumina der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse unterschieden sich nicht, so dass die Änderung der Ventrikelgröße unabhängig von der Größe des Gesamthirns dieser Mäuse ist (Tab 2). Diese Messungen sind jedoch nicht sensitiv gegenüber kleineren Größenveränderungen einzelner Hirnbereiche.

In Abb. 21 sind die Volumina der Ventrikel im Verhältnis zu den Hirnvolumina dargestellt. Zusätzlich wurden die Volumina der Ventrikel (I-III) und des vierten Ventrikel getrennt bestimmt (Tab. 2). Diese getrennte Analyse der Daten spiegelte die Größenverhältnisse des gesamten ventrikulären Systems (Ventrikel I-IV) in den Größen der Ventrikel (I-III) in verstärkter Ausprägung wieder: Gegenüber den Ventrikeln (I-III) der Wildtypmäuse waren die Ventrikel der CHL1 defizienten Mäuse signifikant ($F_{(3,56)} = 126,406$, $p < 0,0001$) um etwa 38% vergrößert, während die Ventrikel der NrCAM Mäuse signifikant ($F_{(3,56)} = 126,406$, $p = 0,0018$) um etwa 24% verkleinert waren und die Größe der Ventrikel bei den doppelmutanten Mäusen ähnlich wie bei Wildtypmäusen ausgeprägt waren. Die Größenausprägung des vierten Ventrikels wich dagegen von den übrigen Ventrikeln ab: Die vierten Ventrikel der Wildtypmäuse waren in ihren Größen mit den Ventrikeln der CHL1-defizienten Mäuse vergleichbar. Die Ventrikel der NrCAM-defizienten Mäuse ($F_{(3,56)} = 6,508$, $p < 0,0301$) waren dagegen mit den Ventrikeln der doppelmutanten Mäuse ($F_{(3,56)} = 16,508$, $p = 0,0029$) vergleichbar und signifikant um etwa 12% bei NrCAM-defizienten Mäusen und etwa 16% bei doppelmutanten Mäusen vergrößert (Abb. 19; Abb. 20; Abb. 21; Tab 2). Die Volumenmessungen in den doppelmutanten Mäusen zeigen, dass sich die Einflüsse beider Mutationen in den Ventrikeln (I-III) gegenseitig abschwächen. Bezüglich der Vergrößerung des vierten Ventrikels handelt es sich um einen Effekt, der in den Einzelmutanten nur auf die Defizienz von NrCAM zurückzuführen ist und in den doppelmutanten Mäusen in ähnlichem Umfang erhalten bleibt.

Der posteriore Bereich des vierten Ventrikels wird durch das Kleinhirn begrenzt. In einer Magnet-Resonanz-Tomographischen Untersuchung von L1-defizienten Mäusen ging eine

Erweiterung des vierten Ventrikels mit einer Verkleinerung des Cerebellums einher (Fransen et al.; 1998). Aufgrund dieser Studie wurde in dieser Arbeit auch das Cerebellum untersucht. Da die Auflösung des Magnet-Resonanz-Tomographen für die Größenbestimmung einzelner Kleinhirnläppchen nicht ausreichend war, erfolgte diese Untersuchung an histologischen Präparaten.

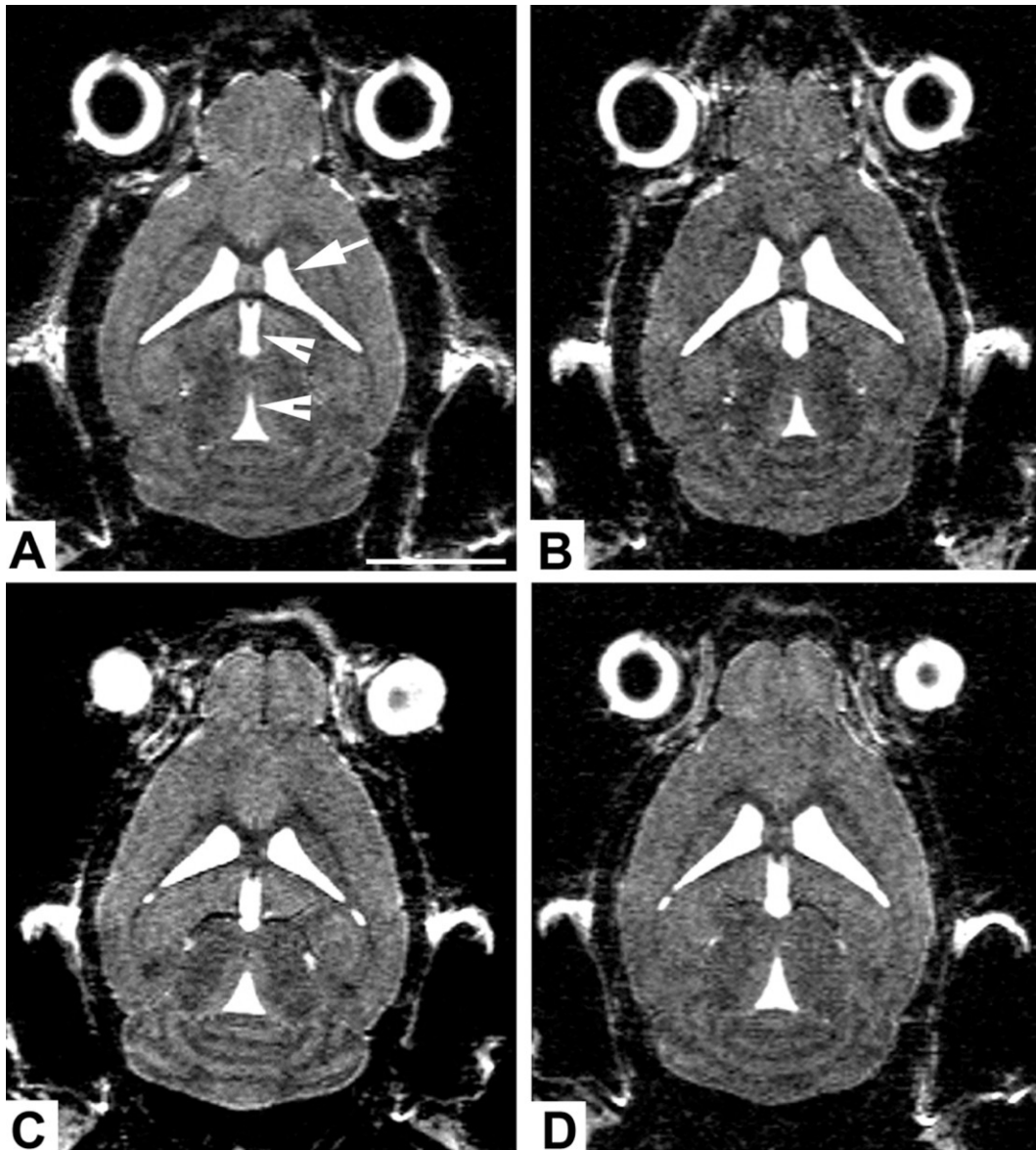


Abb. 19: Magnet-resonanz-tomographische Aufnahmen des Ventrikelsystems

Darstellung der Aufnahmen in horizontaler Ebene. Das Ventrikelsystem besteht aus dem verzweigten weißen Bereich in der Mitte der Aufnahmen. An die symmetrisch ausgeprägten lateralen Ventrikel (A, Pfeil) schließt sich direkt der dritte Venrikel an (A, Pfeilkopf oben). Die dreieckige weiße Struktur stellt den vierten Ventrikel dar (A, Pfeilkopf unten). Gegenüber Wildtypmäusen (A) sind die lateralen und der dritte Ventrikel der CHL1-defizienten Mäuse (B) vergrößert und bei den NrCAM-defizienten Mäusen (C) verkleinert. Bei den CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen (D) ist die Größe dieser Ventrikel ähnlich wie bei den Wildtypmäusen. Im Vergleich zu Wildtypmäusen (A) ist der vierte Ventrikel der CHL1-defizienten Mäuse in ähnlicher Größe ausgeprägt (B), während dieser Ventrikel in den NrCAM-defizienten (C) und den CHL1/NrCAM doppeldefizienten Maus (D) vergrößert ist. Maßeinheit: 5 mm.

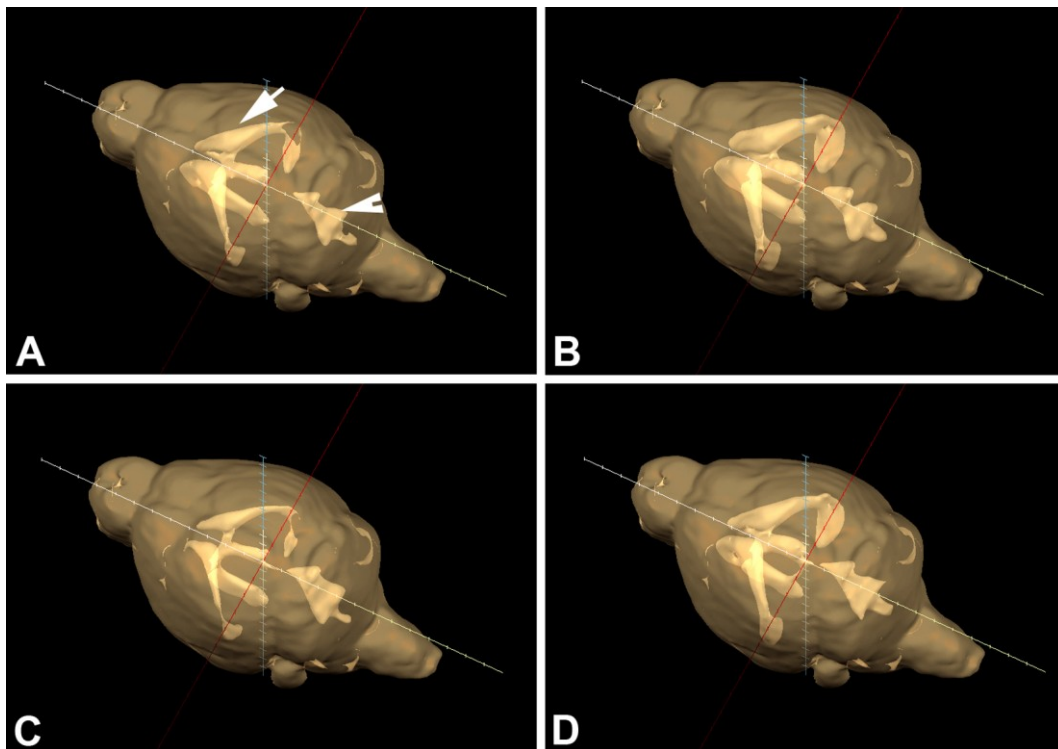


Abb. 20: Drei-dimensionale Darstellung des Ventrikelsystems

Die Magnet-Resonanz-Tomographischen Aufnahmen des Ventrikelsystems sind exemplarisch von jeweils einer Maus drei-dimensional in einem Standardgehirn dargestellt. Der helle Bereich im vorderen Teil des Gehirns stellt die lateralen und den dritten Ventrikel dar (A, Pfeil). Der helle Bereich im hinteren Teil des Gehirns stellt den vierten Ventrikel dar (A, Pfeilkopf). Verglichen mit den Wildtypmäusen (A) sind die lateralen und der dritte Ventrikel der CHL1-defizienten Mäusen (B) vergrößert und die der NrCAM-defizienten Mäuse (C) verkleinert, während diese Ventrikel bei den doppelmutanten Mäusen (D) ähnlich groß ausgeprägt sind. Der vierte Ventrikel der Wildtypmäuse (A) und der CHL1-defizienten Mäuse (B) ist ähnlich groß ausgeprägt, während dieser Ventrikel bei den NrCAM-defizienten (C) und den doppelmutanten Mäusen (D) vergrößert ist.

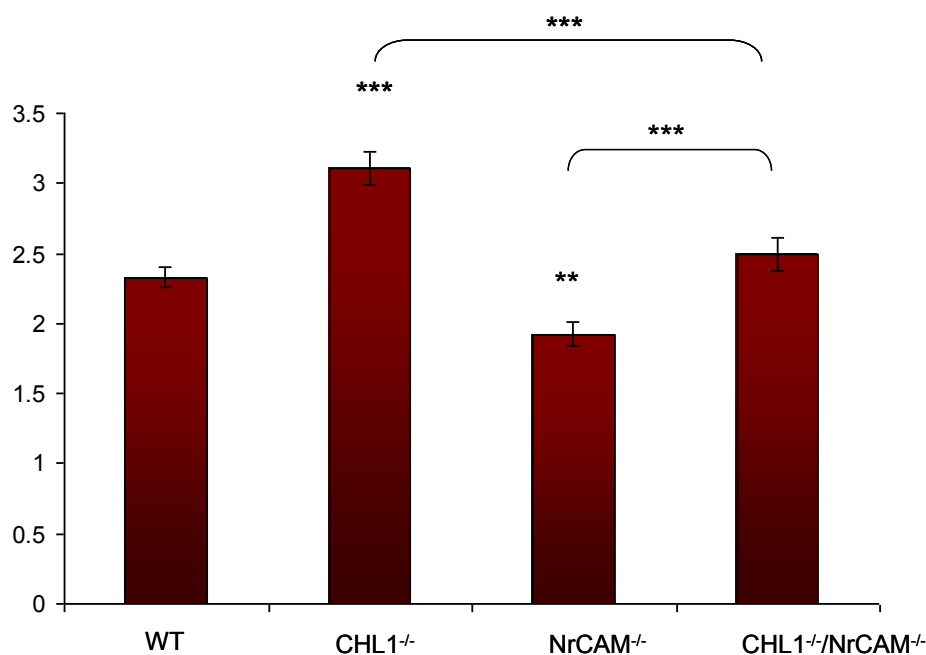


Abb. 21 : Relative Volumina der Ventrikel (I-IV)

Die Volumina der Ventrikel (I-IV) sind im Verhältnis zu den Hirnvolumina der Wildtypmäuse (WT), der CHL1-defizienten (CHL1^{-/-}), der NrCAM-defizienten (NrCAM^{-/-}) und der CHL1/NrCAM-doppeldefizienten (CHL1^{-/-}/NrCAM^{-/-}) Mäuse mit Standardfehler angegeben. Im Vergleich mit den WT Mäusen sind die Ventrikel der CHL1^{-/-} Mäuse signifikant vergrößert, die der NrCAM^{-/-} Mäuse signifikant verkleinert und die Ventrikel der CHL1^{-/-}/NrCAM^{-/-} Mäuse in ähnlicher Größe ausgeprägt. Die Ventrikelgrößen der einzelmutanten Mäuse sind im Vergleich mit den doppelmutanten Mäusen ebenfalls signifikant vergrößert (CHL1^{-/-}) bzw. verkleinert (NrCAM^{-/-}). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (entsprechend der ANOVA)

Tab. 2 : Statistische Auswertung der Ventrikelvolumina

	Volumina (mm ³)			
	Gehirn	I. – IV. Ventrikel	I. – III. Ventrikel	IV. Ventrikel
WT (n = 18)	496.57 ± 4,35	11.57 ± 0,40	10.22 ± 0,41	1.35 ± 0,03
CHL1^{-/-} (n = 18)	496.63 ± 2,91	15.43 ± 0,59 ^{***}	14.10 ± 0,57 ^{***}	1.33 ± 0,05
NrCAM^{-/-} (n = 12)	486.20 ± 9,40	9.32 ± 0,35 ^{**}	7.81 ± 0,34 ^{**}	1.51 ± 0,05 [*]
CHL1^{-/-}/NrCAM^{-/-} (n = 12)	508.93 ± 7,19	12.69 ± 0,57	11.11 ± 0,59	1.57 ± 0,05 ^{**}

Die Volumina der Ventrikel (I-IV) sind für Wildtypmäuse (WT), CHL1-defiziente (CHL1^{-/-}), NrCAM-defiziente (NrCAM^{-/-}) und doppeldefiziente-Mäuse (CHL1/NrCAM^{-/-}) in mm³ mit Standardfehler angegeben. Im Vergleich mit den WT Mäusen sind die Ventrikel der CHL1^{-/-} Mäuse signifikant vergrößert, die der NrCAM^{-/-} Mäuse signifikant verkleinert und die Ventrikel der CHL1^{-/-}/NrCAM^{-/-} Mäuse in ähnlicher Größe ausgeprägt. Die Ventrikelgrößen der einzelmutanten Mäuse sind im Vergleich mit den doppelmutanten Mäusen ebenfalls signifikant vergrößert (CHL1^{-/-}) bzw. verkleinert (NrCAM^{-/-}). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (entsprechend der ANOVA).

3.2.5 Größe des Kleinhirnwurms

Das Kleinhirn (Cerebellum) liegt in der hinteren Schädelgrube und bildet das Dach des vierten Ventrikels. Die Größenbestimmungen am Cerebellum wurden an midsagittalen Gewebeschnitten in der Ebene des unpaaren Teils des Cerebellums, des Wurms (Vermis), durchgeführt, da die Begrenzung des vierten Ventrikels zu einem großen Teil durch diesen Bereich vermittelt wird (Abb. 22). Die Größe der Oberflächen der Gewebeschnitte dienten als Maß für die Größe des cerebellaren Vermis. Gewebeschnitte von Wildtypmäusen wurden mit Schnitten einer Ebene von einzelmutanten Mäusen und doppelmutanten Mäusen verglichen und gemessen (Abb. 23). Eine Ein-Weg ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied in den Größen der Gewebeschnitte ($F_{(3,21)} = 24,411$, $p < 0,0001$). Die Oberfläche der cerebellaren Schnitte der Wildtypmäuse ($9,54 \pm 0,05$) hatte eine ähnliche Größe wie die der CHL1-defizienten Mäuse ($9,46 \pm 0,03$). Bei den NrCAM-defizienten Mäusen ($8,87 \pm 0,02$) und den doppeldefizienten Mäusen ($8,88 \pm 0,09$) war diese Fläche jedoch verkleinert (Abb. 22, Abb. 23, Tab 3). Somit ist der vierte Ventrikel genau in den Mäusen erweitert, die auch eine Verkleinerung des cerebellaren Vermis zeigen.

Einer Studie von Sakurai et al. (2001) zeigte die Verkleinerung einzelner cerebellarer Läppchen (Lobuli) bei den NrCAM-defizienten Mäusen (Sakurai et al., 2001). Auch in dieser Arbeit wurden die einzelnen cerebellaren Lobuli in den einzelmutanten und doppelmutanten Mäusen im Hinblick auf ihre Größe vermessen. Die Messung der Flächen einzelner Lobuli der NrCAM-defizienten Mäuse ergab ein ähnliches Profil von Größenveränderungen wie in der Studie von Sakurai et al., 2001 beschrieben: Die Lobuli 3, 4, 5, 6, 7 und 10 dieser mutanten Mäuse waren signifikant verkleinert. Die CHL1-defiziente Mäuse zeigten ebenfalls ein spezifisches Profil von signifikanten Größenänderungen. Die Lobuli 1 und 2 waren vergrößert, während die Lobuli 3, 6 und 7 verkleinert waren. Die Größenveränderungen der Lobuli in den doppelmutanten Mäusen wiesen ein ähnliches Profil auf wie bei den NrCAM-defizienten Mäusen. Nur das Ausmaß der Verkleinerung in den Lobuli 6, 7 und 10 war verändert (Abb. 22, Abb. 23, Tab. 3).

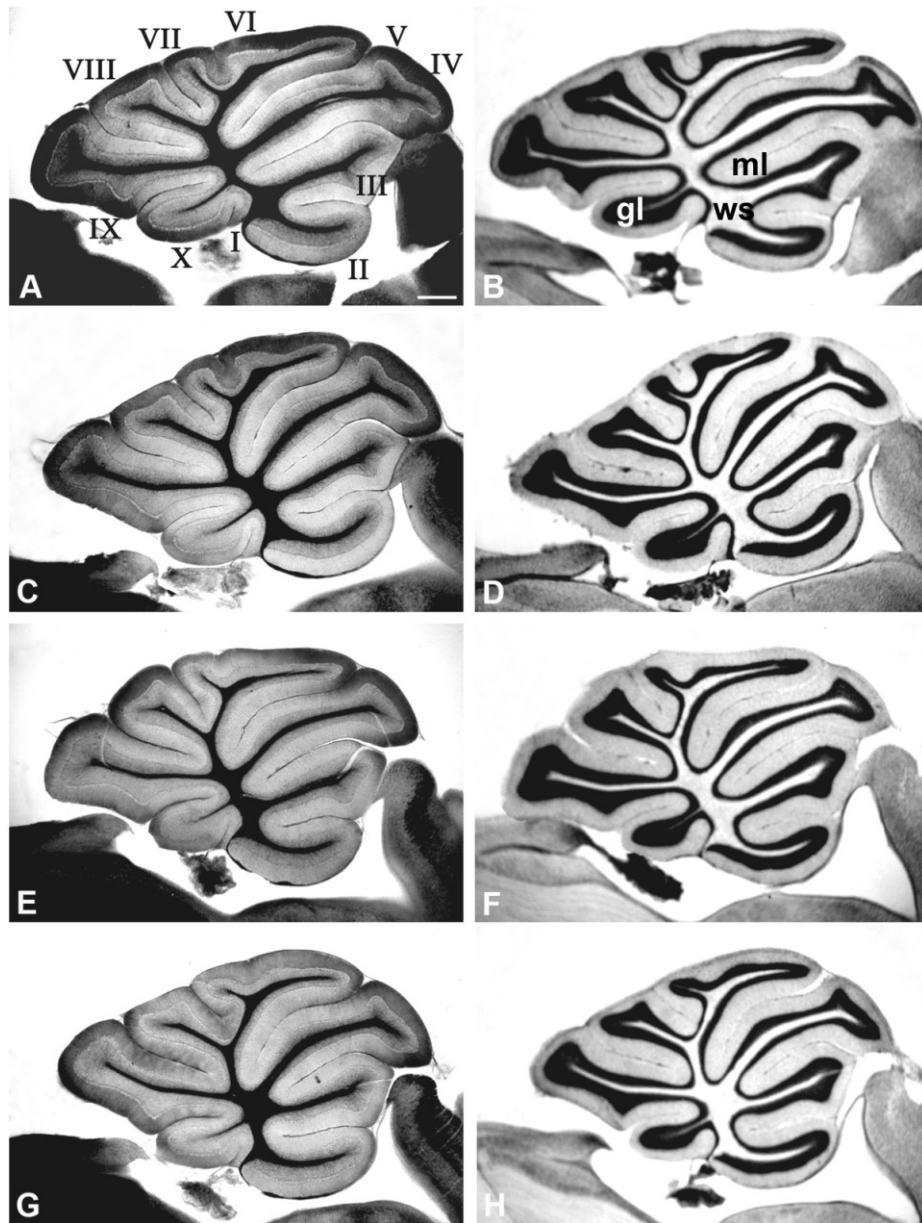


Abb. 22: Midsagittale Gewebeschnitte durch den cerebellaren Vermis

Phasenkontrast mikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten, ungefärbt (A, C, E, G) und gefärbt mit Kresylviolett (B, D, F, H). Einzelne cerebellare Lobuli (I-X) sind in A und die Schichten des Cerebellums sind in B beschriftet. Verglichen mit den Wildtypmäusen (A, B) und den CHL1-defizienten Mäusen (C, D), ist die Gesamtgröße der Schnitte in den NrCAM-defizienten (E, F) und den CHL1/NrCAM-defizienten-Mäusen (G, H) um etwa 8% reduziert. Ausserdem zeigen alle mutanten Mäuse (C-H) subtile spezifische Veränderungen in der Größe einzelner Lobuli (ca. 10- 19%). Bei CHL1-defizienten Mäusen (C, D) sind Lobuli I und II vergrößert und Lobuli III, VI und VII verkleinert. Bei NrCAM-defizienten Mäusen (E, F) sind Lobuli III, IV, V, VI, VII und X verkleinert und bei CHL1/NrCAM-defizienten Mäusen (G, H) ebenfalls. Die Färbungen mit Kresylviolett zeigen keine offensichtlichen Veränderungen in der Molekularschicht und der Körnerzellschicht. Abkürzungen: gl, Körnerzellschicht; ml, Molekularschicht; ws, weiße Substanz. Maßeinheit: 400 μ m.

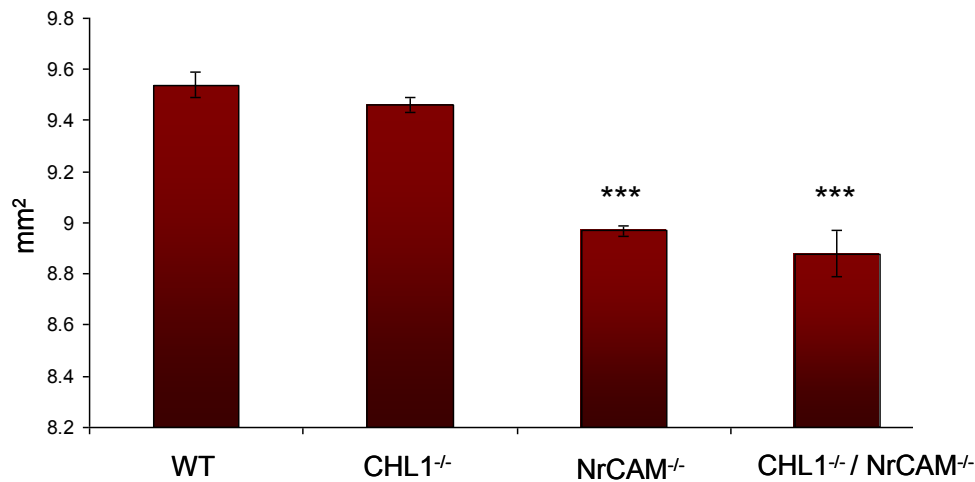


Abb. 23: Größe der Schnittflächen durch den cerebellaren Vermis

Die Größe der Schnittflächen der Wildtypmäuse (WT) und der mutanten Mäuse (CHL1^{-/-}, NrCAM^{-/-}, CHL1/NrCAM^{-/-}) wurden bestimmt und die Mittelwerte in mm² mit Standardfehler dargestellt. Im Vergleich zu den WT Mäusen hatten die CHL1^{-/-} Mäuse eine ähnliche Größe der Schnittfläche durch den cerebellaren Vermis, während die Größe dieser Fläche bei NrCAM^{-/-} und bei CHL1/NrCAM^{-/-} Mäusen signifikant kleiner war. *p< 0.05; **p< 0.01, ***p< 0,001 (entsprechend der ANOVA)

Die Vergrößerung der Lobuli 1 und 2 der CHL1-defizienten Mäuse ist bei den doppelmutanten Mäusen nicht mehr vorhanden, ebenso ist die Verkleinerung von Lobulus 10 der NrCAM-defizienten Mäuse bei den doppelmutanten Mäusen abgeschwächt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl CHL1 als auch NrCAM die Größe einzelner Lobuli des Cerebellums spezifisch beeinflussen, sich zum Teil gegenseitig abschwächen, aber sich jedoch nicht gegenseitig verstärken. Damit ist auch CHL1 an der Ausbildung der Gesamtgröße des cerebellaren Vermis in den doppelmutanten Mäusen beteiligt, auch wenn die Gesamtflächengröße der doppelmutanten Mäuse den Flächen der NrCAM-defizienten Mäuse sehr ähnlich ist. Veränderungen in den Größen einzelner Lobuli können auch die Laminierung des Cerebellums beeinflussen. Um die Laminierung des Cerebellums darzustellen, wurden die Schnitte nach der Größenbestimmung mit Kresylviolett gefärbt. Die Färbung lässt die Körnerzellschicht deutlich hervortreten und grenzt sie von der helleren Molekularschicht und der weißen Substanz ab. Eine offensichtliche Veränderung in der Laminierung des Cerebellums konnte jedoch in keiner der einzel- und doppelmutanten Mäuse festgestellt werden (Abb. 22).

Tab 3. Messung der Grösse des cerebellaren Wurms und einzelner Lobuli

Fläche (mm ²)	WT	CHLI ^{-/-}	NRCAM ^{-/-}	CHLI ^{-/-} /NRCAM ^{-/-}
Vermis	9.54 ± 0.05	9.46 ± 0.03	8.87 ± 0.02*** <i>F</i> _(3,21) = 24,411; <i>p</i> < 0.0001	8.88 ± 0.09*** <i>F</i> _(3,21) = 24,411; <i>p</i> < 0.0001
Lobuli I+II	1.14 ± 0.02	1.26 ± 0.03** <i>F</i> _(3,21) = 7,451; <i>p</i> = 0.0051	1.11 ± 0.02	1.11 ± 0.01
Lobulus III	1.26 ± 0.02	1.11 ± 0.02*** <i>F</i> _(3,21) = 10,196; <i>p</i> = 0.0008	1.06 ± 0.02*** <i>F</i> _(3,21) = 10,196; <i>p</i> < 0.0001	1.11 ± 0.02*** <i>F</i> _(3,21) = 10,196; <i>p</i> = 0.0004
Lobuli IV+V	2.07 ± 0.01	1.96 ± 0.03	1.60 ± 0.01*** <i>F</i> _(3,21) = 29,251; <i>p</i> < 0.0001	1.68 ± 0.03*** <i>F</i> _(3,21) = 29,251; <i>p</i> < 0.0001
Lobuli VI+VII	1.76 ± 0.02	1.58 ± 0.02*** <i>F</i> _(3,21) = 20,425; <i>p</i> < 0.0001	1.59 ± 0.02*** <i>F</i> _(3,21) = 20,42; <i>p</i> < 0.0001	1.49 ± 0.03*** <i>F</i> _(3,21) = 20,425; <i>p</i> < 0.0001
Lobulus XIII	0.89 ± 0.01	0.90 ± 0.02	0.89 ± 0.01	0.86 ± 0.01
Lobulus IX	1.59 ± 0.05	1.73 ± 0.03	1.61 ± 0.03	1.63 ± 0.01
Lobulus X	0.64 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.56 ± 0.01*** <i>F</i> _(3,21) = 9,501; <i>p</i> < 0.0001	0.60 ± 0.01* <i>F</i> _(3,21) = 9,501; <i>p</i> = 0.01

Die Messungen wurden an 3 midsagittalen Vibratomnschnitten (100 µm Dicke) vorgenommen und die Flächen des gesamten Vermis und einzelner Lobuli mit einem NeuroLucida System bestimmt. Die Werte sind durch Mittelwert ± SEM angegeben. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 (entsprechend der ANOVA).

3.3 Verhaltenstests bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen: Präpuls-Inhibition und Rota-Rod

Die Fehlprojektionen bei den einzel- und doppelmutanten Mäusen in den exemplarisch untersuchten Hirnregionen lassen weitere Projektionsfehler in anderen Hirnregionen vermuten und deuten auf eine Rolle dieser Moleküle am Aufbau neuronaler Netzwerke hin (Montag-Sallaz et al., 2003). Mutationen von CHL1 und NrCAM stehen im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Erkrankungen, die durch eine Beeinträchtigung der Informationsfilterung gekennzeichnet sind (Rossi et al., 2005; Perry et al., 2007; Thoma et al., 2007; Tregellas et al., 2007). Auch bei CHL1-defizienten Mäusen wurde eine verringerte Fähigkeit, akustische Reize zu filtern, festgestellt (Irintchev et al., 2004). Daher könnten sich Veränderungen bei NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen ebenfalls in einer Störung der Reizfilterung äußern. Die Veränderungen der Größenausprägung des Cerebellums bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppel-defizienten Mäusen könnten die Motorkoordination dieser Mäuse beeinflussen. Eine beeinträchtigte motorische Koordinationsfähigkeit CHL1-defizienter und NrCAM-defizienter Mäuse wird außerdem durch die Arbeiten von More et al. (2001) und Pratte et al. (2003) dargestellt (More et al., 2001; Pratte et al., 2003). Die motorische Koordinationsfähigkeit CHL1/NrCAM-doppeldefizienter Mäuse wurde bisher noch nicht untersucht. Um den Einfluss der Defizienzen von CHL1 und NrCAM auf die Informationsfilterung und die Motorkoordination zu untersuchen, sind CHL1-defiziente, NrCAM-defiziente und CHL1/NrCAM-doppel-defiziente Mäuse bezüglich ihres Verhaltens bei der Präpuls-Inhibition und dem Rota-Rod Test untersucht worden.

3.3.1 Präpuls-Inhibition

Nach einem akustischen Schreckreiz führt die Schreckreaktion zu der reflexartigen Kontraktion der Körpermuskulatur der untersuchten Maus, die auf einer Sensorplatte sitzt. Die aus der Schreckreaktion der Maus resultierende maximale Beschleunigung der Belastungsveränderung wird von dieser Sensorplatte erfasst und zeigt das Ausmaß der Schreckreaktion an. Bei der Präpuls-Inhibition der akustischen Schreckreaktion wird die Schreckreaktion von einem kurzzeitig vorher gebotenen schwächeren akustischen Reiz

(Präpuls) abgeschwächt. Diese Abschwächung wird als ein Maß für die Fähigkeit, Informationen zu filtern, angesehen (Übersichtsartikel: Braff et al., 2001). Der Vergleich CHL1-defizienter, NrCAM-defizienter und doppelmutanter Mäuse mit den Wildtypmäusen zeigte keinen signifikanten Unterschied der akustischen Schreckreaktion auf den bei einem Hintergrundrauschen von 70 dB gebotenen akustischen Schreckreiz von 120 dB (Ein-Weg ANOVA) (Abb. 24). Die Präpuls-Inhibition der Schreckreaktion durch vorangehende Präpulse von 73, 76, 79, 82, 85, 88, 91 und 94 dB unterschied sich ebenfalls nicht bei diesen Mäusen (Ein-Weg ANOVA und ANOVA mit wiederholten Messungen) (Abb. 25). Von diesen Daten ausgehend kann daher nicht auf eine Störung der Reizfilterung bei den mutanten Mäusen geschlossen werden.

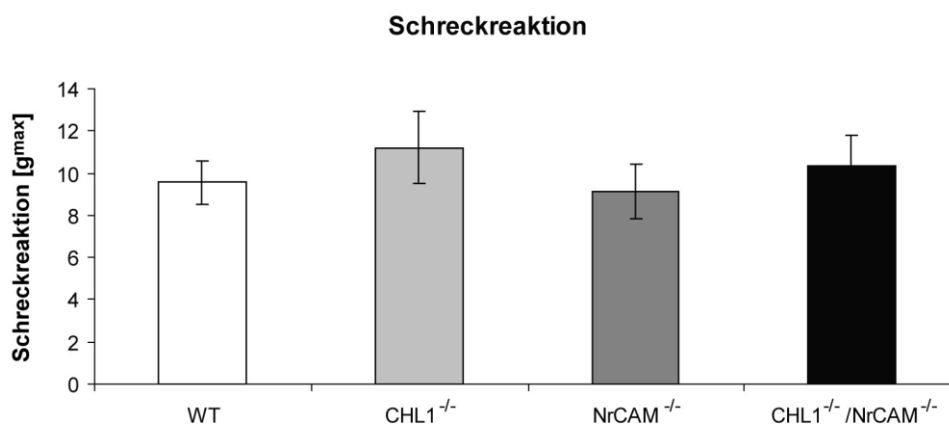


Abb. 24: Schreckreaktion nach akustischem Schreckreiz

Die Schreckreaktion nach dem akustischen Schreckreiz ist für Wildtypmäuse, CHL1-defiziente, NrCAM-defiziente und CHL1/NrCAM-defiziente Mäuse durch die maximale Beschleunigung der Belastungsveränderung durch Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Zwischen den Werten der Wildtypmäuse und der mutanten Mäuse bestehen keine signifikanten Unterschiede.

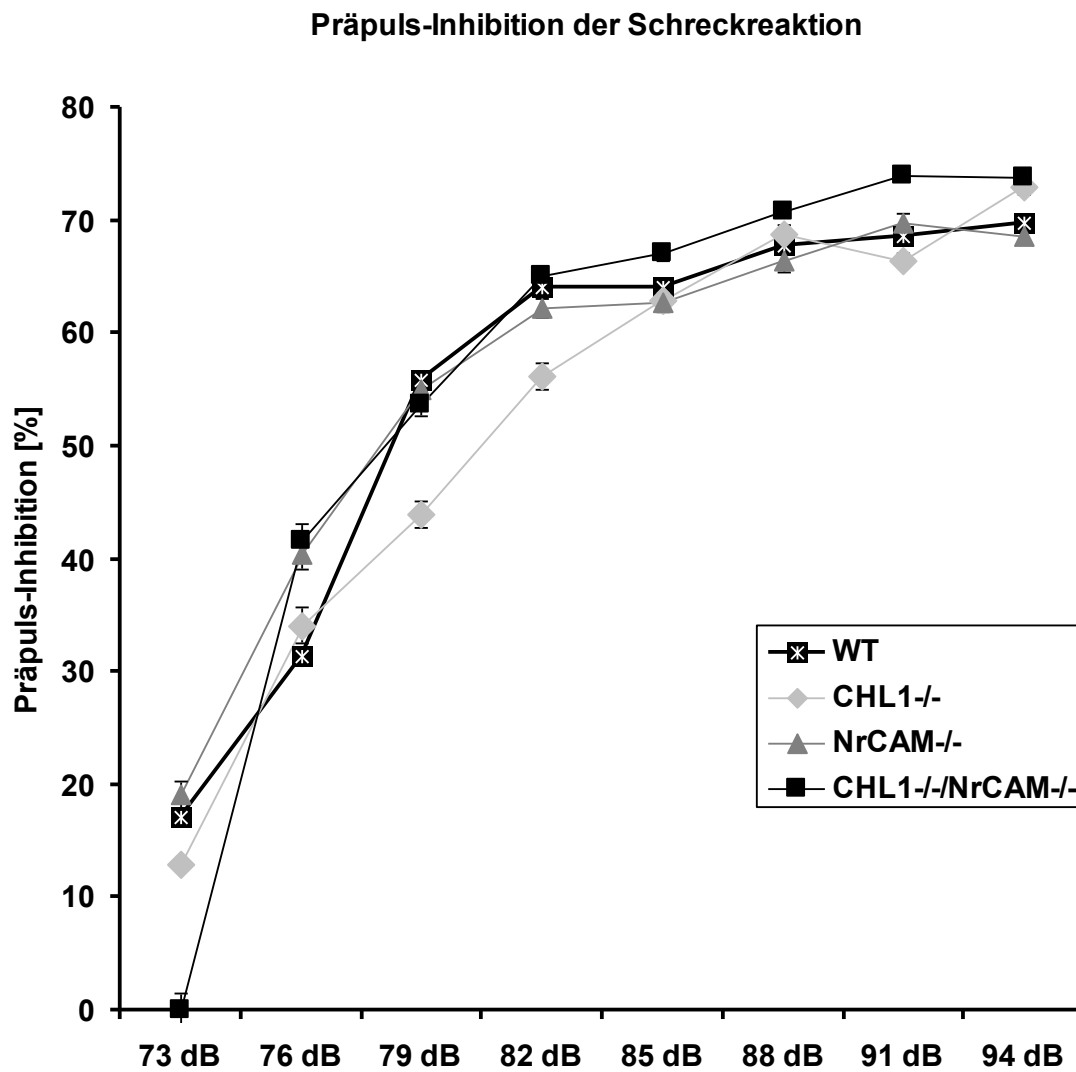


Abb. 25: Präpuls-Inhibition der Schreckreaktion

Die Schreckreaktion wurde durch acht verschiedene Präpulse (73dB-94dB) inhibiert. Das Ausmaß dieser Präpuls-Inhibition ist für Wildtypmäuse, CHL1-defiziente, NrCAM-defiziente und CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse durch Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Wildtypmäuse und mutante Mäuse unterscheiden sich nicht durch das Ausmaß der Präpuls-Inhibition.

3.3.2 Rota-Rod

Bei diesem Verhaltenstest wurden die Mäuse in zwei Trainingsdurchgängen an einem Tag auf einen Stab gesetzt, der sich in einem Zeitraum von 5 Minuten beschleunigend (4 – 40 r.p.m.) dreht. Nach einer Pause von zwei Tagen wurden die Mäuse für eine Zeitdauer von maximal 5 Minuten auf diesen Stab gesetzt, der sich jeweils mit einer konstanten Geschwindigkeit von 16, 24, 32 und 40 r.p.m. dreht. Die Zeitdauer, die diese Mäuse pro getesteter Umdrehungsgeschwindigkeit auf dem Stab verbringen, wird als Maß für ihre motorische Koordinationsfähigkeit betrachtet. CHL1-defiziente, NrCAM-defiziente und CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse unterschieden sich nicht in der Zeit, in der sie sich auf dem Stab halten können (Ein-Weg ANOVA und ANOVA mit wiederholten Messungen) (Abb. 26). Somit kann aus den Daten nicht auf eine Veränderung der Motorkoordination bei den mutanten Mäusen geschlossen werden.

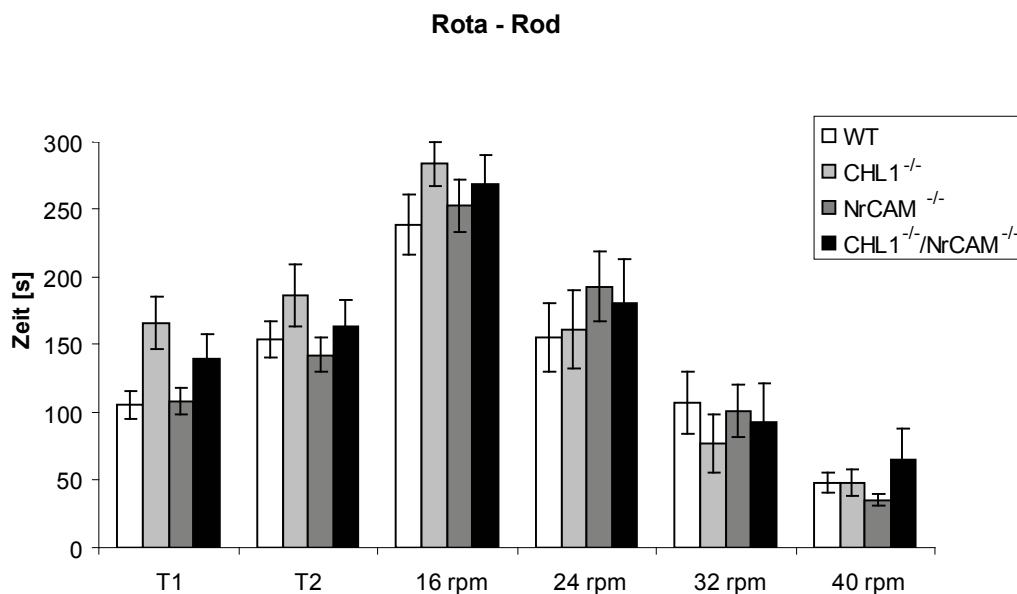


Abb.26: Rota-Rod Test

Die Zeit, die sich die Mäuse auf dem rotierenden Stab halten konnten, wurde in zwei Trainingsdurchgängen und bei vier konstanten Umdrehungsgeschwindigkeiten (16 r.p.m. – 40 r.p.m) des Stabs gemessen und durch Mittelwerte und Standardfehler dargestellt. Wildtypmäuse, CHL1-defiziente, NrCAM-defiziente und CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse unterscheiden sich nicht in der Zeit, in der sie sich auf dem rotierenden Stab halten konnten.

4. Diskussion

Die vier transmembranen L1-Familienmitglieder bei Säugetieren sind phylogenetischen Studien zufolge durch Genduplikationen hervorgegangen, wodurch sowohl auf eine Erweiterung der Funktionen als auch auf eine Spezialisierung einzelner Mitglieder geschlossen werden kann (Übersichtsartikel: Hortsch, 1996, 2000). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich hierbei auf die Untersuchung der Familienmitglieder CHL1 und NrCAM.

Da die Ligandenbindungen des zuletzt identifizierten Mitglieds, CHL1, noch weitgehend unbekannt sind, wurde in dieser Arbeit der einzige in einem Hefescreen identifizierte Interaktionspartner von CHL1, CHL1-23, weiter bearbeitet.

Auf der Grundlage zellulärer und morphologischer Abweichungen bei CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen vorausgegangener Studien, erfolgte in dieser Arbeit ein direkter Vergleich von CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen in ausgewählten Hirnregionen (Sakurai et al., 2001; Montag-Sallaz et al., 2002). Im Zusammenhang mit der Proteinexpression dieser Moleküle wurde die axonale Wegfindung im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Bestimmung der Größenausprägung des ventrikulären Systems und des Cerebellums.

CHL1-23 als unbekanntes Gen

Das cDNA-Insert von CHL1-23 umfasst 670 bp, die vier Exons entsprechen, die dem Chromosom 17 der Ratte zugeordnet werden können. Die Sequenz von CHL1-23 kann außerdem durch zahlreiche EST-Klone der Ratte bestätigt werden. Diese EST-Klone belegen insgesamt fünf alternative gespleisste Exons und deuten somit an, dass die Sequenz von CHL1-23 nur einer von verschiedenen möglichen Isoformen entspricht. Die Sequenz von CHL1-23 wird weiterhin durch Übereinstimmungen mit den Sequenzen von EST-Klonen aus Maus und Mensch bestätigt. Die Sequenzen dieser EST-Klone sind auf synthetischen Abschnitten des Chromosoms 18 der Maus und des Chromosoms 10 beim Menschen lokalisiert. Die speziesübergreifende Konservierung von Abschnitten dieser Sequenz ist ein weiterer Hinweis auf die Existenz eines neuen Gens.

Der von der cDNA abgeleiteten Peptid-Sequenz von CHL1-23 fehlt das Start-Methionin. Einige Maus-EST-Klone beinhalten Sequenzabschnitte von ca. 70 weiter 5'gelegenen Nukleotiden, die jedoch ebenfalls kein Methionin codieren. Die Peptidsequenz von CHL1-23,

die sich aus dem vom Hefesystem abgeleiteten Leseraster ergibt, hat eine Länge von 115 AS. Die anderen möglichen offenen Leseraster sind deutlich kürzer und somit sehr wahrscheinlich für die Sequenz des Proteins nicht relevant und nicht funktionell. Die von EST-Klonen abgeleitete Datenbankanalyse der Mausequenzen führt zu der Vorhersage des unvollständigen Gens Q8C819_Mouse in diesem chromosomalen Abschnitt. Dieses Gen wird auch in der Ratte unter gleichem Namen vorhergesagt. Das vorhergesagte Gen Q8C819 ist im Genom der Ratte 3' vom Transkriptionsfaktor TCF8-Gen aufgeführt. Im Genom der Maus ist dieser Sequenzabschnitt auf dem Gegenstrang eingetragen. Die mit der Sequenz übereinstimmenden Bereiche im Genom des Menschen sind ebenfalls auf dem Gegenstrang lokalisiert (siehe Abb. 6). Da die chromosomale Anordnung der Gene zwischen Ratte und Maus ähnlicher sein sollte als zwischen Maus und Mensch, könnte dieser Umstand auf eine noch unzureichende Genauigkeit der Datenbankeinträge bzw. auf falsche Verknüpfungen der Sequenzen zurückzuführen sein.

Interaktion von CHL1-23 mit CHL1 und anderen L1-Familienmitgliedern

Aus der Dissertation von Frau Dr. Petra Dirks geht hervor, dass CHL1-23 im Hefesystem auch an die intrazellulären Domänen von L1 und Neurofascin, aber jedoch nicht an NrCAM binden kann. Die Bindung an CHL1 und die ausbleibende Bindung an NrCAM wurden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in dieser Arbeit bestätigt. Die intrazelluläre Domäne der Mitglieder der L1-Familie ist etwa 100 AS lang und hoch konserviert. Eine Interaktion mit mehr als einem Mitglied der Familie ist daher plausibel. Darüber hinaus weisen alle vier Mitglieder der Familie eine Interaktion ihrer intrazellulären Domänen mit Ankyrinen auf, die über die FIGQY Region bei L1, NrCAM und Neurofascin bzw. FIGAY Region bei CHL1 vermittelt wird (Davis and Bennett, 1994; Buhusi et al., 2003).

Im Hefe-Zwei-Hybrid System wurde getestet, welche Abschnitte von CHL1-23 die Bindung an CHL1 vermitteln. Da die Sequenz keine offensichtlichen Domänen aufweist, wurden zu diesem Zweck die Sequenzen der Exons entweder einzeln oder in Kombination für diese Interaktionsstudie eingesetzt. Da nur die Peptidsequenz, die aus Exon A und B zusammen abgeleitet wird, die Bindung von CHL1-23 an CHL1 ermöglicht, könnte eine bestimmte Tertiärstruktur, die aus dieser Peptidsequenz hervorgeht, für diese Bindung verantwortlich sein oder die Bindungsstelle den Übergang der von Exon A zu Exon B abgeleiteten Peptidsequenz mit einschließen. Die alternativ gespleissten Exons der Ratte, die aus den

EST-Klonen abgeleitet werden, sind bisher alle zwischen Exon B und C lokalisiert. Daher gibt es nach bisherigem Kenntnisstand keine Isoform der Ratte, bei der diese Bindungsregion nicht erhalten bleibt. Die EST-Klon-Sequenzen der Maus weisen gegenüber den Sequenzen der Ratte Unterschiede zwischen Exon A und B auf, die auf eine modifizierte oder durch alternatives Spleissing regulierte Bindung von CHL1-23 der Maus an CHL1 hinweisen könnten. Die Sequenzen der EST-Klone im Menschen weichen ebenfalls von der Sequenz von CHL1-23 in der Ratte ab und könnten somit ebenfalls eine Modifikation dieser Bindung andeuten. Aus der *in situ* Hybridisierungsstudie mit CHL1-23 geht hervor, dass die Transkripte sowohl während der Embryonalentwicklung als auch in postnatalen Stadien in allen untersuchten Regionen detektiert werden können. Dabei sind CHL1-23 Transkripte ebenso wie einige EST-Klone mit übereinstimmenden Sequenzen, auch außerhalb des Gehirns lokalisiert. Eine entwicklungsabhängige postnatale Hochregulation der Transkripte zeigt sich im Hippocampus und im Thalamus. Die weitläufige Verteilung von CHL1-23 in fast allen Bereichen des Gehirns und auch die Hochregulation der Transkripte in frühen postnatalen Stadien stimmt mit dem Expressionsverlauf der L1-Familienmitglieder überein (Hillenbrand et al., 1999; Lustig et al., 2001a; Sakurai et al., 2001; Dirks, Diss. 2003). So sind z. B. CHL1-23 und alle übrigen L1-Familienmitglieder in den Körnerzellen des Gyrus Dentatus und in den hippocampalen Pyramidenzellen zum Zeitpunkt P14 exprimiert. Ebenso findet eine gemeinsame Expression dieser Moleküle in allen Schichten des cerebralen Cortex zu diesem Zeitpunkt statt. In Übereinstimmung mit der Hefe-Interaktionsstudie zeigen diese Expressionsmuster, dass CHL1-23, L1, CHL1 und Neurofascin in den gleichen Zellen exprimiert werden und eine Interaktion dieser Moleküle prinzipiell möglich ist.

Bisherige experimentelle Ansätze und mögliche weiterführende Experimente

Die Versuche die Sequenz von CHL1-23 zu vervollständigen, umfassen verschiedene experimentelle Ansätze. Die Datenbanken wurden auf EST-Klone überprüft, die Aufschluss über das 5'Ende dieser Sequenz geben könnten. Von den über 25 EST-Klonen mit teilweise übereinstimmenden cDNA Sequenzen hat keiner einen vollständigen 5'Bereich enthalten. Es wurde eine cDNA Bank gescreent und mit Hilfe einer weiteren cDNA Bank und aus Hirngewebe isolierter poly A⁺ RNA verschiedene RACE-Strategien durchgeführt. Da die Sequenz von CHL1-23 60 bp vor dem 5'Ende des Hefeklons und 60 bp weiter 5'davon einen GC-Gehalt von über 80% hat, könnten sich Sekundärstrukturen gebildet haben, die der

reversen Transkriptase nicht zugänglich waren. Da die vollständige Sequenz von CHL1-23 nicht kloniert werden konnte, wurden Proteine aus Hirnhomogenaten, die von CHL1-23 Antikörpern nach elektrophoretischer zwei-dimensionaler Auftrennung in einem Western Blot erkannt wurden, massenspektrometrisch analysiert, um weitere Peptidsequenzen von CHL1-23 zu erhalten. Neben der Weiterführung dieser Versuchsansätze wären auch Fraktionierungen von Hirnhomogenaten durch verschiedene chromatographische Ansätze möglich, in denen CHL1-23 mit Hilfe der Antikörper detektiert werden könnte. Das auf diese Weise in einer Fraktion angereicherte Protein CHL1-23 könnte dann massenspektrometrisch analysiert oder N-terminal ansequenziert werden.

Um die Interaktion von CHL1-23 mit CHL1 zu bestätigen, wäre es sinnvoll auch die EST-Klone aus Maus und Mensch im Hefe-Zwei-Hybridsystem einzusetzen, um auch für diese Spezies die Interaktion zu testen. Eine weitere Eingrenzung der Bindungsregion der intrazellulären Domäne von CHL1 könnte im Vergleich mit den intrazellulären Domänen von L1 und Neurofascin einen Aufschluss darüber geben, wieso eine Bindung von CHL1-23 an L1, CHL1 und Neurofascin, aber nicht an NrCAM möglich ist. Es wäre auch wichtig, die Interaktion in einem vom Hefesystem unabhängigen System zu bestätigen. Da die Kotransfektion von CHL1 und CHL1-23 in Cos-7 Zellen nicht zu einer Kolo-kalisation beider Proteine in diesen Zellen geführt hat, könnte diese Bindung auch vom physiologischen Zustand der Zelle wie der Bindung von Liganden oder einem bestimmten Phosphorylierungsmuster abhängen. Zusätzlich zu einer Darstellung der Bindung im Zellkultursystem, könnte versucht werden, die Interaktion mit einem Pull-down Essay oder einer Immunpräzipitation zu bestätigen.

Um die Frage nach weiteren intrazellulären Interaktionspartnern von CHL1 zu beantworten, könnte auch ein neuer Hefe-Zwei-Hybridscreen durchgeführt werden, da es möglicherweise noch andere Kandidaten für diese Interaktion gibt.

Proteinexpression und axonale Wegfindung von CHL1 und NrCAM im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus

Die Expression der Moleküle der L1-Familie ist in den meisten Hirnregionen während der Entwicklung und im ausgereiften Nervensystem nachzuweisen. Die vier transmembranen Mitglieder der L1-Familie sind in spezifischen aber teilweise überlappenden Mustern exprimiert. Diese Angaben beziehen sich auf *in situ* Hybridisierungen oder

Antikörperfärbungen in bestimmten Regionen oder Entwicklungsstadien (Moscoso and Sanes, 1995; Hillenbrand et al., 1999; Lustig et al., 2001a; Sakurai et al., 2001; Backer et al., 2002). Die Proteinexpression von CHL1 im olfaktorischen Bulbus und die Proteinexpression von NrCAM im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus in adulten Mäusen waren bisher nicht bekannt und sollten im Hinblick auf die subzelluläre Verteilung dieser Moleküle dargestellt und verglichen werden.

In der vorausgegangenen Studie von Montag-Sallaz et al. (2002) wurden abweichende axonale Projektionen im Hippocampus und olfaktorischen Bulbus von CHL1-defizienten Mäusen gezeigt (Montag-Sallaz et al., 2002). Bei NrCAM-defizienten Mäusen wurden abweichende axonale Projektionen im visuellen System und in der anterioren Commissur nachgewiesen (More et al., 2001; Falk et al., 2005; Williams et al., 2006). Wie sich die Defizienz von NrCAM und die Doppeldefizienz von CHL1 und NrCAM auf die axonalen Projektionen im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus auswirken, war bisher nicht bekannt. Daher wurden in dieser Arbeit NrCAM-defiziente Mäuse und CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse in Bezug auf die Projektionen der hippocampalen Moosfasern und der olfaktorischen sensorischen Neurone untersucht und mit CHL1-defizienten Mäusen und Wildtypmäusen verglichen.

Proteinexpression im Hippocampus und im olfaktorischen Bulbus

Die Proteinexpression von CHL1 und NrCAM ist in adulten Mäusen weitläufig im gesamten Hippocampus verteilt. Nur die Zellkörper der Körner- und Pyramidenzellen in den jeweiligen Schichten sind ungefärbt. Bei der CHL1-Färbung treten besonders die Moosfasern und das Subiculum hervor, während die übrigen Teile des Hippocampus gleichmäßig schwach gefärbt sind. Die Färbung von NrCAM im Hippocampus ist weitgehend gleichmäßig verteilt und stark ausgeprägt.

Die gleichmäßige diffuse Färbung beider Moleküle ohne sichtbare zelluläre Konturen kann sowohl auf CHL1 und NrCAM als Transmembranproteine zurückzuführen sein, als auch auf mögliche lösliche Isoformen dieser Proteine in der ECM (Naus et al., 2004; Conacci-Sorrell et al., 2005). Aufgrund der starken Expression von CHL1 auf den Moosfasern wäre es möglich, dass CHL1 als Rezeptor auf diesen Fasern von Bedeutung ist. In der Arbeit von Nikonenko et al. (2006) wird ebenfalls die Proteinexpression von CHL1 im Hippocampus beschrieben (Nikonenko et al., 2006). Im Gegensatz zur Färbung der vorliegenden Arbeit zeichneten sich

in dieser Arbeit auch die Zellkörper von Interneuronen durch intensive Färbung aus. Diese Unterschiede können auf die verschiedenen Färbeprotokolle oder die verwendeten Antikörper zurückzuführen sein. In der Arbeit von Nikonenko et al. (2006) wurde das Gewebe zur Antigendemaskierung in 0,01 M Natriumcitrat bei 80°C im Wasserbad erhitzt und mit 0,2% Triton X-100 behandelt, während in der vorliegenden Arbeit das Gewebe nur mit Methanol inkubiert worden ist. Die Antikörper dieser Arbeit sind gegen eine Peptidsequenz in der ersten Fibronectin III-ähnlichen Domäne von CHL1 gerichtet. Im Unterschied dazu wurde in der Arbeit von Nikonenko et al. (2006) der gesamte extrazelluläre Teil von CHL1 zur Immunisierung verwendet. Die aus der Immunisierung mit der gesamten extrazellulären Domäne hervorgegangenen Antikörper erkennen gegenüber den Antikörpern dieser Studie möglicherweise eine größere Zahl verschiedener Epitope.

Die Expression von CHL1 und NrCAM im olfaktorischen Bulbus ist im Gegensatz zur überlappenden und großflächig diffusen Verteilung im Hippocampus klar abgegrenzt und komplementär. Die CHL1-Expression ist ausschließlich auf den einwachsenden Axonen der primären sensorischen Neurone zu finden, während die NrCAM Expression überall bis auf die glomeruläre Schicht diffus verteilt ist. Eine Ausnahme davon bilden einige periglomeruläre Zellen an der Grenze zur äußeren plexiformen Schicht, die von NrCAM-Expression umgeben sind. Da auch *in situ* Hybridisierungen keine mRNA Expression von CHL1 im olfaktorischen Bulbus detektiert wird (Montag-Sallaz et al., 2002), liegt CHL1 in dieser Hirnregion wahrscheinlich nur als Rezeptor auf den einwachsenden Axonen der sensorischen Neurone vor, während die gleichmäßige Verteilung von NrCAM auch auf mögliche lösliche Isoformen dieses Protein zurückzuführen sein könnte (Montag-Sallaz et al., 2002; Conacci-Sorrell et al., 2005).

Hippocampale Moosfaserprojektionen

Die hippocampalen Moosfasern der CHL1-defizienten Mäuse zeigen eine defekte Bündelung der Fasern und eine Störung der Zielfindung dieser Axone. Während durch die Färbung mit Calbindin ein häufigeres Kreuzen kleinerer Faserbündel zwischen den infra- und suprapyramidalen Moosfaserbündeln bei einem insgesamt lockerem Zusammenhalt der kleineren Bündel zu sehen war, zeigte neben der Timms-Färbung besonders die Synaptophysin-Färbung Faserterminalien, die gehäuft auf Pyramidenzellkörper anstatt auf die proximalen Pyramidenzellendriten zu terminieren schienen. Der Hippocampus ist eine

Hirnstruktur, die sich durch eine hohe Plastizität auszeichnet. Während der gesamten Lebenszeit entstehen in der Subgranulärzone des Gyrus Dentatus neue Neurone, die u.a. zu Körnerzellen ausdifferenzieren und in die schon bestehenden Verschaltungen des Hippocampus integriert werden (Übersichtsartikel: Laplagne et al., 2006; Lledo et al., 2006). Somit können die Defekte der axonalen Moosfaserprojektionen keinem bestimmten Stadium der Entwicklung zugeordnet werden. Es ist möglich, dass eine Störung in der Zielfindung der ersten Pionieraxone vorliegt und die nachfolgenden Axone dann ebenfalls falsch auswachsen. Ebenso vorstellbar ist ein vorrangiges Problem bei der Bündelung nachfolgender Fasern, das zusätzlich oder unabhängig von der Zielfindung der ersten Axone besteht. Die gefundenen Fehlprojektionen der hippocampalen Moosfasern der CHL1-defizienten Mäuse betreffen nur einen Teil dieser Axone. CHL1 ist daher für die Wegfindung dieser Axone nicht allein zuständig, sondern scheint eher eine Rolle bei der Optimierung dieser Projektionen zu spielen. Aus Studien, in denen weitere mutante Mäuse untersucht worden sind, geht hervor, dass noch andere Moleküle wie z. B. PSA-NCAM, Neuropilin2, Sema3F, Plexin-A3 und der serum response factor an der Wegfindung dieser Axone beteiligt sind (Cremer et al., 1997; Seki and Rutishauser, 1998; Chen et al., 2000; Giger et al., 2000; Sahay et al., 2003; Angata et al., 2004; Liu et al., 2005; Knoll et al., 2006). Die Phänotypen dieser verschiedenen Mausmutanten sind ähnlich, weisen aber subtilere Unterschiede auf, die sowohl auf überlappende als auch auf spezifische Funktionen dieser Moleküle in Bezug auf die Wegfindung der Moosfasern hindeuten. Bei NCAM-defizienten Mäusen ist durch eine Golgi-Färbung eine verringerte Zahl großer Spines pyramidaler CA3 Neurone sichtbar geworden, auf die die Moosfasern terminieren (Cremer et al., 1997). Elektronenmikroskopische und elektrophysiologische Untersuchungen pyramidaler CA1 Neurone CHL1-defizienter Mäuse zeigen strukturelle und funktionelle Abweichungen der synaptischen Verschaltungen der hippocampalen CA1 Region (Nikonenko et al., 2006). Detailliertere strukturelle und funktionelle Untersuchungen der Körnerzellen und der hippocampalen CA3 Region CHL1-defizienter Mäuse, könnten daher weiteren Aufschluss über die Fehlprojektionen hippocampaler Moosfasern und der daraus resultierenden Fehlfunktionen liefern. Bei Axonen des Rückenmarks und der anterioren Commissur wird die durch L1 bzw. NrCAM vermittelte Wegfindung durch eine Interaktion mit Semaphorinen der Klasse 3 mitbestimmt (Castellani et al., 2000; Falk et al., 2005). Da Semaphorin3F-defiziente Mäuse axonale Fehlprojektionen im Hippocampus aufweisen (Sahay et al., 2003), könnte auch dort eine Interaktion zwischen CHL1 und den Klasse 3 Semaphorinen die Wegfindung der Moosfasern regulieren.

Im Gegensatz zu den CHL1-defizienten Mäusen waren die hippocampalen Moosfaserprojektionen der NrCAM-defizienten Mäuse von denen der Wildtypmäuse nicht zu unterscheiden. Daher ist anzunehmen, dass NrCAM für diese axonalen Projektionen keine grosse Bedeutung hat. Dennoch können Auswirkungen auf diese Projektion durch das Fehlen von NrCAM von der Anwesenheit von CHL1 oder anderer Proteine maskiert werden. Daher sind auch die Moosfasern CHL1/NrCAM-doppeldefizienter Mäuse untersucht worden. Die Moosfasern der Doppelmutanten unterscheiden sich jedoch nicht von den Projektionen der CHL1-defizienten Mäuse. Die Beurteilung dieser Fehlprojektionen ist rein qualitativ durchgeführt worden, da das Erscheinungsbild dieser Fehlprojektionen innerhalb einer Hirnhälfte und auch zwischen verschiedenen Tieren sehr variabel ausgeprägt ist und von vielen Parametern gleichzeitig abhängt. Subtilere Unterschiede zwischen den Moosfaserprojektionen der CHL1-defizienten Mäuse, der NrCAM-defizienten Mäuse und den Doppelmutanten sind daher nur schwer auszuschließen.

Projektionen primärer olfaktorischer Neurone

In einer weiteren Hirnregion, dem olfaktorischen Bulbus, sind ebenfalls Abweichungen in der Bündelung und Zielfindung der Axone bei CHL1-defizienten Mäusen gefunden worden (Montag-Sallaz et al., 2002). Einige Axone der primären sensorischen Neurone des nasalen Riechepithels der CHL1-defizienten Mäuse terminieren nicht in der glomerulären Schicht des olfaktorischen Bulbus, sondern in der äußeren plexiformen Schicht oder terminieren in mehr als einem Glomerulus. Diese Fehlprojektionen treten bei Wildtypmäusen während der Entwicklung bis zum fünften postnatalen Tag auf (Royal and Key, 1999; Kim and Greer, 2000). Danach werden durch einen aktivitätsabhängigen Reifungsprozess der ausgebildeten Verschaltungen überflüssige oder falsche Projektionen beseitigt. Der olfaktorische Bulbus ist wie der Hippocampus eine Struktur, die sich durch eine sehr hohe Plastizität auszeichnet. Über die Wanderung von Neuroblasten im rostralen migratorischen Strom, die zu Interneuronen ausdifferenzieren, werden dem olfaktorischen Bulbus lebenslang neue Neurone zugeführt, die sich in die bestehenden Verschaltungen integrieren (Übersichtsartikel: Coskun and Luskin, 2002; Lledo et al., 2006). Auch die Neurone des Riechepithels werden ständig erneuert und auswachsende Axone knüpfen daher ebenfalls während der gesamten Lebensspanne neue Verbindungen mit ihrem glomerulären Zielgebiet im olfaktorischen Bulbus. Daher können die Projektionen der olfaktorischen sensorischen Neurone der CHL1-

defizienten Mäuse ebenfalls keinem bestimmten Stadium der Entwicklung zugeordnet werden, auch wenn der Phänotyp einen fehlerhaften Reifungsprozess dieser axonalen Projektionen vermuten lässt.

Bei der Analyse der NrCAM-defizienten Mäuse sind ähnliche Fehlprojektionen wie bei den CHL1-defizienten Mäusen festgestellt worden. Auch bei den Doppelmütanten treten diese fehlerhaften axonalen Projektionen auf. Ein qualitativer Unterschied zwischen den Mutanten war nicht zu erkennen. Ähnlich wie bei der Analyse des Moosfasersystems ist eine Quantifizierung durch die häufig nur unvollständig abgebildeten Glomeruli einer Ebene kaum möglich und subtilere Unterschiede zwischen den Mutanten daher nicht auszuschließen.

Die Expression von CHL1 und NrCAM im olfaktorischen Bulbus ist im Gegensatz zur überlappenden Verteilung im Hippocampus klar abgegrenzt und komplementär. Das komplementäre Expressionsmuster zeigt, dass CHL1 und NrCAM verschiedene Schritte bei der Wegfindung und Zielerkennung dieser Axone kontrollieren, die eine homophile Trans-Interaktion dieser Moleküle ausschließen. Da CHL1 nur auf den einwachsenden Fasern exprimiert ist, lässt es eine Rolle dieses Moleküls als Rezeptor auf diesen Fasern bei der Wegfindung vermuten und möglicherweise auch eine Beteiligung bei der Zielerkennung dieser Axone. NrCAM ist dagegen mit Ausnahme weniger periglomerulärer Zellen ausschließlich in der der Zielregion angrenzenden äußeren plexiformen Schicht exprimiert. Daher könnte NrCAM eine repulsive Wirkung auf die Axone ausüben, die das Einwachsen der Fasern in die äußere plexiforme Schicht verhindert und somit die angemessene Zielerkennung fördert.

Wie im hippocampalen Moosfasersystem sind nicht alle axonalen Projektionen der sensorischen Neurone fehlerhaft. Daher scheinen CHL1 und NrCAM auch in diesem Fasersystem für die Optimierung der axonalen Projektionen zuständig zu sein. Die Untersuchung weiterer mutanter Mäuse zeigt hierbei die Beteiligung anderer Moleküle wie cyclic nucleotide-gated channel subunit 1 (OCNC1), olfactory marker protein (OMP), olfactory cell adhesion molecule (OCAM), Neuropilin2 und Sema3F an der Wegfindung der Axone des olfaktorischen Nerven (Baker et al., 1999; Zheng et al., 2000; Cloutier et al., 2002; Walz et al., 2002; Cloutier et al., 2004; St John and Key, 2005; Walz et al., 2006).

Die Verarbeitung olfaktorischer Stimuli wird von der topologischen Organisation der axonalen Projektionen der olfaktorischen sensorischen Neurone bestimmt (Übersichtsartikel: Mori et al., 1999; Mombaerts, 2001, 2006; Strotmann and Breer, 2006). Olfaktorische sensorische Neurone, die einen bestimmten olfaktorischen Rezeptor exprimieren, sind in einer von vier verschiedenen Zonen des nasalen Riechepithels lokalisiert und beeinflussen die

Wegfindung der axonalen Projektionen zu bestimmten glomerulären Zielregionen im olfaktorischen Bulbus. Typischerweise projizieren Axone, mit einem bestimmten Rezeptor zu einem Glomerulus einer Bulbushälfte, also zu vier Glomeruli einer Maus (Übersichtsartikel: Mombaerts, 2006). Von den Wegfindungsmolekülen, die ebenfalls die Projektionen dieser Axone regulieren, ist OCAM in einer zonenspezifischen Weise exprimiert (Yoshihara et al., 1997; Walz et al., 2006). Andere Wegfindungsmoleküle wie Neuropilin1 und Neuropilin2 sind dagegen in Glomeruli bestimmter glomerulärer Domänen exprimiert, die jedoch nicht notwendigerweise mit bestimmten epithelialen Zonen in Verbindung stehen (Übersichtsartikel: Mombaerts, 2004). In Bezug auf die fehlerhaften Projektionen der CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit die Glomeruli, die überschießende axonale Projektionen aufweisen, einer bestimmten Region im nasalen Epithelium oder einer bestimmten glomerulären Region im olfaktorischen Bulbus zugeordnet werden können. Die Analyse Semaphorin3F-defizienter und Neuropilin-defizienter Mäuse, zeigt ähnlich wie bei CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen eine Störung der Wegfindung olfaktorischer sensorischer Neurone (Cloutier et al., 2002; Walz et al., 2002; Cloutier et al., 2004). Im Hinblick auf die durch die Interaktion von L1 bzw. NrCAM mit Klasse 3 Semaphorinen vermittelte Wegfindung in anderen Hirnregionen, wäre es interessant zu untersuchen, ob an der sensorischen Innervation des olfaktorischen Bulbus eine Interaktionen zwischen CHL1 oder NrCAM mit Semaphorinen der Klasse 3 oder ihren Liganden, den Neuropilinen, zugrunde liegt (Castellani et al., 2000; Sahay et al., 2003).

Größenausprägung des ventrikulären Systems und des cerebellaren Vermis

In der Arbeit von Montag-Sallaz et al. (2002) wurden bei CHL1-defizienten Mäusen die Erweiterung der lateralen Ventrikel beobachtet und qualitativ in histologischen Schnittpräparaten dargestellt (Montag-Sallaz et al., 2002). In einer Arbeit von Sakurai et al. (2001) ist bei NrCAM-defizienten Mäusen eine Verkleinerung einiger Lobuli des cerebellaren Vermis festgestellt worden (Sakurai et al., 2001). Eine Verkleinerung der Gesamtgröße des cerebellaren Vermis wurde auch bei L1-defizienten Mäusen im Zusammenhang mit einer Erweiterung des vierten Ventrikels beobachtet (Fransen et al., 1998). Um Aufschluss über ähnliche morphologische Veränderungen bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und doppelmutanten Mäusen zu erhalten, sind in dieser Arbeit die Größe des ventrikulären Systems und die Größe des cerebellaren Vermis und einzelner Lobuli untersucht worden.

Größenausprägung des ventrikulären Systems

Die Ventrikelgrößen von CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und doppelmutanten Mäusen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Angenstein mittels Magnet-Resonanztomographie gemessen, was eine von histologischen Artefakten freie Untersuchung lebender Tiere ermöglicht. Wie schon in der Arbeit von Montag-Sallaz et al. (2002) dargestellt, waren die Volumina der Ventrikel bei CHL1-defizienten Mäusen vergrößert (Montag-Sallaz et al., 2002). Eine Vergrößerung der Ventrikel wird auch bei L1-defizienten Mäusen beobachtet und zeigt, dass beide Moleküle überlappende Funktionen ausüben (Fransen et al., 1998). Die Ausprägung dieser Phänotypen ist variabel und hängt sowohl bei CHL1-defizienten als auch bei L1-defizienten Mäusen vom genetischen Hintergrund ab und weist den Einfluss weiterer modifizierender Gene bei der Größenausprägung der Ventrikel hin. Mutationen des L1-Gens beim Menschen sind ebenfalls mit vergrößerten Ventrikeln und teilweise mit der Ausbildung eines Hydrocephalus verbunden. Über 70 verschiedene Mutationen des L1-Gens beim Menschen führen zum variabel ausgeprägten CRASH-Syndrom (Akronym für corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia, and hydrocephalus), dessen Hauptmerkmale einen ebenso variabel ausgeprägten Hydrocephalus mit einschließen (Übersichtsartikel: Kenwrick et al., 2000). Weitere Mutationen der humanen L1- und CHL1-Gene werden mit Schizophrenie in Verbindung gebracht, einer Erkrankung, die häufig auch mit erweiterten Ventrikeln einhergeht (Sakurai et al., 2002; Chen et al., 2005; Chua et al., 2007).

Über veränderte Ventrikelgrößen bei NrCAM-defizienten Mäusen war bisher noch nichts bekannt. Die initialen Untersuchungen der zwei NrCAM-defizienten Mauslinien von Sakurai et al. (2001) und More et al. (2001) ließen mit Ausnahme der Veränderung einzelner cerebellaren Lobuli in der Arbeit von Sakurai et al. (2001) auf eine unauffällige Ausprägung der allgemeinen Hirnmorphologie schließen (More et al., 2001; Sakurai et al., 2001). Die Messung des Gesamthirnvolumens in dieser Arbeit bei den Einzelmutanten und den Doppelmutanten gibt ebenfalls keinen Hinweis auf schwerwiegende Veränderungen der Hirnmorphologie. Da das Gesamtventrikelvolumen jedoch nur ein Fünfzigstel des Gesamthirnvolumens beträgt, wären Unterschiede in den Ventrikelgrößen nicht ausreichend, um das Gesamthirnvolumen signifikant zu beeinflussen. Die Quantifizierung der Ventrikelgrößen in dieser Arbeit zeigte eine Verkleinerung des ventrikulären Gesamtvolumens der NrCAM-defizienten Mäuse. Im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten war die Gesamtgröße des ventrikulären Systems der doppelmutanten Mäuse

statistisch nicht von der Gesamtgröße der Ventrikel der Wildtypmäuse zu unterscheiden. Somit modulieren sowohl CHL1 als auch NrCAM die Größenausprägung des ventrikulären Systems, scheinen aber in entgegengesetzter Weise zu wirken. Die Analyse des ventrikulären Gesamtvolumens der Doppelmutanten zeigt auch, dass sich keine der beiden Mutationen vollständig durchsetzt.

Das ventrikuläre System besteht insgesamt aus vier Ventrikeln. Es gibt zwei symmetrisch angelegte laterale Ventrikel, die über den dritten Ventrikel miteinander verbunden sind. Der dritte Ventrikel steht über den schmalen Aquaeductus Sylvii mit dem vierten Ventrikel in Verbindung. Eine getrennte Auswertung des vierten Ventrikels von den ersten drei Ventrikeln zeigte bei NrCAM-defizienten Mäusen und den Doppelmutanten eine Erweiterung des vierten Ventrikels. Die Größe des vierten Ventrikels der CHL1-defizienten Mäuse unterscheidet sich dagegen nicht von denen der Wildtypmäuse. Da die Größe des vierten Ventrikels nur 10% des Gesamtvolumens der Ventrikel ausmacht, ist der Einfluss auf das Gesamtvolumen nur gering. Daher bleiben die Größenverhältnisse der Ventrikel zwischen den Mutanten aus der Analyse des Gesamtvolumens bestehen, wenn sie nur auf die ersten drei Ventrikel bezogen werden. Diese Auswertung legt auch den Schluß nahe, dass die Vergrößerung des vierten Ventrikels der Doppelmutanten auf die Mutation von NrCAM zurückzuführen ist. Es wird außerdem gezeigt, dass die Defizienz von NrCAM in Bezug auf die ersten drei Ventrikel und den vierten Ventrikel entgegengesetzte Auswirkungen hat. Diese regionspezifische Funktion von NrCAM könnte darauf hindeuten, dass die Größenausprägung des vierten Ventrikels anders als die der übrigen Ventrikel reguliert wird. Durch diese detailliertere Analyse der Ventrikelgrößen ist ein für die beiden Einzel- und die Doppelmutanten spezifisches Muster an Größenveränderungen zu erkennen. Im Vergleich mit den L1-defizienten Mäusen, bei denen eine Erweiterung der lateralen Ventrikel und des vierten Ventrikels gezeigt wurde (Fransen et al., 1998), werden bei CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen auch im Hinblick auf die Ausbildung des ventrikulären Systems sowohl überlappende als auch spezifische Funktionen festgestellt.

Im ventrikulären System wird cerebrospinale Flüssigkeit transportiert, die Gehirn und Rückenmark umspült und dadurch stoßdämpfend und gewichtsverringend wirkt. Überproduktion, unzureichende Absorption und Obstruktion des CSF-Flusses führen zu erweiterten Ventrikeln bzw. zur Ausbildung eines Hydrocephalus. Weitere Größenveränderungen der Ventrikel werden auch bei Entwicklungsstörungen oder bei degenerativen und psychiatrischen Erkrankungen durch Verlust von Hirnsubstanz festgestellt

(Schweitzer et al., 2001; Crews et al., 2004; Banizs et al., 2005; Carmichael et al., 2007; Chua et al., 2007) .

Bei L1-defizienten Mäusen wird nur bei einigen Tieren mit starker Hydrocephalusausbildung eine Obstruktion des Aquaeductus Silvii gefunden (Rolf et al., 2001). Teilweise wird auch eine Erweiterung des Aquaeductus Silvii gezeigt. Eine Hypoplasie des Corpus Callosums und des cerebellaren Vermis und ein kleinerer Hippocampus können ebenfalls zur Erweiterung der Ventrikel bei L1-defizienten Mäusen beitragen (Fransen et al., 1998; Demyanenko et al., 1999). Die Erweiterung der Ventrikel bei CHL1-defizienten Mäusen ist noch nicht im Zusammenhang mit einem Hydrocephalus beobachtet worden und bei CHL1-defizienten Mäusen und NrCAM-defizienten Mäusen sind bis auf einzelne Lobuli des cerebellaren Vermis bei NrCAM-defizienten Mäusen keine unterentwickelten oder deformierten Hirnbereiche bekannt.

Da die Größe der Ventrikel von denen sie umgebenden Hirnbereichen bestimmt wird und das Cerebellum an den vierten Ventrikel angrenzt, könnte eine Verkleinerung der cerebellaren Lobuli mit der Erweiterung des vierten Ventrikels in Zusammenhang stehen. Daher sind in dieser Arbeit die Größenausprägungen des Cerebellums und einzelner Lobuli bei den Einzelmutanten und Doppelmutanten untersucht worden.

Größenausprägung des cerebellaren Vermis und einzelner Lobuli

Da die Magnet-Resonanz-Tomographische Auflösung nicht ausreichte, um eine genaue Größenbestimmung einzelner Lobuli des Vermis durchzuführen, wurden diese Messungen an histologischen Schnittpräparaten durchgeführt. Der posteriore Teil des vierten Ventrikels wird durch das Cerebellum begrenzt. Der unpaare Teil des Cerebellums, der Vermis, bestimmt dabei einen größeren Teil dieser Begrenzung. Ähnlich wie in der Arbeit von Sakurai et al. (2001) sind in dieser Arbeit Größemessungen an midsagittalen Schnitten des Vermis durchgeführt worden (Sakurai et al., 2001). Die beiden Einzel- und Doppelmutanten sind bezüglich der Gesamtgröße des Vermis und der Größe einzelner Lobuli untersucht worden. Bei NrCAM-defizienten Mäusen war die Gesamtgröße des Vermis reduziert und eine Verkleinerung einzelner Lobuli konnte bestätigt werden. CHL1-defiziente Mäuse zeigten keine Veränderung der Gesamtgröße des Vermis, aber ein spezifisches Muster an Größenveränderungen einzelner Lobuli. Die Gesamtgröße des Vermis war ebenso wie einige bestimmte Lobuli auch bei den Doppelmutanten reduziert. Der Größenvergleich einzelner

Lobuli zeigt kaum eine Verstärkung bestehender Veränderungen bei den Doppelmutanten. L1-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls eine Veränderung der Größe einzelner Lobuli (Fransen et al., 1998). Somit zeigen sich auch in der Morphologie des Cerebellums sowohl überlappende als auch spezifische Veränderungen in der Größenausprägung des Vermis. In keiner der Mutanten wurden auffällige Veränderungen der Molekularschicht und der Körnerzellschicht beobachtet (Fransen et al., 1998; Sakurai et al., 2001). In der Arbeit von Sakurai et al. (2001) zeigen NrCAM/L1-doppeldefiziente Mäuse jedoch schwerwiegende cerebellare Defekte mit einer starken Reduktion der Gesamtgröße des Cerebellums und der Dicke der Körnerzellschicht. Es wird vermutet, dass die milden Phänotypen der NrCAM- und L1-defizienten Mäuse auf überlappende Funktionen der beiden Moleküle mit einer teilweise gegenseitigen Kompensation ihrer Funktionen zurückzuführen sein könnte (Sakurai et al., 2001). Auch die vorliegende Arbeit liefert einen Hinweis auf ähnliche Funktionen von CHL1 und NrCAM bei der Größenausprägung der Lobuli, die jedoch nicht zu überlappen scheinen, da eine Verstärkung des Phänotyps bei den Doppelmutanten ausbleibt. Die gleichmäßige Verteilung der Expression der Moleküle der transmembranen L1-Familie im Cerebellum lässt im Hinblick auf die spezifische Größenausprägung einzelner Lobuli in den Mutanten auf Interaktionen dieser Moleküle mit anderen Molekülen schließen, die weniger gleichmäßig exprimiert sind (Sakurai et al., 2001).

Die Verkleinerung des Vermis von L1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen korrelierte mit einer Vergrößerung des vierten Ventrikels. Bei CHL1-defizienten Mäusen war weder die Gesamtgröße des Vermis noch die Größe des vierten Ventrikels verändert. Die entwicklungsbedingte Ausbildung eines kleineren Vermis könnte daher zu einer Vergrößerung des vierten Ventrikels der L1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen beigetragen haben.

Die Größenentwicklung des Cerebellums wird von Proliferation, Migration und dem Überleben von Vorläuferzellen und weiter ausdifferenzierten Zellen bestimmt. Den vorherrschenden Zelltyp des Cerebellums bilden die Körnerzellen. Diese werden durch die Proliferation von Vorläuferzellen in der äußeren Körnerzellschicht gebildet, die nach ihrer letzten Zellteilung radial durch die darunterliegende Molekularschicht in die innere Körnerzellschicht wandern (Übersichtsartikel: Yacubova and Komuro, 2002).

CHL1 ist nicht in der äußeren Körnerzellschicht exprimiert und trägt daher vermutlich nicht zur Proliferation und tangentialen Migration der Vorläuferzellen entlang der äußeren Körnerzellschicht bei (Dirks, Diss. 2003). Während in der Dissertation von Dr. Petra Dirks die Expression der mRNA von NrCAM in der äußeren Körnerschicht detektiert wird, ist diese

Schicht in der Arbeit von Sakurai et al. (2001) frei von NrCAM-Transkripten (Sakurai et al., 2001). Für den Fall, dass CHL1 und NrCAM nicht in der äußeren Körnerzellschicht exprimiert werden, deutet die Abwesenheit dieser Moleküle in der Population der proliferierenden Zellen eher auf eine Rolle dieser Moleküle beim Überleben der neu gebildeten postmitotischen Körnerzellen hin oder auf einen Einfluss auf deren radiale Migration. Falls NrCAM in der äußeren Körnerzellschicht exprimiert wird, könnte dadurch auch die Proliferation und die tangentielle Migration beeinflusst werden, die in der Maus erst am Ende der dritten postnatalen Woche abgeschlossen ist (Übersichtsartikel: Mares et al., 1970; Hatten, 1999). In der Arbeit von Backer et al. (2002) wird die Expression von NrCAM zum Zeitpunkt E 12.5 in präcerebellaren Vorläuferzellen dargestellt (Backer et al., 2002). Somit könnte NrCAM auch früh in der Entwicklung bei der Anlage des Cerebellums die Größe dieser Struktur mitbestimmen.

Bei einer Erkrankung am CRASH Syndrom, an Schizophrenie, Autismus, der congenitalen okularen Motorapraxie und dem Joubert-Syndrom (charakterisiert durch Hypotonie, Entwicklungsverzögerung, Ataxie und abnormalen Augenbewegungen) wird ebenfalls eine Verkleinerung des Vermis und eine Erweiterung des vierten Ventrikels (CRASH-Syndrom, Joubert-Syndrom) beobachtet (Kovelman and Scheibel, 1986; Courchesne et al., 1993; Fransen et al., 1998; Kondo et al., 2007; Parisi et al., 2007).

Zu den am besten bekannten Aufgaben des Cerebellums gehört die Koordination der an einer Bewegung beteiligten Komponenten. Wie in den somatosensorischen Arealen des Vorderhirns besteht auch im Cerebellum eine somatotope Repräsentation des Körpers (Übersichtsartikel: Manni and Petrosini, 2004). Allerdings ist die Repräsentation im Cerebellum, anders als im Vorderhirn, nicht kontinuierlich und ein Körperteil ist in verschiedenen Regionen des Cerebellums repräsentiert (fraktionierte Somatotopie) (Shambes et al., 1978). Bildgebende Verfahren bestätigen hierbei Annahmen früherer morphologischer und pathophysiologischer Arbeiten von jeweils einer homunculusartigen Repräsentationen des Körpers im anterioren Lobus (Lobuli I-V) und im posterioren Lobus (Lobuli VI- IX). Die craniocaudale Repräsentation der Körperteile des anterioren Lobus verläuft dabei entgegengesetzt zur längsseitigen Körperachse. (Der Homunculus steht auf dem Kopf.) Einige grobe Zuordnungen bezüglich der Funktionen einzelner Lobuli konnten bisher vorgenommen werden (Grodd et al., 2001). Im anterioren Lobus sind die Füße in Lobuli I-II und Ellenbogengelenke und Arme in Lobuli IV-V repräsentiert. Im posterioren Lobus werden Zunge und Lippe in Lobulus VI, Arm, Handgelenke und Finger in Lobuli VI-VIII und Zehen in Lobuli VIII-IX repräsentiert (Manni and Petrosini, 2004). Den Lobuli VI-VII im Bereich

des Vermis scheint hierbei eine Funktion bei der Kontrolle der Augenbewegungen zu zukommen (z.B. Gleitbewegungen und Blicksakkaden) (Nitschke et al., 2005; Thier and Ilg, 2005; Catz and Thier, 2007). Die Aufgaben des Cerebellums schließen neben der Koordination und dem Erlernen sensorimotorischer Abläufe auch kognitive Vorgänge mit ein. Menschen mit cerebellaren Läsionen zeigen teilweise eine Beeinträchtigung der visuell-räumlichen Fähigkeiten, des verbalen Gedächtnisses, der Affektregulation und der sequenziellen Ordnung von Gedanken (Levisohn et al., 2000; Schmahmann, 2004; Konarski et al., 2005; Schutter and van Honk, 2005). Läsionen des Vermis wirken sich hierbei im Besonderen auf die Regulation des Affekts aus (Reizbarkeit, Impulsivität, Labilität) (Levisohn et al., 2000).

Präpuls-Inhibition und Rota-Rod Test

Die exemplarisch untersuchten hippocampalen und olfaktorischen Fehlprojektionen in dieser Arbeit, legen zusammen mit der Darstellung anderer Projektionsfehler in vorangegangenen Studien eine Bedeutung von CHL1 und NrCAM am Aufbau neuronaler Netzwerke nahe (More et al., 2001; Montag-Sallaz et al., 2002; Demyanenko et al., 2004; Falk et al., 2005; Williams et al., 2006). Eine veränderte Verarbeitung neuer und vertrauter Reize bei CHL1-defizienten Mäusen, verändertes Explorationsverhalten und die beeinträchtigte Filterung akustischer Reize dieser Mäuse unterstützt diese Vermutung (Montag-Sallaz et al., 2002; Montag-Sallaz et al., 2003; Irintchev et al., 2004). Mutationen der Gene CHL1 und NrCAM sind mit Erkrankungen wie Schizophrenie, Autismus und Zwangsstörungen assoziiert, die ebenfalls durch Störungen der Reizfilterung und subtile Abweichungen neuronaler Verschaltungen und der allgemeinen Hirnmorphologie gekennzeichnet sind (Courchesne et al., 1993; Van den Buuse et al., 2003; Rossi et al., 2005; Cannistraro et al., 2006; Chua et al., 2007; Perry et al., 2007). Morphologische Veränderungen des Cerebellums können dabei zu einer beeinträchtigten motorischen Koordinationsfähigkeit führen, wie sie bei CHL1-defizienten und NrCAM-defizienten Mäusen festgestellt wurden (More et al., 2001; Pratte et al., 2003). Um CHL1-defiziente, NrCAM-defiziente und CHL1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse bezüglich der Filterung akustischer Reize und der motorischen Koordinationsfähigkeit zu vergleichen, wurde das Verhalten dieser Mäuse bei der Präpuls-Inhibition und dem Rota-Rod Test untersucht.

Präpuls-Inhibition

Eine Präpuls-Inhibition (PPI) tritt auf, wenn ein relativ schwaches sensorisches Ereignis (Präpuls) 30-500 ms vor einem starken schreckinduzierenden Stimulus (Puls) geboten wird und dadurch das Ausmaß der reflexartigen Schreckreaktion (Kontraktion der Körpermuskulatur) reduziert. Die PPI ist ein robustes Phänomen, das alle Säugetiere aufweisen (Übersichtsartikel: Braff et al., 2001). Präpuls und Puls können in derselben oder in verschiedenen Modalitäten (akustisch, visuell, taktil) geboten werden. PPI wird als ein Maß für die Filterung von Reizen durch sensorimotorische Ausblendung (sensorimotor gating) betrachtet. Dieser Vorgang soll den Organismus vor Reizüberflutung schützen und helfen, die Aufmerksamkeit auf bedeutsame Ereignisse zu fokussieren. Die PPI wird durch neuronale Verschaltungen des Vorderhirns (limbisches System, frontaler Cortex, Basalganglien) und des Hinterhirns (Pons) reguliert und durch die Verschaltungen des Präpulses mediiert, die auf der Ebene der Pons mit den inhibitorischen regulatorischen Verschaltungen zusammenlaufen (Übersichtsartikel: Fendt et al., 2001; Swerdlow et al., 2001). Neuropsychiatrische Erkrankungen, bei denen die Ausblendung motorischer, sensorischer oder kognitiver Informationen gestört ist, äußern sich u.a. in einer reduzierten Präpuls-Inhibition (z.B. Schizophrenie, Autismus, Zwangsstörungen und Tourette-Syndrom, Temporallappen-Epilepsie, Alzheimer, Huntington-Krankheit) (Übersichtsartikel: Swerdlow et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die akustische Präpuls-Inhibition bei CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen untersucht. Die Ergebnisse lassen auf keine Störung der Filterung akustischer Reize bei diesen Mäusen schließen. Im Gegensatz dazu werden die Ergebnisse der Arbeit von Irintchev et al. (2004), bei der die Präpuls-Inhibition CHL1-defizienter Mäuse untersucht wurde, als eine extreme Störung der akustischen Reizfilterung dieser Mäuse interpretiert (Irintchev et al., 2004). Das experimentelle Design dieser Versuchsdurchführung ist jedoch anders als in der vorliegenden Arbeit. Die akustische Präpuls-Inhibition der Studie von Irintchev et al. (2004) wurde mit nur einem Präpuls bei 72 dB bei einem Hintergrundrauschen nicht näher definierter Lautstärke gemessen. Der genetische Hintergrund der Mäuse war nicht eindeutig (129Ola/C57BL/6J) und die Kontrollgruppe bestand aus nur 5 Wildtypmäusen. Einflüsse der Intensität des Präpulses, des Hintergrundrauschens und des genetischen Hintergrunds auf die Präpuls-Inhibition sind in der Literatur beschrieben (Aubert et al., 2006; Blumenthal et al., 2006; Franklin et al., 2007; Swerdlow et al., 2007). Ob diese Unterschiede diese stark abweichenden Ergebnisse erklären können, bleibt unklar.

Die Inhibition der akustischen Schreckreaktion durch einen akustischen Präpuls setzt die Funktionsweise des beanspruchten sensorimotorischen Systems und die generelle Funktionsweise der an der Inhibition des sensorischen Reizes beteiligten Verschaltungen voraus. Die Funktionalität sämtlicher Verschaltungen, die durch die verschiedenen Modalitäten von Präpuls und Schreckreiz beansprucht werden können und damit die Reizfilterung durch die Präpuls-Inhibition bestimmen, ist damit nicht geklärt.

Rota-Rod Test

Der Rota-Rod Test wurde eingesetzt, um über die Fähigkeit der Mäuse, sich auf einem beschleunigend drehenden Stab zu halten, die motorische Koordinationsfähigkeit zu messen. Mutante Mäuse mit Fehlentwicklungen des Cerebellums zeigen eine verminderte Leistungsfähigkeit in diesem Verhaltenstest (Übersichtsartikel: Crawley, 1999).

In dieser Arbeit wurde bei den CHL1-defizienten, NrCAM-defizienten und doppelmutanten Mäusen keine Beeinträchtigung der Motorkoordination festgestellt. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von Arbeiten, in denen eine verringerte Leistung CHL1-defizienter Mäuse (Pratte et al. (2003) und NrCAM-defizienter Mäuse (More et al. (2001) im Rota-Rod Test festgestellt wurde. Die Versuchsdurchführungen der Rota-Rod Tests beider Arbeiten unterscheiden sich vom Versuchsprotokoll dieser Arbeit. In der Arbeit von Pratte et al. (2003) wurde eine andere Rota-Rod Apparatur benutzt. Die Anzahl der Umdrehungen des Stabs war dagegen z. T. ähnlich mit einem Maximum von 40 r.p.m.. In der Arbeit von More et al. (2001) wurde eine nicht näher definierte Plastikapparatur eingesetzt. Die maximale Umdrehungszahl des Stabs betrug 6.5 r.p.m. und wurde bei einer nicht näher beschriebenen Anzahl von Versuchstieren eingesetzt. Bei diesem Test wurde außerdem nicht die Länge der Zeit, die die Mäuse sich auf dem Stab halten konnten, als Maß für ihre motorische Koordinationsfähigkeit gewertet, sondern die Anzahl des Herunterfallens innerhalb von 3 Minuten. Ob die im Vergleich zu dieser Arbeit deutlich verschiedenen Ergebnisse durch die unterschiedlichen Versuchsdurchführungen erklärt werden können, ist bei diesem Verhaltenstest ebenfalls nicht geklärt.

Die Untersuchung der Mäuse mit Rota-Rod Test misst die Leistung in einer komplexen sensorimotorischen Koordinationsaufgabe, die zumindest eine partielle Funktionsfähigkeit des Cerebellums voraussetzt. Speziellere Funktionen des Cerebellums, wie die Kontrolle der Augenbewegungen oder der Einfluss auf kognitive und emotionale Vorgänge, stehen dabei

nicht im Vordergrund. Daher können Fehlfunktionen der motorischen Koordinationsfähigkeit und des Cerebellums bestehen, die von diesem Test nicht erfasst werden.

Schlussfolgerung und Ausblick

Neurale Zellerkennungsmoleküle regulieren ein weites Spektrum zellulärer Interaktionen während der Entwicklung und im ausgereiften Nervensystem. Spezifische Funktionen dieser Moleküle werden durch ihre Bindung an extra- und intrazelluläre Liganden vermittelt. Um die durch CHL1 vermittelte Signaltransduktion zu untersuchen, ist in dieser Arbeit ein Interaktionspartner von CHL1, CHL1-23, weiter charakterisiert worden. Bezüglich der vollständigen Sequenz der mRNA und der Interaktion in einem von der Hefe unabhängigen System sind jedoch noch viele Fragen offen. Die Schwierigkeiten bei der Klonierung dieses Gens sind vermutlich auf die Ausbildung schwer aufzulösender Sekundärstrukturen im 5' Bereich der cDNA zurückzuführen. In keinem der über 25 EST-Klone mit teilweise übereinstimmenden Sequenzen zu CHL1-23 ist der 5' Bereich vollständig, der zudem einen sehr hohen GC-Gehalt aufweist. Da deshalb ein Screen weiterer cDNA Banken nicht sehr erfolgversprechend ist, könnte die massenspektrometrische Analyse oder die N-terminale Ansequenzierung einer mit CHL1-23 angereicherten Proteinfraction helfen, diese Sequenz zu vervollständigen. CHL1-23 ist wahrscheinlich nicht der einzige bisher noch unbekanntes intrazelluläre Bindungspartner von CHL1. Daher wäre auch ein neuer Hefe-Zwei-Hybrid Screen sinnvoll, um über weitere Interaktionspartner die Ligandenbindungen von CHL1 zu untersuchen.

Die Untersuchung der einzel- und doppeldefizienten Mäuse dieser Arbeit konnte eine spezifische Funktion von CHL1 und NrCAM bei der axonalen Wegfindung und der Größenausbildung anatomischer Strukturen mit teilweise entgegengesetzten Auswirkungen dieser Moleküle zeigen. Bei den CHL1/NrCAM-doppeldefizienten Mäusen wurde in keiner der untersuchten Hirnregionen eine Verstärkung des Phänotyps gefunden. Im Gegensatz dazu zeigen L1/NrCAM-doppeldefiziente Mäuse eine Verstärkung des cerebellaren Phänotyps im Vergleich zu den einzeldefizienten Mäusen (Sakurai et al., 2001). Die funktionelle Bedeutung von L1 und NrCAM im Cerebellum ist demzufolge ähnlicher als die von CHL1 und NrCAM. Um das Funktionsspektrum der L1-Familie besser zu verstehen, wäre es interessant, verschiedene Kombinationen defizienter Mäuse der L1-Familie zu untersuchen. Da eine Bindung an Ankyrine für alle L1-Familienmitglieder nachgewiesen worden ist, könnte die

Untersuchung Ankyrin-defizienter Mäuse in den ausgewählten Hirnregionen zur Aufklärung der intrazellulären Signalwege der L1-Familienmitglieder beitragen (Davis and Bennett, 1994; Buhusi et al., 2003).

Störungen der Informationsverarbeitung zeigen sich bei CHL1-defizienten Mäusen in der Immediate-Early-Gen-Expression bei der Verarbeitung neuer und vertrauter gustatorischer Stimuli und stehen möglicherweise im Zusammenhang mit den axonalen Fehlprojektionen dieser Mäuse (Montag-Sallaz et al., 2003). Da auch NrCAM-defiziente Mäuse axonale Fehlprojektionen in verschiedenen Hirnregionen aufweisen, wäre eine entsprechende Untersuchung dieser Mäuse für die Aufklärung ihrer Informationsverarbeitung interessant (More et al., 2001; Falk et al., 2005; Williams et al., 2006). Zusätzlich könnte die Untersuchung NrCAM-defizienter Mäuse in Verhaltensparadigmen wie dem Offenfeld, dem erhobenen Plus-Labyrinth und der Water-Maze, in denen CHL1-defiziente Mäuse Abweichungen in Zusammenhang mit einem veränderten Explorationsverhalten zeigen, weitere Hinweise auf die Funktion von NrCAM liefern.

5. Literatur

- Amaral DG, Witter MP (1998) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571-591.**
- Anderson P, Bliss TV, Skrede KK (1971) Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13:222-238.**
- Angata K, Long JM, Bukalo O, Lee W, Dityatev A, Wynshaw-Boris A, Schachner M, Fukuda M, Marth JD (2004) Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J Biol Chem* 279:32603-32613.**
- Angeloni D, Wei MH, Lerman MI (1999a) Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CALL gene for association studies with IQ. *Psychiatr Genet* 9:165-167.**
- Angeloni D, Lindor NM, Pack S, Latif F, Wei MH, Lerman MI (1999b) CALL gene is haploinsufficient in a 3p- syndrome patient. *Am J Med Genet* 86:482-485.**
- Angenstein F, Niessen HG, Goldschmidt J, Vielhaber S, Ludolph AC, Scheich H (2004) Age-dependent changes in MRI of motor brain stem nuclei in a mouse model of ALS. *Neuroreport* 15:2271-2274.**
- Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 119:257-272.**
- Aubert L, Reiss D, Ouagazzal AM (2006) Auditory and visual prepulse inhibition in mice: parametric analysis and strain comparisons. *Genes Brain Behav* 5:423-431.**
- Backer S, Sakurai T, Grumet M, Sotelo C, Bloch-Gallego E (2002) Nr-CAM and TAG-1 are expressed in distinct populations of developing precerebellar and cerebellar neurons. *Neuroscience* 113:743-748.**
- Baker H, Cummings DM, Munger SD, Margolis JW, Franzen L, Reed RR, Margolis FL (1999) Targeted deletion of a cyclic nucleotide-gated channel subunit (OCNC1): biochemical and morphological consequences in adult mice. *J Neurosci* 19:9313-9321.**
- Baniz B, Pike MM, Millican CL, Ferguson WB, Komlosi P, Sheetz J, Bell PD, Schwiebert EM, Yoder BK (2005) Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132:5329-5339.**
- Barthels D, Vopper G, Boned A, Cremer H, Wille W (1992) High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle. *Eur J Neurosci* 4:327-337.**

- Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P (1999) Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* 112 (Pt 16):2667-2675.
- Bieber AJ, Snow PM, Hortsch M, Patel NH, Jacobs JR, Traquina ZR, Schilling J, Goodman CS (1989) *Drosophila neuroglian*: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* 59:447-460.
- Blumenthal TD, Noto JV, Fox MA, Franklin JC (2006) Background noise decreases both prepulse elicitation and inhibition of acoustic startle blink responding. *Biol Psychol* 72:173-179.
- Bonora E, Lamb JA, Barnby G, Sykes N, Moberly T, Beyer KS, Klauck SM, Poustka F, Bacchelli E, Blasi F, Maestrini E, Battaglia A, Haracopos D, Pedersen L, Isager T, Eriksen G, Viskum B, Sorensen EU, Brondum-Nielsen K, Cotterill R, Engeland H, Jonge M, Kemner C, Steggehuis K, Scherpenisse M, Rutter M, Bolton PF, Parr JR, Poustka A, Bailey AJ, Monaco AP (2005) Mutation screening and association analysis of six candidate genes for autism on chromosome 7q. *Eur J Hum Genet* 13:198-207.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR (2001) Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)* 156:234-258.
- Brummendorf T, Rathjen FG (1993) Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* 61:1207-1219.
- Bruses JL, Rutishauser U (2001) Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie* 83:635-643.
- Buhusi M, Midkiff BR, Gates AM, Richter M, Schachner M, Maness PF (2003) Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem* 278:25024-25031.
- Cannistraro PA, Makris N, Howard JD, Wedig MM, Hodge SM, Wilhelm S, Kennedy DN, Rauch SL (2006) A diffusion tensor imaging study of white matter in obsessive-compulsive disorder. *Depress Anxiety*.
- Carmichael OT, Kuller LH, Lopez OL, Thompson PM, Dutton RA, Lu A, Lee SE, Lee JY, Aizenstein HJ, Meltzer CC, Liu Y, Toga AW, Becker JT (2007) Cerebral ventricular changes associated with transitions between normal cognitive function, mild cognitive impairment, and dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 21:14-24.

- Castellani V, De Angelis E, Kenwrick S, Rougon G (2002) Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *Embo J* 21:6348-6357.
- Castellani V, Chedotal A, Schachner M, Faivre-Sarrailh C, Rougon G (2000) Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.
- Catz N, Thier P (2007) Neural control of saccadic eye movements. *Dev Ophthalmol* 40:52-75.
- Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ, Lowenstein DH, Skarnes WC, Chedotal A, Tessier-Lavigne M (2000) Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 25:43-56.
- Chen L, Ong B, Bennett V (2001) LAD-1, the *Caenorhabditis elegans* L1CAM homologue, participates in embryonic and gonadal morphogenesis and is a substrate for fibroblast growth factor receptor pathway-dependent phosphotyrosine-based signaling. *J Cell Biol* 154:841-855.
- Chen QY, Chen Q, Feng GY, Lindpaintner K, Chen Y, Sun X, Chen Z, Gao Z, Tang J, He L (2005) Case-control association study of the close homologue of L1 (CHL1) gene and schizophrenia in the Chinese population. *Schizophr Res* 73:269-274.
- Cheng L, Itoh K, Lemmon V (2005) L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J Neurosci* 25:395-403.
- Chua SE, Cheung C, Cheung V, Tsang JT, Chen EY, Wong JC, Cheung JP, Yip L, Tai KS, Suckling J, McAlonan GM (2007) Cerebral grey, white matter and csf in never-medicated, first-episode schizophrenia. *Schizophr Res* 89:12-21.
- Cloutier JF, Giger RJ, Koentges G, Dulac C, Kolodkin AL, Ginty DD (2002) Neuropilin-2 mediates axonal fasciculation, zonal segregation, but not axonal convergence, of primary accessory olfactory neurons. *Neuron* 33:877-892.
- Cloutier JF, Sahay A, Chang EC, Tessier-Lavigne M, Dulac C, Kolodkin AL, Ginty DD (2004) Differential requirements for semaphorin 3F and Slit-1 in axonal targeting, fasciculation, and segregation of olfactory sensory neuron projections. *J Neurosci* 24:9087-9096.
- Cohen NR, Taylor JS, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJ (1998) Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 8:26-33.

- Collinson JM, Marshall D, Gillespie CS, Brophy PJ (1998) Transient expression of neurofascin by oligodendrocytes at the onset of myelinogenesis: implications for mechanisms of axon-glia interaction. *Glia* 23:11-23.**
- Coskun V, Luskin MB (2002) Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream. *J Neurosci Res* 69:795-802.**
- Conacci-Sorrell M, Kaplan A, Raveh S, Gavert N, Sakurai T, Ben-Ze'ev A (2005) The shed ectodomain of Nr-CAM stimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation. *Cancer Res* 65:11605-11612.**
- Courchesne E, Press GA, Yeung-Courchesne R (1993) Parietal lobe abnormalities detected with MR in patients with infantile autism. *AJR Am J Roentgenol* 160:387-393.**
- Coutelle O, Nyakatura G, Taudien S, Elgar G, Brenner S, Platzer M, Drescher B, Jouet M, Kenwrick S, Rosenthal A (1998) The neural cell adhesion molecule L1: genomic organisation and differential splicing is conserved between man and the pufferfish *Fugu*. *Gene* 208:7-15.**
- Crawley JN (1999) Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 835:18-26.**
- Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A (1997) NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 8:323-335.**
- Crews L, Wyss-Coray T, Masliah E (2004) Insights into the pathogenesis of hydrocephalus from transgenic and experimental animal models. *Brain Pathol* 14:312-316.**
- Custer AW, Kazarinova-Noyes K, Sakurai T, Xu X, Simon W, Grumet M, Shrager P (2003) The role of the ankyrin-binding protein NrCAM in node of Ranvier formation. *J Neurosci* 23:10032-10039.**
- Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N (1997) Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet* 17:346-349.**
- Davis JQ, Bennett V (1994) Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 269:27163-27166.**
- Davis JQ, Lambert S, Bennett V (1996) Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135:1355-1367.**

- De Angelis E, Brummendorf T, Cheng L, Lemmon V, Kenwrick S (2001) Alternative use of a mini exon of the L1 gene affects L1 binding to neural ligands. *J Biol Chem* 276:32738-32742.
- Demyanenko GP, Maness PF (2003) The L1 cell adhesion molecule is essential for topographic mapping of retinal axons. *J Neurosci* 23:530-538.
- Demyanenko GP, Tsai AY, Maness PF (1999) Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci* 19:4907-4920.
- Demyanenko GP, Schachner M, Anton E, Schmid R, Feng G, Sanes J, Maness PF (2004) Close homolog of L1 modulates area-specific neuronal positioning and dendrite orientation in the cerebral cortex. *Neuron* 44:423-437.
- Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SR (2002) Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol* 157:1105-1112.
- Dirks P, Thomas U, Montag D (2006) The cytoplasmic domain of NrCAM binds to PDZ domains of synapse-associated proteins SAP90/PSD95 and SAP97. *Eur J Neurosci* 24:25-31.
- Dry K, Kenwrick S, Rosenthal A, Platzer M (2001) The complete sequence of the human locus for NgCAM-related cell adhesion molecule reveals a novel alternative exon in chick and man and conserved genomic organization for the L1 subfamily. *Gene* 273:115-122.
- Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A (2000) Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:5234-5244.
- Faivre-Sarrailh C, Falk J, Pollerberg E, Schachner M, Rougon G (1999) NrCAM, cerebellar granule cell receptor for the neuronal adhesion molecule F3, displays an actin-dependent mobility in growth cones. *J Cell Sci* 112 Pt 18:3015-3027.
- Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, Bozon M, Rougon G, Grumet M, Puschel AW, Sanes JR, Castellani V (2005) Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48:63-75.
- Fendt M, Li L, Yeomans JS (2001) Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl)* 156:216-224.
- Forster E, Zhao S, Frotscher M (2006) Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* 7:259-267.

- Franklin JC, Moretti NA, Blumenthal TD (2007) Impact of stimulus signal-to-noise ratio on prepulse inhibition of acoustic startle. *Psychophysiology* 44:339-342.
- Franklin JC, Moretti NA, Blumenthal TD (2007) Impact of stimulus signal-to-noise ratio on prepulse inhibition of acoustic startle. *Psychophysiology* 44:339-342.
- Fransen E, D'Hooge R, Van Camp G, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SK, De Zeeuw CI, De Deyn PP, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy RF, Willems PJ (1998) L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7:999-1009.
- Frints SG, Marynen P, Hartmann D, Fryns JP, Steyaert J, Schachner M, Rolf B, Craessaerts K, Snellinx A, Hollanders K, D'Hooge R, De Deyn PP, Froyen G (2003) CALL interrupted in a patient with non-specific mental retardation: gene dosage-dependent alteration of murine brain development and behavior. *Hum Mol Genet* 12:1463-1474.
- Frotscher M, Jonas P, Sloviter RS (2006) Synapses formed by normal and abnormal hippocampal mossy fibers. *Cell Tissue Res* 326:361-367.
- Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V (1997) Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol* 137:703-714.
- Gennarini G, Hirn M, Deagostini-Bazin H, Goridis C (1984a) Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. The use of liposome-inserted radioiodinated N-CAM to study its transbilayer orientation. *Eur J Biochem* 142:65-73.
- Gennarini G, Rougon G, Deagostini-Bazin H, Hirn M, Goridis C (1984b) Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. A monoclonal antibody recognizing a cytoplasmic domain and evidence for the presence of phosphoserine residues. *Eur J Biochem* 142:57-64.
- Giger RJ, Cloutier JF, Sahay A, Prinjha RK, Levensgood DV, Moore SE, Pickering S, Simmons D, Rastan S, Walsh FS, Kolodkin AL, Ginty DD, Geppert M (2000) Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron* 25:29-41.
- Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA, Felsenfeld DP (2003) Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol* 162:719-730.
- Grodd W, Hulsmann E, Lotze M, Wildgruber D, Erb M (2001) Sensorimotor mapping of the human cerebellum: fMRI evidence of somatotopic organization. *Hum Brain Mapp* 13:55-73.

- Grumet M, Mauro V, Burgoon MP, Edelman GM, Cunningham BA (1991) Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. J Cell Biol 113:1399-1412.**
- Hassel B, Rathjen FG, Volkmer H (1997) Organization of the neurofascin gene and analysis of developmentally regulated alternative splicing. J Biol Chem 272:28742-28749.**
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. Annu Rev Neurosci 22:511-539.**
- Hillenbrand R, Molthagen M, Montag D, Schachner M (1999) The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. Eur J Neurosci 11:813-826.**
- Hinkle CL, Diestel S, Lieberman J, Maness PF (2006) Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). J Neurobiol 66:1378-1395.**
- Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Bartsch U, Moos M, Lubbert H, Montag D, Schachner M (1996) Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recognition molecules. Eur J Neurosci 8:1613-1629.**
- Hortsch M (1996) The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. Neuron 17:587-593.**
- Hortsch M (2000) Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? Mol Cell Neurosci 15:1-10.**
- Howell OW, Palser A, Polito A, Melrose S, Zonta B, Scheiermann C, Vora AJ, Brophy PJ, Reynolds R (2006) Disruption of neurofascin localization reveals early changes preceding demyelination and remyelination in multiple sclerosis. Brain 129:3173-3185.**
- Irintchev A, Koch M, Needham LK, Maness P, Schachner M (2004) Impairment of sensorimotor gating in mice deficient in the cell adhesion molecule L1 or its close homologue, CHL1. Brain Res 1029:131-134.**
- Jacob J, Haspel J, Kane-Goldsmith N, Grumet M (2002) L1 mediated homophilic binding and neurite outgrowth are modulated by alternative splicing of exon 2. J Neurobiol 51:177-189.**
- Jenkins SM, Bennett V (2001) Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. J Cell Biol 155:739-746.**

- Jimenez CR, Eyman M, Scotto Lavina T, Gioio A, Li KW, van der Schors RC, Geraerts WP, Giuditta A, Kaplan BB, van Minnen J (2002) J Neurochem 81: 735-744.**
- Kamiguchi H, Lemmon V (1998) A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. J Neurosci 18:3749-3756.**
- Kamiguchi H, Lemmon V (2000) IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. Curr Opin Cell Biol 12:598-605.**
- Kenwrick S, Watkins A, De Angelis E (2000) Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. Hum Mol Genet 9:879-886.**
- Kim H, Greer CA (2000) The emergence of compartmental organization in olfactory bulb glomeruli during postnatal development. J Comp Neurol 422:297-311.**
- Kizhatil K, Wu YX, Sen A, Bennett V (2002) A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin. J Neurosci 22:7948-7958.**
- Knoll B, Kretz O, Fiedler C, Alberti S, Schutz G, Frotscher M, Nordheim A (2006) Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. Nat Neurosci 9:195-204.**
- Konarski JZ, McIntyre RS, Grupp LA, Kennedy SH (2005) Is the cerebellum relevant in the circuitry of neuropsychiatric disorders? J Psychiatry Neurosci 30:178-186.**
- Kondo A, Saito Y, Floricel F, Maegaki Y, Ohno K (2007) Congenital ocular motor apraxia: Clinical and neuroradiological findings, and long-term intellectual prognosis. Brain Dev.**
- Kovelman JA, Scheibel AB (1986) Biological substrates of schizophrenia. Acta Neurol Scand 73:1-32.**
- Kurumaji A, Nomoto H, Okano T, Toru M (2001) An association study between polymorphism of L1CAM gene and schizophrenia in a Japanese sample. Am J Med Genet 105:99-104.**
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.**
- Lagercrantz H, Ringstedt T (2001) Organization of the neuronal circuits in the central nervous system during development. Acta Paediatr 90:707-715.**

- Lahrtz F, Horstkorte R, Cremer H, Schachner M, Montag D (1997) VASE-encoded peptide modifies NCAM- and L1-mediated neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 50:62-68.
- Laplagne DA, Esposito MS, Piatti VC, Morgenstern NA, Zhao C, van Praag H, Gage FH, Schinder AF (2006) Functional convergence of neurons generated in the developing and adult hippocampus. *PLoS Biol* 4:e409.
- Law JW, Lee AY, Sun M, Nikonenko AG, Chung SK, Dityatev A, Schachner M, Morellini F (2003) Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci* 23:10419-10432.
- Leshchyns'ka I, Sytnyk V, Richter M, Andreyeva A, Puchkov D, Schachner M (2006) The adhesion molecule CHL1 regulates uncoating of clathrin-coated synaptic vesicles. *Neuron* 52:1011-1025.
- Levisohn L, Cronin-Golomb A, Schmahmann JD (2000) Neuropsychological consequences of cerebellar tumour resection in children: cerebellar cognitive affective syndrome in a paediatric population. *Brain* 123 (Pt 5):1041-1050.
- Liu XB, Low LK, Jones EG, Cheng HJ (2005) Stereotyped axon pruning via plexin signaling is associated with synaptic complex elimination in the hippocampus. *J Neurosci* 25:9124-9134.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Loers G, Schachner M (2007) Recognition molecules and neural repair. *J Neurochem*.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- Luskin MB (1998) Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate. *J Neurobiol* 36:221-233.
- Lustig M, Erskine L, Mason CA, Grumet M, Sakurai T (2001a) Nr-CAM expression in the developing mouse nervous system: ventral midline structures, specific fiber tracts, and neuropilar regions. *J Comp Neurol* 434:13-28.
- Lustig M, Zanazzi G, Sakurai T, Blanco C, Levinson SR, Lambert S, Grumet M, Salzer JL (2001b) Nr-CAM and neurofascin interactions regulate ankyrin G and sodium channel clustering at the node of Ranvier. *Curr Biol* 11:1864-1869.
- Maier O, van der Heide T, van Dam AM, Baron W, de Vries H, Hoekstra D (2005) Alteration of the extracellular matrix interferes with raft association of neurofascin in oligodendrocytes. Potential significance for multiple sclerosis? *Mol Cell Neurosci* 28:390-401.

- Maness PF, Schachner M (2007) Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10:19-26.**
- Manni E, Petrosini L (2004) A century of cerebellar somatotopy: a debated representation. *Nat Rev Neurosci* 5:241-249.**
- Mares V, Lodin Z, Srajer J (1970) The cellular kinetics of the developing mouse cerebellum. I. The generation cycle, growth fraction and rate of proliferation of the external granular layer. *Brain Res* 23:323-342.**
- Mauro VP, Krushel LA, Cunningham BA, Edelman GM (1992) Homophilic and heterophilic binding activities of Nr-CAM, a nervous system cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 119:191-202.**
- Miura M, Asou H, Kobayashi M, Uyemura K (1992) Functional expression of a full-length cDNA coding for rat neural cell adhesion molecule L1 mediates homophilic intercellular adhesion and migration of cerebellar neurons. *J Biol Chem* 267:10752-10758.**
- Mombaerts P (2001) How smell develops. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1192-1198.**
- Mombaerts P (2004) Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5:263-278.**
- Mombaerts P (2006) Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:713-737.**
- Montag-Sallaz M, Schachner M, Montag D (2002) Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation, and altered behavior in mice deficient for the close homolog of L1. *Mol Cell Biol* 22:7967-7981.**
- Montag-Sallaz M, Baarke A, Montag D (2003) Aberrant neuronal connectivity in CHL1-deficient mice is associated with altered information processing-related immediate early gene expression. *J Neurobiol* 57:67-80.**
- More MI, Kirsch FP, Rathjen FG (2001) Targeted ablation of NrCAM or ankyrin-B results in disorganized lens fibers leading to cataract formation. *J Cell Biol* 154:187-196.**
- Morellini F, Lepsveridze E, Kahler B, Dityatev A, Schachner M (2007) Reduced reactivity to novelty, impaired social behavior, and enhanced basal synaptic excitatory activity in perforant path projections to the dentate gyrus in young adult mice deficient in the neural cell adhesion molecule CHL1. *Mol Cell Neurosci* 34:121-136.**
- Mori K, Nagao H, Yoshihara Y (1999) The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* 286:711-715.**

- Moscoso LM, Sanes JR (1995) Expression of four immunoglobulin superfamily adhesion molecules (L1, Nr-CAM/Bravo, neurofascin/ABGP, and N-CAM) in the developing mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 352:321-334.
- Nagao H, Yoshihara Y, Mitsui S, Fujisawa H, Mori K (2000) Two mirror-image sensory maps with domain organization in the mouse main olfactory bulb. *Neuroreport* 11:3023-3027.
- Naus S, Richter M, Wildeboer D, Moss M, Schachner M, Bartsch JW (2004) Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J Biol Chem* 279:16083-16090.
- Needham LK, Thelen K, Maness PF (2001) Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J Neurosci* 21:1490-1500.
- Nikonenko AG, Sun M, Lepsveridze E, Apostolova I, Petrova I, Irintchev A, Dityatev A, Schachner M (2006) Enhanced perisomatic inhibition and impaired long-term potentiation in the CA1 region of juvenile CHL1-deficient mice. *Eur J Neurosci* 23:1839-1852.
- Nitschke MF, Arp T, Stavrou G, Erdmann C, Heide W (2005) The cerebellum in the cerebro-cerebellar network for the control of eye and hand movements--an fMRI study. *Prog Brain Res* 148:151-164.
- Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1994) N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13:595-609.
- Parisi MA, Doherty D, Chance PF, Glass IA (2007) Joubert syndrome (and related disorders) (OMIM 213300). *Eur J Hum Genet* 15:511-521.
- Paxinos G, Franklin KB (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Second Edition. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo: Academic Press.
- Perry W, Minassian A, Lopez B, Maron L, Lincoln A (2007) Sensorimotor gating deficits in adults with autism. *Biol Psychiatry* 61:482-486.
- Petek E, Windpassinger C, Vincent JB, Cheung J, Boright AP, Scherer SW, Kroisel PM, Wagner K (2001) Disruption of a novel gene (IMMP2L) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome. *Am J Hum Genet* 68:848-858.
- Pillai-Nair N, Panicker AK, Rodriguiz RM, Gilmore KL, Demyanenko GP, Huang JZ, Wetsel WC, Maness PF (2005) Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. *J Neurosci* 25:4659-4671.

- Popov N, Schmitt M, Schulzeck S, Matthies H (1975) [Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates]. *Acta Biol Med Ger* 34:1441-1446.
- Pratte M, Rougon G, Schachner M, Jamon M (2003) Mice deficient for the close homologue of the neural adhesion cell L1 (CHL1) display alterations in emotional reactivity and motor coordination. *Behav Brain Res* 147:31-39.
- Rabinowitz JE, Rutishauser U, Magnuson T (1996) Targeted mutation of Ncam to produce a secreted molecule results in a dominant embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6421-6424.
- Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *Embo J* 3:1-10.
- Rathjen FG, Wolff JM, Chang S, Bonhoeffer F, Raper JA (1987) Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* 51:841-849.
- Rolf B, Kutsche M, Bartsch U (2001) Severe hydrocephalus in L1-deficient mice. *Brain Res* 891:247-252.
- Ronn LC, Berezin V, Bock E (2000) The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci* 18:193-199.
- Rossi S, Bartalini S, Ulivelli M, Mantovani A, Di Muro A, Goracci A, Castrogiovanni P, Battistini N, Passero S (2005) Hypofunctioning of sensory gating mechanisms in patients with obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 57:16-20.
- Royal SJ, Key B (1999) Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J Neurosci* 19:9856-9864.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386.
- Sahay A, Molliver ME, Ginty DD, Kolodkin AL (2003) Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J Neurosci* 23:6671-6680.
- Sakurai K, Migita O, Toru M, Arinami T (2002) An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:412-415.
- Sakurai T, Ramoz N, Reichert JG, Corwin TE, Kryzak L, Smith CJ, Silverman JM, Hollander E, Buxbaum JD (2006) Association analysis of the NrCAM gene in autism and in subsets of families with severe obsessive-compulsive or self-stimulatory behaviors. *Psychiatr Genet* 16:251-257.

- Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley AJ, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M (2001) Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol* 154:1259-1273.
- Sandi C, Woodson JC, Haynes VF, Park CR, Touyarot K, Lopez-Fernandez MA, Venero C, Diamond DM (2005) Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 57:856-864.
- Schmahmann JD (2004) Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 16:367-378.
- Schmid RS, Pruitt WM, Maness PF (2000) A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J Neurosci* 20:4177-4188.
- Schmidt JT, Schachner M (1998) Role for cell adhesion and glycosyl (HNK-1 and oligomannoside) recognition in the sharpening of the regenerating retinotectal projection in goldfish. *J Neurobiol* 37:659-671.
- Schutter DJ, van Honk J (2005) The cerebellum on the rise in human emotion. *Cerebellum* 4:290-294.
- Schweitzer I, Tuckwell V, Ames D, O'Brien J (2001) Structural neuroimaging studies in late-life depression: a review. *World J Biol Psychiatry* 2:83-88.
- Seki T, Arai Y (1993) Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res* 17:265-290.
- Seki T, Rutishauser U (1998) Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus. *J Neurosci* 18:3757-3766.
- Senn C, Kutsche M, Saghatelian A, Bosl MR, Lohler J, Bartsch U, Morellini F, Schachner M (2002) Mice deficient for the HNK-1 sulfotransferase show alterations in synaptic efficacy and spatial learning and memory. *Mol Cell Neurosci* 20:712-729.
- Shambes GM, Gibson JM, Welker W (1978) Fractured somatotopy in granule cell tactile areas of rat cerebellar hemispheres revealed by micromapping. *Brain Behav Evol* 15:94-140.
- Sherman DL, Tait S, Melrose S, Johnson R, Zonta B, Court FA, Macklin WB, Meek S, Smith AJ, Cottrell DF, Brophy PJ (2005) Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron* 48:737-742.

- Sloviter RS (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. J Comp Neurol 280:183-196.**
- Small SJ, Akeson R (1990) Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development. J Cell Biol 111:2089-2096.**
- Small SJ, Haines SL, Akeson RA (1988) Polypeptide variation in an N-CAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally regulated through alternative splicing. Neuron 1:1007-1017.**
- Smith TD, Adams MM, Gallagher M, Morrison JH, Rapp PR (2000) Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. J Neurosci 20:6587-6593.**
- St John JA, Key B (2005) Olfactory marker protein modulates primary olfactory axon overshooting in the olfactory bulb. J Comp Neurol 488:61-69.**
- Strekalova T, Wotjak CT, Schachner M (2001) Intrahippocampal administration of an antibody against the HNK-1 carbohydrate impairs memory consolidation in an inhibitory learning task in mice. Mol Cell Neurosci 17:1102-1113.**
- Strotmann J, Breer H (2006) Formation of glomerular maps in the olfactory system. Semin Cell Dev Biol 17:402-410.**
- Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL (2001) Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. Psychopharmacology (Berl) 156:194-215.**
- Swerdlow NR, Blumenthal TD, Sutherland AN, Weber E, Talledo JA (2007) Effects of prepulse intensity, duration, and bandwidth on perceived intensity of startling acoustic stimuli. Biol Psychol 74:389-395.**
- Tait S, Gunn-Moore F, Collinson JM, Huang J, Lubetzki C, Pedraza L, Sherman DL, Colman DR, Brophy PJ (2000) An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glia junction. J Cell Biol 150:657-666.**
- Takeda Y, Asou H, Murakami Y, Miura M, Kobayashi M, Uyemura K (1996) A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. J Neurochem 66:2338-2349.**
- Tenne-Brown J, Key B (1999) Errors in lamina growth of primary olfactory axons in the rat and mouse olfactory bulb. J Comp Neurol 410:20-30.**
- Theodosis DT, Rougon G, Poulain DA (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion**

- molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5494-5498.
- Thier P, Ilg UJ (2005) The neural basis of smooth-pursuit eye movements. *Curr Opin Neurobiol* 15:645-652.
- Thoma RJ, Hanlon FM, Huang M, Miller GA, Moses SN, Weisend MP, Jones A, Paulson KM, Irwin J, Canive JM (2007) Impaired secondary somatosensory gating in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.*
- Tongiorgi E, Bernhardt RR, Schachner M (1995) Zebrafish neurons express two L1-related molecules during early axonogenesis. *J Neurosci Res* 42:547-561.
- Tregellas JR, Davalos DB, Rojas DC, Waldo MC, Gibson L, Wylie K, Du YP, Freedman R (2007) Increased hemodynamic response in the hippocampus, thalamus and prefrontal cortex during abnormal sensory gating in schizophrenia. *Schizophr Res.*
- Tuvia S, Garver TD, Bennett V (1997) The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12957-12962.
- Van den Buuse M, Garner B, Koch M (2003) Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Curr Mol Med* 3:459-471.
- Van der Borght K, Wallinga AE, Luiten PG, Eggen BJ, Van der Zee EA (2005) Morris water maze learning in two rat strains increases the expression of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the dentate gyrus but has no effect on hippocampal neurogenesis. *Behav Neurosci* 119:926-932.
- Villa A, Podini P, Panzeri MC, Racchetti G, Meldolesi J (1994) Cytosolic Ca²⁺ binding proteins during rat brain ageing: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum. *Eur J Neurosci* 6:1491-1499.
- Volkmer H, Leuschner R, Zacharias U, Rathjen FG (1996) Neurofascin induces neurites by heterophilic interactions with axonal NrCAM while NrCAM requires F11 on the axonal surface to extend neurites. *J Cell Biol* 135:1059-1069.
- Waites CL, Craig AM, Garner CC (2005) Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28:251-274.
- Walz A, Rodriguez I, Mombaerts P (2002) Aberrant sensory innervation of the olfactory bulb in neuropilin-2 mutant mice. *J Neurosci* 22:4025-4035.
- Walz A, Mombaerts P, Greer CA, Treloar HB (2006) Disrupted compartmental organization of axons and dendrites within olfactory glomeruli of mice deficient in the olfactory cell adhesion molecule, OCAM. *Mol Cell Neurosci* 32:1-14.

- Weinhold B, Seidenfaden R, Rockle I, Muhlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H (2005) Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 280:42971-42977.
- Whittard JD, Sakurai T, Cassella MR, Gazdoui M, Felsenfeld DP (2006) MAP kinase pathway-dependent phosphorylation of the L1-CAM ankyrin binding site regulates neuronal growth. *Mol Biol Cell* 17:2696-2706.
- Williams SE, Grumet M, Colman DR, Henkemeyer M, Mason CA, Sakurai T (2006) A role for Nr-CAM in the patterning of binocular visual pathways. *Neuron* 50:535-547.
- Wilson HV (1907) On some of coalescence and regeneration in sponges. *Journal of Experimental Zoology* 5:245-256.
- Yacubova E, Komuro H (2002) Stage-specific control of neuronal migration by somatostatin. *Nature* 415:77-81.
- Yamamoto S, Oka S, Inoue M, Shimuta M, Manabe T, Takahashi H, Miyamoto M, Asano M, Sakagami J, Sudo K, Iwakura Y, Ono K, Kawasaki T (2002) Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J Biol Chem* 277:27227-27231.
- Yoshihara Y, Kawasaki M, Tamada A, Fujita H, Hayashi H, Kagamiyama H, Mori K (1997) OCAM: A new member of the neural cell adhesion molecule family related to zone-to-zone projection of olfactory and vomeronasal axons. *J Neurosci* 17:5830-5842.
- Zhao G, Hortsch M (1998) The analysis of genomic structures in the L1 family of cell adhesion molecules provides no evidence for exon shuffling events after the separation of arthropod and chordate lineages. *Gene* 215:47-55.
- Zheng C, Feinstein P, Bozza T, Rodriguez I, Mombaerts P (2000) Peripheral olfactory projections are differentially affected in mice deficient in a cyclic nucleotide-gated channel subunit. *Neuron* 26:81-91.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CA1-CA3	Regionen des Ammonshorns, Hippocampus
CHL1	Close homologue of L1
CRASH	corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia and hydrocephalus
DAB	Diaminobenzidin
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin
DAPI	4', 6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride
dB	Dezibel
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DG	Gyrus Dentatus
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPL	äußere plexiforme Schicht
FN-III Repeat	Fibronectin-Domäne des Typs III
GFP	green fluorescent protein
GL	Körnerzellschicht; glomeruläre Schicht
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HNK-1	human natural killer-1
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IgCAM	Zellerkennungsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie
IGL	innere Körnerzellschicht
IHC	Immunhistochemie
ISH	in situ Hybridisierung
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MBM	modifiziertes Blockierungs-Medium
MCL	Mitralzellschicht
mg	Milligramm
min	Minute
ML	Molekularschicht
Mol	<i>Stratum lacunosum-moleculare</i>
NF	Neurofascin
OB	olfactorischer Bulbus
Or	<i>Stratum oriens</i>
PAT	Prolin, Alanin und Threonin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCL	Purkinjenzellschicht
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ	PSD 95/SAP90, Dlg und ZO-1
PSA	Polysialinsäure
PVP	Polyvinylpyrrolidone
Py	Pyramidalzellschicht
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rpm	revolutions per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SL	<i>Stratum lucidum</i>
Tab.	Tabelle
Taq	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TC	Schwanzbiopsie (tailcut)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
u.a.	unter anderem
WB	Western Blot
WM	weiße Substanz
z.B.	zum Beispiel

Anhang

cDNA von CHL1-23

CGCCCGCCGCAAGTTTGTTCCTCCCGCCGCGGCCTGCGCGGAGGGAGGATCGCGCGCGGGGAGG
 CGCCGAGGGGCAGCAAGAGTGGAGAAAGTGCAGAAAGAAGCAACAGCCGCTCCACCCGCGGGCG
 GAAAAGTGGCCGGGCGCGGGCGGGGATGCGGCGCGGCTAACGGTCCCCGGCGGCCGCCGAGCC
 GCTAGGCGCAGAGGCAGATCCAGGTGTAGGGCAGGAGCTCCAGAACAGTCCAGTGGCTTTGCCT
 CTGCATCTGTCTGTGCCTCTGTCTCATTCTGTTTCCTGCTGTGCGTGGACATGGATGGCCCAGAAAG
 AGGTTTCCAAGGAAAAGAATAGCTTTTCTTCAAAGCCTCACCATCAGAACGGCATCAGAGCAGAA
 GGGGCCAGCCTTAGAAATCCCATTTGAGAGCCAGCGTGGAGTCTGTGGCTGTTTTCTACTGCAA
 ACCGATGTATCCTGGGTCAATTATGCTAATCACAGTGATTAATGACTATATACTTCACTTGGTGCCA
 CACTCCTATAATTCGAACCTCTGGGGCAGCTGAAGCAGGAAGATCAGGCCCCGGAATTCAAGGCC
 AGTCTGGGCAGCACATAACATTATGTCTCTAAAACAAAAATAAACTGTGGAAAATTTAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

aus der CHL1-23 cDNA abgeleitete Peptidsequenz

RPPQVCSPPPRPARREDRARGGAEGQQEWRKCGKKQQLHPRAEKWPGAAAGCGAANGPRRPPEPLG
 AEADPRCRAGAPEQSSGFASASVCASVSFCFLLCVDMethDGPFRGFQGKESStop

Oligonukleotide

PCR	Oligonukleotid	Sequenz	Verwendung
1	CHL1-23ABamH1F	AAGGATCCGCCCGCCGCAAGTTTGT	Amplifikation von CHL1-23 in pGEX 5x1
1	CHL1-23CEcoRIR	TTGAATTCTTAATCACTGTGATTAGCATA	Amplifikation von CHL1-23 in pGEX 5x1
2	CHL1-23 BglIIF	AGATCTCGCCCGCCGCAAGTTTG	Amplifikation von CHL1-23 in EGFP C1
2	CHL1-23 Sall-R	GTCGACCTATTCTTTTCCTTGGAAAC	Amplifikation von CHL1-23 in EGFP C1
1	NR2	GGGCTGATTATTCTGAGCTG	Genotypisierung NrCAM-defizienter Mäuse
1	NRWT2	GGTTGTACCAGATCGAGAGG	Genotypisierung NrCAM-defizienter Mäuse
1	NR for	ACTAATGTGGGGGTCTCTCAGT	Genotypisierung NrCAM-defizienter Mäuse
1	NRneo	AGTCATAGCCGAATAGCCTCTC	Genotypisierung NrCAM-defizienter Mäuse

PCR-Programme

PCR 1 : 94°C 3 min, (35 Cyclen: 94°C 30 sec, 57°C 45 sec, 72°C 1 min), 72°C 7 min

PCR 2 : 94°C 3 min, (35 Cyclen: 94°C 30 sec, 59°C 45 sec, 72°C 1 min), 72°C 7 min

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alexandra Susanne Heyden
Geburtstag: 02.07.1975
Geburtsort: Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

1985 - 1991: Gymnasium am Neandertal, Erkrath
1991 - 1995: Lessing-Kollegschule, Düsseldorf
1994: Abitur
1995: Biologisch-technische Assistentin

1995 - 2002: Psychologiestudium, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
1999 - 2000: Studium der Neurowissenschaften, Institute of Psychiatry,
King's College London, London
2000: Master of Science in Neuroscience
2001 - 2002: Diplomarbeit in der Forschergruppe für Molekulare
Neurobiologie, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
2002: Diplom
2002 - 2004: Mitarbeit in der Forschergruppe Neuronale Spezifikation,
Max-Planck Institut für Neurobiologie, Martinsried
2004 - 2007: Anfertigung der Doktorarbeit in der Forschergruppe
Neurogenetik, Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg
2007 - 2008: Mitarbeit in der Abteilung Neurochemie und Molekularbiologie,
Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg

Magdeburg, den 24.05.2008

.....
Alexandra Heyden

Veröffentlichungen

Referierte Originalarbeiten

Pariante CM, Makoff A, Lovestone S, Feroli S, Heyden A, Miller AH, Kerwin RW (2001) Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro by modulating the membrane steroid transporters. Br J Pharmacol 134: 1335-1343.

Heyden A, Angenstein F, Sallaz M, Seidenbecher C, Montag D (2008) Abnormal axonal guidance and brain anatomy in mouse mutants for the cell recognition molecules CHL1 and NrCAM. Neuroscience.

Posterabstracts

Heyden A, Pariante CM, Nebbia G, Makoff A, Pearce BD, Miller AH, Kerwin RW (2000) Modulation of the drug resistance glycoprotein by Kinase-A is relevant for glucocorticoid receptor function. Cambridge, England. Journal of Psychopharmacology 14, A32.

Heyden A, Rathjen F, Montag D (2007) Axonal guidance and cerebellar lobe formation in NrCAM-, CHL1-, and NrCAM/CHL1-double-deficient mice. Senventh Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany. p. 131.

Heyden A, Angenstein F, Rathjen F, Montag D (2007) Misguided axons and morphological size alterations in CHL1-, NrCAM-, and CHL1/NrCAM-double-deficient mice. Brain Development Symposium, London, England. p. 24.

Heyden A, Angenstein F, Altröck W D, Fejtova A, Seidenbecher C, Gundelfinger E (2007) Regulation of neuronal and glial cell populations in the hippocampus of Bassoon-mutant mice. 2nd Westerburg Symposium, Westerburg, Germany.