Aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Hamburg Eppendorf Direktor: Prof. Dr. M. Glatzel

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG ZUM HIRNVOLUMEN UND DER GLIAZELLDICHTE IN WILDTYP- UND TRANSGENEN MÄUSEN DIE DAS NEURALE MOLEKÜL L1 EKTOP IN ASTROZYTEN UND RADIALEN GLIAZELLEN EXPRIMIEREN.

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin in dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sylwia Iwona Martensen

aus Danzig

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am:10.07.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschluss: der/die Vorsitzende: Prof.Dr.med. Hagel

Prüfungsausschuss: 2.Gutachter/in:Prof.Dr.med. Glatzel

Prüfungsausschuss: 3.Gutachter/in:PD.Dr.med. Regelsberger

INHALTSVERZEICHNIS:

1.	FRAGESTELLUNG	8
2.	EINLEITUNG	9
	2.1. ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE	9
	2.2. DAS ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL L1	13
	2.2.1. Die L1-Familie	13
	2.2.2. Das L1-Gen	14
	2.2.3. Die Struktur des L1-Proteins	16
	2.2.4. Die L1-Signaltransduktion	18
	2.2.5. Die Expression des L1-Gens während der Entwicklung	22
	2.2.6. Die Funktion und Bedeutung der L1- Familie	23
	2.2.7. L1-assoziierte Erkrankungen der Nervenzellen	24
	2.2.8. Mausmodelle mit Überexpression von L1	26
3.	MATERIALIEN UND METHODEN	28
	3.1. Reagenzien	28
	3.2. Antikörper	29
	3.3. Laborgeräte	29
	3.4. Lösungen	29
	3.5. Transgene Mäuse	30

3.6.	. Histologie	33
	3.6.1. Schnittvorbereitung	33
	3.6.2. H.EFärbung von Kryostatschnitten	33
	3.6.3. Immunhistochemische Färbung von	
	Kryostatschnitten	34
3.7.	Auswertung	36
	3.7.1. Statistik	36
	3.7.1. Morphometrie	36
	3.7.2. Immunhistochemische Markierung	39
4. ERGEB	BNISSE	41
	4.1. Ventrikel	41
	4.2. Cortikale Dicke	43
	4.3. Striatum	46
	4.4. Hippocampus	48
	4.5. Immunohistochemie	52
5. DISSKU	JSION	55
6. ZUSAM	IMENFASSUNG	61
7. LITERA	ATURVERZEICHNIS	64
	7.1. Tabellenverzeichnis	72

7.2. Abbildungsverzeichnis	73
8. DANKSAGUNG	74
9. LEBENSLAUF	75

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

BrdU	Bromdeoxyuridin		
САМ	cell adhesion molecules		
са	circa		
CHD	CAM homologe Domäne		
CHL1	close homologue of L1		
Da	Dalton		
DAG	Diacylglycerol		
DM1-GRASP	dystrophia myotonica 1-general receptor for		
	phosphoinositides- associated scaffold protein		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
ERK	extracellular signal regulated kinase		
FN	Fibronectin		
GFAP	glial fibrillary acidic protein		
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol		
ICAM	intracellular adhesion molecules		
lg	Immunglobuline		
lgSF	Immunglobulin Superfamily		
kDa	Kilo Dalton		

MAG Mye	in associated	Glycoprotein
---------	---------------	--------------

- MAPK mitogen activated protein kinase
- MBP Myelin basisches Protein
- N-CAM Neural cell adhesion molecule
- NCAMs neural cell adhesion molecules
- NrCAM neuroglial cell adhesion molecule related cell adhesion molecule
- NSRE neural restrictive silencer element
- PAT prolin alanin threonine rich region
- PCR Polymerasekettenreaktion
- PI3K Phosphtidylinositol 3 Kinase
- PNS Peripheres Nervensystem
- PLC Phospholipase
- PSA polysialic acid
- ZNS Zentrales Nervensystem

1. FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit sollen adulte transgene GFAP-L1 Mäuse morphologisch charakterisiert und mit dem Wildtyp verglichen werden. Es soll geprüft werden, ob die ektope Expression von L1 in Astrozyten in der Embryogenese zu einer Verringerung der physiologischen neuronalen Apoptose führt. Dies hätte zur Folge, dass die transgenen Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine höhere neuronale Dichte aufweisen. Des Weiteren könnte die ektope L1-Expression in den Astrozyten zu Veränderungen der astrozytären Elemente im Gehirn führen. Entsprechend sollen in dieser Arbeit folgende Hypothesen geprüft werden:

1. Die einzelnen ZNS Strukturen in L1-Mäusen sind größer als in Wildtyp-Mäusen.

Es lassen sich signifikante Unterschiede der Astrozytendichte nachweisen.
Die neuronale Dichte wurde im Rahmen einer anderen Dissertation bestimmt.

Gehirne von 7 L1-Mäusen sollen morphologisch mit Gehirnen von 7 Wildtyp Mäusen verglichen werden. Als Variablen werden die Balkendicke, Ventrikelgröße, die Basalganglien- und Hippocampusfläche sowie die immunhistochemische Expression des glialen Markers GFAP bestimmt.

2. EINLEITUNG

Die Zellmembran hat vielseitige Funktionen. Neben Bildung von Kompartimenten, Erregungsbildung, Oberflächenvergrößerung und Ausbildung eines molekularen Erkennungssystems durch zellspezifische Oligosaccharid-Muster dient sie zur Abgrenzung von Außen und Innen, bietet der Zelle Schutz und sorgt für den Zusammenhalt des Zellinhaltes. Die Membran bildet durch selektive Permeabilität eine Permeationschranke und ermöglicht mittels aktiven Transportes den Austausch von Substanzen. Weiterhin kommt ihr die Funktion zu, ein von der Umgebung unterschiedliches Ionenmilieu aufrecht zu erhalten. Darüber hinaus verleiht sie der Zelle ihre Individualität (Blutgruppen, Antigene).

2.1. ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE

Für die Kommunikation der Zelle mit der Außenwelt spielen vier transmembrane Adhäsionsproteingruppen (CAMs, Cell-Adhäsions-Moleküle) eine zentrale Rolle: Selectine, Integrine, Cadherine und die Proteine der Immunglobulin-Superfamilie.

Die Integrine werden an der Zelloberfläche exprimiert und bilden Rezeptoren für verschiedene Proteine wie z.B. Kollagen oder Laminin.

Die Cadherine stimulieren calciumabhängig das Neuritenwachstum und werden nach Ort der Expression in E-Cadherine (Epithel), N-Cadherine (Nervensystem), R-Cadherine (Retina) und P-Cadherine (Plazenta) unterteilt. Ihre Wirkung wird durch Calcium beeinflusst, daher der Name "**ca**lcium **adher**ing".

Die calciumunabhängige Zell/Zell-Adhäsion wird über die Proteine der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) vermittelt. Die Immunglobulin-Superfamilie wird in zwei Gruppen von Proteinen unterteilt:

- Die integralen Membranproteine: NCAM-180, L1.
- Die Proteine, die durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-

Anker in der Zellmembran gehalten werden: NCAM-120, TAG, F3. Das am besten untersuchte Molekül ist das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), das in vielen Zellen exprimiert wird, überwiegend aber in Neuronen. Die neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie besitzen mindestens eine Immunglobulindomäne, sowie Fibronektin Typ III Domänen, deren Anzahl variabel ist. Die Molekülbindung an die Zellmembran erfolgt meistens durch die Transmembrandomäne, aber auch über die GPI-Anker. Es sind mindesten 20 Formen von N-CAM bekannt, die alle durch alternatives Spleißen der RNA-Transkripte eines einzigen Gens entstehen.

Die große extrazelluläre Domäne besteht aus fünf Ig-ähnlichen Domänen. Einige N-CAMs besitzen Hunderte von Sialinsäure-Einheiten, die durch ihre negative Ladung die Zelladhäsion verhindern können.



Abbildung 1:

A: Schematischer Aufbau neuraler Zelladhäsionsmoleküle.

Fünf Ig-ähnliche Domänen mit Disulfidbrücken verbunden, darauf folgend eine oder zwei Fibronectin III –Einheiten.

B: Homophile Wechselwirkung der NCAMs. Die Immunglobulindomänen von zwei Zellen gehen eine Bindung ein. (Alberts et al.,2004)

Cadherin und N-CAM können in der gleichen Zelle vorkommen. Die

Cadherin- vermittelte Zelladhäsion ist wesentlich stärker als die N-CAMvermittelte Adhäsion. Die N-CAM-vermittelte Adhäsion dient eher der Feinabstimmung bei der Regeneration und der Entwicklung. Bei einem Funktionsverlust von Cadherinen in der Entwicklung kommt es z.B. im Pancreas nicht zur Zellaggregation, wohingegen eine Fehlfunktion von N-CAM "nur" zur Bildung fehlorganisierter Langerhans'sche Inseln führt. N-Cadherin defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig. Fehlt das N-CAM so kommt es zu einer geringgradigen Störung in der Entwicklung des Nervensystems. Eine L1-Genmutation hat beim Menschen eine mentale Retardierung und neurologische Ausfälle zu Folge. Die Immunglobulin-Superfamilie spielt eine große Rolle in der Entwicklung des Nervensystems. So wurde z.B. ein Einfluss auf das Neuritenwachstum sowie wichtige Funktionen als Rezeptoren bei der axonalen Wegfindung und in der Signalweiterleitung gezeigt (Johnson et al., 1989). Über die Verbindung mit der cytoplasmatischen Tyrosinkinase vermitteln sie Signale an das Zellinnere. Darüber hinaus ist die IgSF an der Differenzierung von Neuronen und Gliazellen und der Migration sowie der Synapsenbilung und der synaptischen Plastizität beteiligt (Brümmendorf and Rathjen, 1994).



Abbildung 2.

Die Immunglobulin Superfamilie mit ihren Mitgliedern. Immunglobuline und Leukozytenrezeptoren spielen entscheidende Rolle im Abwehrsystem. Adhäsionsrezeptoren sind unerlässig für die Zellkommunikation.

2.2. DAS ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL L1

2.2.1. DIE L1-FAMILIE

In den 80er Jahren wurde das Zelladhäsionsmolekül L1 im zentralen Nervensystem (ZNS) der Maus identifiziert. Das Zelladhäsionsmolekül L1 gehört neben dem *close homologue of L1* (CHL1) das in der Maus, dem Menschen und der Ratte vorkommt (Holm et al., 1996), dem *neuroglial cell adhesion molecule-related molecule* (NrCAM) aus dem Huhn (Grumet et al., 1991) und dem Neurofascin (Volkmer et al., 1992) zur sog. L1-Unterfamilie der IgSF- Moleküle bei den Wirbeltieren. Die Mitglieder der L1-Familie kommen in verschiedenen Spezies vom Invertebraten bis zu den Säugetieren vor (Holm at al., 1996).

L1	Maus, Ratte, Mensch	
CHL1	Maus, Ratte, Mensch	
Neurofascin	Maus, Ratte, Huhn	
NrCAM	Maus, Ratte, Huhn, Mensch	
L1.1 ,L1.2	Zebrafisch	
L1 CAM	Goldfisch	
Neuroglian	linvertebraten	
Tractin	Invertebraten	

Tabelle 1.

Mitglieder der L1- Familie und deren Vorkommen.

2.2.2. DAS L1-GEN

Das L1-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Es besteht aus 29

Exonen, von denen 28 codierend sind. Das Exon 1 und ein Teil von Exon 2 werden nicht translatiert (Kohl et al., 1992 Kallunki et al., 1997). Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Isoformen von L1:

- die neuronale Isoform enthält die gesamte kodierende Sequenz von 28 Exons.
- die nicht-neuronale Isoform enthält die Sequenz ohne die Exone 2 und 27.

Der Startpunkt der Transkription liegt am Anfang von Exon 1. Kurz vor dem Translationsstartpunkt befinden sich die Bindungsdomänen von spezifischen Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression von L1 steuern. Die bekannten Transkriptionsfaktoren sind Pax-6 (Meeck et al., 1998), Hoxa-1 (Chalepolitis et al., 1994) und der Homöobox-Transkriptionsfaktor Barx 2 (Jones et al., 1997).

Das Silencerelement *neuronal restrictive silencer element* NSRE verhindert die L1-Expression in nicht- neuronalen Zellen und befindet sich in dem zweiten Intron (Kallunki et al., 1997).

Das Exon 27, das ein Tyrosin basierendes Sortiermotiv (YRSL) innerhalb der zytoplasmatischen Domänen kodiert, ist für die clathrinvermittelte Endozytose notwendig (Kamiguchi et al., 1998). Mutationen des menschlichen L1-Gens können alle Ig- und FN- III- Domänen betreffen sowie den zytoplasmatischen Bereich des Proteins (Van Camp et al., 1996).

2. DIE STRUKTUR DES L1-PROTEINS

Die L1-Proteine kann man in drei Domänen unterteilen:

1. die glycosylierte extrazelluläre N-terminale Domäne.

2. die Transmembrandomäne.

3. die phosphorylierbare, zytoplasmatische C-terminale Domäne. Aminoterminal finden sich im L1-Protein sechs Ig-Domänen gefolgt von vier bis fünf Fibronektindomänen (FN-III repeats), einer Transmembrandomäne und einer kurzen cytoplasmatischen Region. Eine Ig-Domäne besteht aus 100 Aminosäuren in zwei ß-Faltblättern, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Es wurden das 200 kDa große full-length L1-Protein sowie lösliche 180, 140, 50kDa Fragmente (Lindner et al., 1983 Rathjen and Schachner, 1984) und ein 30 kDa großes membranassoziiertes Fragment identifiziert (Gutwein et al., 2000). Diese Fragmente entstehen durch die proteolytische Prozessierung von L1. Hierdurch wird die Funktion von L1 reguliert. Das Neurofascin, das ebenfalls zu der L1-Familie gehört, enthält zwischen der vierten und fünften Fibronectindomäne zusätzlich eine Prolin-, Alaninund Threonin-reiche Region (PAT-Domäne). Intrazellulär besitzen die Mitglieder der L1-Familie die höchste Homologie. Die Membranverankerung

besteht aus einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) - Anker oder einer zytoplasmatischen Domäne (Abb.3).



Abbildung 3.

Schematische Darstellung der L1-Proteine.

N-Terminal befinden sich sechs Ig- Domänen (Kreisabschnitte). Neurofascin enthält zwischen der vierten und fünften Fibronectin- Domäne (Vierecke) eine Prolin-Alanin-Threonin- (PAT) reiche Region (Kreis).

Die zytoplasmatische Domäne enthält eine RSLE-Sequenz (schwarze Pfeile) und eine Ankyrin- bindende Region FIGQY (hellgraue Pfeile).

(Dirks 2003)

2.2.4. DIE L1-SIGNALTRANSDUKTION

Durch die extrazellulären Interaktionen werden multiple intrazelluläre Signalkaskaden von der intrazellulären Domäne aktiviert. Auf der intrazellulären Domäne wurden vier Phosphorylierungsstellen und zwei Tyrosinreste identifiziert. (Abb.4)

- eine Serin-Kinasen-Bindungsstelle
- eine Actin-Bindungsstelle
- eine Ezrin-Bindungsstelle
- eine Ankyrin-Bindungsstelle
- zwei Tyrosinreste

Die intrazelluläre Domäne reguliert sowohl die Endozytose, als auch den intrazellulären Transport und spielt eine wichtige Rolle bei der Zelloberflächenverteilung von L1. Die Ankyrin-Bindungsstelle reguliert in Abhängigkeit von ihrem Phosphorylierungszustand die Interaktion von L1 mit Actin. Diese Ankyrin-Actinzytoskelett-Interaktion ist entscheidend für die L1-Funktion und wird über das Ankyrin-Adapterprotein vermittelt (Davis und Bennet et al., 1993). Das Ankyrin-Adapterprotein bindet an das Actinzytoskelett und an das (S)FIGQY-Motiv des L1-Proteins. Das FIGQY-Motiv ist eine Ankyrinerkennungssequenz und enthält einen Tyrosinrest, der die FIGQY-L1-Interaktion ermöglicht. Der FIGQY L1-Komplex wird phosphoryliert, was zu einer Aktivierung der von Dynamin- und Srcabhängigen Endozytose führt (Schmid et al., 2000). Dynamin ist eine GTPase, Src eine nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase (pp60^{c-src}), die die Dynamin-Endozytose reguliert. Darauf folgt die Aktivierung der Phophatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Rac1, MEK, MAPK (ERK 1 und 2). Die Rac1-Aktivierung führt zu einer Zytoskelettveränderung, was die Bildung von Filopodien und Lamellipodien zur Folge hat. Der MEK-Inhibitor PD98059 hemmt das Neuritenwachstum. Die MAPK *extracellular signal regulated kinase* gehört zu den mitogenaktivierten Kinasen. Die aktivierte MAPK aktiviert Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Expression von Genen aktivieren, die für das Neuritenwachstum erforderlich sind. (Abb.5)



Abbildung 4.

Die intrazelluläre Domäne von L1.

Dargestellt ist die intrazelluläre Domäne von L1 mit den verschiedenen Tyrosinresten und Phosphorylierungsstellen und den entsprechenden Kinasen, die die Reste phosphorylieren (Kenwrick et al., 2000).



Abbildung 5.

Der Signaltransduktionsweg von L1.

Das aktivierte L1 aktiviert die Src- und Dynamin abhängige Endozytose. PI3K, Rac 1, MEK und MAPK werden nacheinander aktiviert. Die Aktivierung von Rac 1 führt zu Bildung von den Lamellipodien (Schmid et al., 2000).

2.2.5. DIE EXPRESSION DES L1-GENS WÄHREND DER ENTWICKLUNG.

Die Moleküle der L1-Familie werden sowohl im ZNS als auch im PNS sehr früh in der neuronalen Entwicklung exprimiert. Das L1 findet sich als einziges Molekül bis ins Erwachsenenalter. Das Vorkommen von L1 ist im ZNS auf die Neurone beschränkt. L1 wird in der Embryogenese von den postmitotischen Zellen, überwiegend in den unmyelinisierten Axonen exprimiert, jedoch nie von den Gliazellen, d. h. den Oligodendrozyten oder den Astrozyten (Bartsch et al., 1989).

L1-Antikörper verhindern in der ZNS-Entwicklung die Migration der Körnerzellen im Kleinhirn der Maus (Lindner et al., 1983). In den frühen, fötalen Stadien und bis ins Erwachsenenalter kann L1 im PNS sowohl in den dorsalen Spinalganglienzellen, den hämatopoietischen Zellen und den proliferierenden Epithelzellen der interstitiellen Krypten, als auch in den Zellen peripherer Tumore exprimiert werden.

2.2.6. DIE FUNKTION UND BEDEUTUNG DER L1-FAMILIE.

L1 fördert einerseits während der Entwicklung des Nervensystems die Migration sowie das Wachstum von Neuriten. Andererseits fördert L1 auch die Zellanheftung und die Axonbündelung. In vitro zeigt sich ein Einfluss von L1 auf das Überleben von Nervenzellen und die Myelinisierung von Schwannzellen. Außerdem ist L1 an der synaptischen Plastizität beteiligt (Schumann 1999).

Durch die Ligandeninteraktion ist L1 in der Lage eine Änderung des pH-Wertes in der Zelle oder eine Konzentrationsveränderung von intrazellulärem Inositolphosphat und Calcium zu bewirken (Bartsch und Schachner, 1999). Diese Veränderungen beeinflussen die Eigenschaften der Signaltransduktion in der Zelle.

Die L1 Moleküle können auf verschiedene Weise interagieren. Die folgenden Calcium unabhängigen Interaktionen wurden beschrieben:

- Homophile Interaktion zwischen zwei L1 Molekülen, die die Signaltransduktion und die Zytoskelettinteraktion beeinflussen.
- 2. Heterophile Interaktion zwischen L1 und der extrazellulären Matrix oder anderen Zelloberflächenmolekülen wie z.B. d*ystrophia myotonica 1general receptor for phosphoinositides- associated scaffold protein*

(DM1-GRASP), Integrinen, Neuracan und Phosphacan (Montgomery et al., 1996).

 Sowohl die homophile als auch die heterophile Interaktion kann mit Molekülen in benachbarten Zellen (trans-Interaktion) oder mit den Molekülen in derselben Zelle (cis –Interaktion) stattfinden.

Für das Neuritenwachstum sind mehr Domänen an der Funktion beteiligt als für die Zelladhäsion, wobei L1 immer zumindest ein Teil des Rezeptorkomplexes ist (Appel et al., 1993). Die Neuritenwachstumstimulierende Region wurde zwischen den FNIII- Domänen 2 und 3 identifiziert. Im peripheren Nervensystem wird nach einer Nervenläsion L1 auf den Schwannzellen vermehrt aktiviert, was die Regeneration und das Neuritenwachstum fördert.

2.2.7. L1-ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN DER NERVENZELLEN.

Mutationen des L1-Gens führen zu multiplen Defekten in der Entwicklung des ZNS, die eine Reihe klinisch verwandter Erkrankung verursachen, die unter dem Namen CRASH-Syndrom zusammengefasst werden. CRASH (<u>corpus</u> callosum hypoplasia, <u>retardation</u>, <u>adducted thumbs</u>, <u>spastic paraplegia</u>,

hydrocephalus) manifestiert sich klinisch als Hydro- und Makrocephalus, Hypoplasie des Vermis cerebelli oder des Tractus corticospinalis, spastischen Paraplagien, adduzierten Daumen und geistiger Retardierung. Bei einigen Fällen ist die geistige Retardierung die einzige Manifestation. Sie ist obligatorisch und reicht von milderer Retardierung bis zu schweren Formen mit Intelligenzquotienten zwischen 20-50. Es wurde nachgewiesen, dass Mausmutanten, denen das L1-Gen fehlt, ebenfalls erweiterte Ventrikel entwickeln, die weder mit einer Stenose der Aquaeductus Sylvii, noch mit Anomalien von Ependymzellen entlang der lateralen Ventrikel einhergehen. Einige der L1-knock out Mäuse weisen dennoch einen schwerwiegenden Hydrozephalus auf. Der Aquaeduct dieser Tiere ist vollständig geschlossen. Die verschiedenen L1-Mutationen werden in Verbindung mit dem CRASH-Syndrom gebracht, wobei 140 pathogene Mutationen identifiziert worden sind. Die Mutationen des menschlichen L1-Gens betreffen Ig- und FN- III-Domänen sowie den zytoplasmatischen Bereich des Proteins (Van Camp et al., 1996).

Die Patienten, bei denen die extrazelluläre Domäne betroffen ist, entwickeln eine schwerwiegendere Symptomatik als Patienten mit Mutation der zytoplasmatischen Domäne (Yamasaki et al., 1997).

2.2.8. MAUSMODELLE MIT ÜBEREXPRESSION VON L1.

Die transgene L1-GFAP-Maus wurde im Labor von Frau Prof. Schachner, Zentrum für molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg konstruiert. Unter dem Einfluss des GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) Promotors exprimiert diese transgene Maus L1 in den normalerweise L1 negativen Astrozyten. In dieser Arbeit wurde eine noch nicht veröffentlichte Maus (humaner GFAP-Promotor) untersucht. 1996 wurde bereits eine Maus mit murinem GFAP-Promotor konstruiert, auf die sich alle im folgenden zitierte Veröffentlichungen beziehen (Mohajeri et al., 1996).

Das Genkonstrukt besteht aus dem GFAP-Promotor gefolgt von einer für L1 kodierenden cDNA.

Ouredik, Bastmayer und Schachner haben die Aussprossung und die Bündelung von den Axonen des Tractus corticospinalis im Pons der L1-GFAP-Mäuse untersucht (Ouredik et al., 2001). In der Embryogenese der Maus kommt es ab dem 17. Embryonaltag zur Aussprossung von Axonen des späteren Tractus corticospinalis in Richtung der Capsula interna. Am Postnataltag 0 erreichen diese corticospinale Axone den Hirnstamm und am Postnataltag 1 das Rückenmark. In der oben genannten Studie wurden zwei voneinander unabhängige Linien der GFAP-L1-Maus verwendet. Die erste

Mauslinie (Nr. 3426), die eine deutlich stärkere L1 Expression aufwies, wurde zum größten Teil in der Studie verwendet. Die zweite Mauslinie (Nr. 3427) zeigte eine schwächere L1-Expression und wurde als eine Kontrolle bezüglich möglicher unspezifischer Effekte von den Transgenen Mäusen genutzt. Die Untersuchung des Tractus cortikospinalis in den posteromedialen Abschnitten des Neocortex, (Area 6) ergab, dass sich in der GFAP-Maus die corticospinalen Axone post partum schneller entwickeln als bei der Wildtyp Mäusen. Die fortgeschrittene Aussprossung der Axone bei den GFAP-L1 Mäusen könnte Folge eines schnelleren Neuritenwachstums oder einer früheren Generierung der motorischen Neuronen im Cortex sein. Um letztere Möglichkeit zu prüfen, wurde die Proliferation der Neurone in Area 6 mittels Markierung der DNA durch das Thymidin-Analogon Bromdeoxyuridin (BrdU) in der Embryogenese untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen Embryonaltag 11 und 15 doppelt so viele BrdU- positive Neurone bei den GFAP-L1-Mäusen generiert werden als in der Kontrollgruppe. Die Gesamtzahl der Neurone war jedoch in beiden Kohorten postnatal vergleichbar.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. REAGENZIEN

Aquatex Eindeckmedium	(MERCK)
DAB (3,3Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	(SIGMA)
Ethanol 50,70,80,90,96,100%	(APOTHEKE UKE)
Eosin 1%	(APOTHEKE UKE)
Eukitt	(KINDLER)
Hämalaun	(MERCK)
HCL-Alkohol 1%	(APOTHEKE UKE)
HCL 1N	(MERCK)
Histofine Multi Peroxidase	(MEDAC)
H ₂ O ₂ (Perhydrol)	(MERCK)
NaOH 1N	(MERCK)
Mayers Hämalaun	(MERCK)
Methanol	(MERCK)
TBS-Pufferfertigmischung	(DAKO)
Triton X100	(SERVA)
Xylol	(SDS)
Ziegenserum	(DAKO)

3.2. ANTIKÖRPER

Tabelle 2.

Erstantikörper	Hersteller	Bestell-	Verdünnung
		Nr.	
GFAP	DAKO	Z 334	1 : 1000
(Glial fibrillary acidic protein)			
Zweitantikörper			
Strep ABC	DAKO	K0492	Nach Angaben
			des Herstellers

3.3. LABORGERÄTE

Küvetten, Wiegen, Heizbad

Stift Dakopen

(DAKO)

Histologische Präparate auf Histobond Objektträger

3.4. LÖSUNGEN

• TBS/Triton 50mM pH 7,6:

Mischung in 5 | Aqua dest .+ 5 ml Triton X-100 (Dako S1968)

- DAB-Stammlösung: (200 mg DAB ad 40 ml TBS\Triton)
- DAB-Reaktionslösung: (1,0 ml TBS+100 μl H $_2$ O $_2,davon$ 30 $\mu l+9$ ml

TBS\Triton+1ml DAB-Stammlösung)

 Citratpuffer 10mM pH 6 Ansatz unmittelbar vor der Mikrowellenbehandlung: (Stammlösung A: 21,01 g Citronensäure auf 1000 ml Aqua dest)
(Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat auf 1000 ml Aqua dest)

Im Verhältnis A:B=9:1

3.5. TRANSGENE MÄUSE.

VERSUCHSTIERE

In dieser Arbeit wurden Mäuse untersucht, die L1 unter den Einfluss des humanen GFAP Promotors exprimieren. Die 7 Wildtyp- und 7 transgenen Mäuse (Mus musculus domesticus) von Stamm C57 black/6j wurden im Zentrum für molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg (ZMNH) gezüchtet. Zu Forschungszwecken wurden die entnommenen, 24h in Formalinlösung und 24h in 15% Saccharoselösung fixierten Gehirne von Herrn Dr. med. C. Bernreuther bereitgestellt. Die Tiere waren zwischen 8 und 16 Wochen alt und es wurde in den Untersuchungen jeweils Geschwisterpaare miteinander verglichen. Alle Messungen wurden ohne Wissen um den genetischen Hintergrund der Tiere durchgeführt.

PRINZIP DES GEN-TARGETING UND DER HERSTEULLUNG DER TRANSGENEN MÄUSE. DNA-MIKROINJEKTION:

Bei den Spenderweibchen wird zuerst eine Superovulation durch Gabe von Choriongonadotropin ausgelöst, um die Anzahl der Eizellen und damit auch möglicher Mikroinjektionen von 5 auf 35 zu erhöhen. Nach einer Paarung werden die befruchtete Eizellen entnommen und die Mikroinjektion vorgenommen (Abb.5). Das DNA-Konstrukt ist linear und frei von prokaryotischen Vektor-DNA-Sequenzen. Nach Eindringen des Spermiums in die Eizelle bleiben der Zellkern und der Oocytenkern zuerst getrennt bis der Zellkern der Eizellen eine meiotische Teilung beendet hat. Nach der Kernverschmelzung wird die DNA unter dem Injektionsmikroskop in die Eizellen injiziert und die befruchtete Eizelle wird in die Ersatzmutter implantiert. Nach drei Wochen wirft das Weibchen Junge. Etwa 66% der befruchteten Eizellen überleben die Injektion, und von diesen sind ca. 25% transgen. Die transgenen Tiere werden mittels Southern-Blot-Technik oder PCR auf Vorhandensein des Transgens untersucht. Durch Paarung einer Wildtypmaus mit einer trangenen Maus ist es möglich eine Integration des Transgens in die Keimbahn nachzuweisen. Solche Gründertiere (founder animals) werden zur Züchtung von transgenen Linien verwendet.



Abbildung 6.

Erzeugung transgener Mäuse durch DNA-Injektion (Bernard R. et al., 1996 "Molekulare Biotechnologie") Dargestellt sind alle Schritte: Superovulation durch Gabe von Choriongonadotropin, Paarung, Eizellenentnahme und die Mikroinjektion. Das DNA-Konstrukt ist linear und frei von prokaryotischen Vektor-DNA-Sequenzen. Die DNA wird unter dem Injektionsmikroskop in die Eizellen injiziert und die befruchtete Eizellen werden in die Ersatzmutter implantiert. Etwa 16% der Eizellen werden transgen. Die transgenen Tiere werden mittels Southern-Blot-Technik oder PCR auf Vorhandensein des Transgens untersucht.

3.6. HISTOLOGIE

3.6.1. SCHNITTVORBEREITUNG

Die fixierten Gehirne wurden 6 Stunden in fließendem Wasser gespült, danach in -80°C kaltes N-Methylylbutan als Kältevermittler gelegt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In einem Cryostat wurden bei -18°C 25µm dicke Hirnschnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger gezogen. Alle Schnitte wurden anschließend 10 min in Methanol fixiert und bei -80° C bis zu Weiterverarbeitung eingefroren.

3.6.2. HÄMATOXYLIN- EOSIN-FÄRBUNG VON KRYOSTATSCHNITTEN:

1. Objektträger auf dem Rand des Heizbades trocknen lassen

2. 5-10 s Formalin fixieren (56°C)

- 3. 5 s mit Leitungswasser spülen
- 4. 60 s Hämalaun (56°C)
- 5. 5 s mit Leitungswasser spülen
- 6. 5 s Bläuen im Wasserbad (56°C)

7. 1 min Eosin

8. 30-60 s Ethanol 90%,90%, 96%, 100%,100%

9. 2x 30-60 s Xylol

- 10. Eindecken mit Eukitt
- 11. 20 min im Brutschrank 60°C trocknen lassen

3.6.3. IMMUNHISTOCHEMIE VON KRYOSTATSCHNITTEN.

ANTIGENDEMASKIERUNG

1. Citratpuffer/ EDTA-Lösung: 9 ml Lösung A + 41 ml Lösung B mit Aqua dest auf 500 ml

2. Wiege mit Objektträgern in Plastikgefäß mit Citratpuffer/EDTA-Lösung einstellen

3. zweites Gefäß mit Aqua dest in die Mikrowelle stellen, da es sonst zum

Austrocknen von Präparaten kommen kann

4. 20-25 min in der Mikrowelle kochen

- 5. 20-25 min abkühlen lassen
- 6. 5 min puffern mit Triss-BSS

AUSFÜHRUNG

- 1. Objektträger am Rand trocken wischen
- 2. Gewebe mit Fettstift eingrenzen
- 3. Objektträger in Feuchtkammer legen

INKUBATION MIT DEM PRIMÄREN ANTIKÖRPER:

- 1. 300µl vom 1.Antikörper auf das Gewebe auftragen
- 2. 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
- 3. 10 min in 250 ml TRIS-Puffer spülen

INKUBATION MIT DEM ZWEIT ANTIKÖRPER

- 1. 30 min 5 ml TRIS Puffer + 50µl Lösung C
- 2. 10 min in 250 ml TRIS Puffer spülen

DAB-REATION

- 1. 1 ml TBS-Puffer + 100 μl $H_{2}O_{2}$ in Eppendorf-Cup, davon 300 μl zu 9 ml
- TBS- Puffer zugeben + 1 ml DAB
- 2. Schnitt 7 min Inkubieren
- 3. 10 min in fließendem Wasser spülen

GEGENFÄRBUNG

- 1. 30 s Mayers Hämalaun
- 2. 10 min in fließendem Wasser spülen
- 3. 30-60s Ethanol 80%, 96%, 100%, 100%
- 4. 2x 30-60s Xylol
- 5. Eindecken mit Eukitt
- 6. 20 min im Brutschrank bei 37°C trocknen lassen.

3.7. AUSWERTUNG

3.7.1. STATISTIK

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mittels einer "one-way Analysis of variance" mit SPSS für Windows Version 13 ausgewertet. Die one-way ANOVA wird zur Untersuchung der Differenzen von zwei oder mehr unabhängigen Gruppen verwendet, wobei man den Einfluss einer unabhängigen Variable auf eine abhängige Variable, welche die Messwerte enthält, untersucht. Diese Varianzanalyse setzt eine Normalverteilung der Messwerte und Fehlerkomponenten voraus. Die Fehlervarianzen müssen zwischen den Gruppen homogen sein und die Messwerte müssen unabhängig voneinander sein.

3.7.1. MORPHOMETRIE

Zur Ermittlung morphometrischer Daten von ausgewählten Strukturen wurde ein 386AT Computer mit 3 Framegrabberkarten zur Aufnahme des Videosignals und der Morphometriesoftware CUE3 von Olympus verwendet. Es wurden H.E.- Schnitte zur Untersuchung der morphologischen Parameter angefertigt. Die ausgewählten Areale wurden auf dem Bildschirm markiert und deren Fläche wurde bestimmt. Die Ventrikelgröße wurde als Summe
aller ausgemessenen Venrikelflächen multipliziert mit der Schnittdicke von 25µm ausgerechnet (Abb. 6., schwarz markiert). Um die Messung der einzelnen Hirne immer in der gleichen Schnittebene vorzunehmen, wurde die Lokalisation der Schnitte im Vergleich mit einem Atlas des Maushirns (Franklin, Paxinos 1997) bestimmt und korrespondierende Schnitte gewählt (Position Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm). Die corticale Dicke wurde in zwei Regionen gemessen: M1 entspricht dem motorischen Cortex (Abb 6., lila markiert), S1 dem sensorischen Cortex (Abb 6. grün markiert). Es wurden bei der Ausmessung vom Corpus callosum, der cortikalen Dicke, des Hippocampus und des Striatums drei aufeinander folgende Objektträger untersucht. Es wurden die Flächen des Hippocampus (Abbildung 7. grün markiert) und der Gyrus dentatus (Abbildung 7. gelb markiert) ausgemessen. Weiterhin wurde die Differenz zwischen Gesamthippocampus und Gyrus dentatus ausgerechnet. Die Basalganglien wurden im Abbildung 7. lila markiert dargestellt.



Abbildung 7.

Frontaler Schnitt durch das Gehirn der Maus. Dargestellt sind der sensorische Cortex (grün), der motorische Cortex (lila), Basalganglien (rot), Ventrikel (schwarz) und Balken (gelb). Atlas des Maushirns (Franklin, Paxinos 1997, Position Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm).



Abbildung 8.

Frontaler Schnitt durch das Gehirn der Maus. H.E. Dargestellt ist ein korrespondierender

Schnitt zur Abbildung 6.

3.7.2. IMMUNHISTOCHEMISCHE MARKIERUNG.

In den immunhistochemischen Präparaten wurden antikörpermarkierte Zellen in den ausgewählten Regionen ausgezählt. Die ausgewählten Regionen lagen im Bereich des Gyrus cinguli über dem Corpus callosum. (Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm nach dem Atlas von Franklin und Paxinos 1997) (Abbildung 10., grün markiert). In der vorliegenden Arbeit wurden GFAPmarkierten Zellen ausgezählt.



Abbildung 9.

Frontaler Schnitt durch das Gehirn der Maus. Dargestellt sind Gyrus dentatus (gelb) und Gesamthippocampus (grün).

(Franklin, Paxinos 1997, Position Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm).



Abbildung 10.

Frontaler Schnitt durch das Gehirn der Maus. H.E. Dargestellt ist ein korrespondierender Schnitt zur Abbildung 8.

4. ERGEBNISSE

4. 1. VENTRIKEL

Die Flächen von jedem Ventrikelschnitt der Maus wurden von occipital nach frontal ausgemessen und mit der Schnittdicke von 25µm multipliziert. In der Tabelle sind die Mittelwerte der einzelner Tiere (µI). Diese ausgerechnete Paardifferenz variiert von positiven bis negativen Werten, was man mit der Tatsache der fehlenden, signifikanten Unterschiede erklären könnte.

	Ventrikel µl			Diff.TG-WT		
Maus	Re	Li	3	Re	Li	3
S66 TG	56	75	47	-105	-97	-7
S67 WT	161	172	54			
S 93 TG	250	232	174	72	71	95
S92 WT	178	161	79			
S 97TG	302	254	112	142	75	-9
S 98WT	160	179	121			
S 118TG	218	211	172	35	58	-51
S 119WT	183	153	223			
R 68TG	122	170	166	-22	43	45
R 69WT	144	127	121			
R 74TG	115	158	72	44	73	62
R 75WT	71	85	10			
R 166TG	91	110	39	-19	-38	36
R 165WT	72	43	75			
MittelwertTG	164	173	115			
Stand.abTG	2,4	2,7	1			
Mittelwert WT	139	131	92			
Stand.abWT	2,9	2,1	2,6			

Tabelle 3.

Tabellarische Darstellung der Ventrikel (µI). Diff.- Differenz zwischen Transgen und

Witdtypmaus

Die Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede im Ventrikelvolumen. (Ventrikel re.: p=0,288, Ventrikel li: p=0,478, dritter Ventrikel: p=0,782)



Abbildung 11.

Die Darstellung des Ventrikelvolumens (µI). Die Ventrikelgrößen der transgenen Maus wurden blau markiert, rot markiert sind die Ventrikelgrößen der Wildtypmaus. Standardabweichung ist mit der schwarzen Linie dargestellt.

4.2 CORTIKALE DICKE

	S1 Re mm	S1 Li mm	TG-WT Re	TG-WT Li
Maus				
S 66 TG	1,2	1,2	0	0
S 67 WT	1,2	1,2		
R 68 TG	1	1,1	-0, 1	-0,1
R 69 WT	1,1	1,1		
S 92 WT	1,2	1,2	0	-0,3
S 93 TG	1,2	0,9		
S 97 TG	1,3	1,3	0,4	0,1
S 98 WT	0,9	1,2		
S 118 TG	1,2	1,4	0	0
S 119 WT	1,2	1,4		
R 165 WT	1,2	1,1	-0,2	0
R 166 TG	1	1,1		
57470		4.0	0	0.0
R74 IG	1	1,2	0	0,2
R 75 WT	1	1		
Mittelwert TG	1,1	1,3		
Stand.abwTG	0,03	0,04		
MittelwertWT	1,1	1,1		
Stand.abwW ⁻	0,02	0,03		

Die corticale Dicke wurde in motorischen und sensorischen Cortex gemessen.

Tabelle 4.

Tabellarische Darstellung der corticalen Dicke des sensorischen Cortex S1 (mm). Der Mittelwert der drei nacheinander folgenden Schnitte, die nach dem Atlas des Maushirns (Franklin, Paxinos 1997, Position Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm).bestimmt wurden. Diff.- Differenz zwischen Transgen und Witdtypmaus

	M1 Re mm	M1 Li mm	TG-WT Re	TG-WT Li	
Maus					
S 66 TG	1,2	0,2	0	-1,1	
S 67 WT	1,2	1,3			
R 68 TG	1,2	1,2	0	0,1	
R 69 WT	1,2	1,1			
				0	
S 92 WT	1,9	1,1	-0,8	0	
S 93 TG	1,1	1,1			
S 97 TC	1 3	1 2	03	03	
3 97 TG	1,5	1,2	0,5	0,5	
5 98 W I	1	0,9			
S 118 TG	1,2	1,2	0,2	-0,1	
S 119 WT	1	1,3			
R 165 WT	1,2	1,1	-0,1	0	
R 166 TG	1,1	1,1	,		
R 74 TG	1,2	1,1	0,1	0	
R 75 WT	1,1	1,1			
Mittelwert TG	1,1	1			
Stand.abTG	0,02	0,02			
MittelwertWT	1,1	1,1			
Stand. abWT	0,02	0,03			

Tabelle 5.

Tabellarische Darstellung der corticalen Dicke des motorischen Cortex M1 (mm) und des Mittelwertes der drei nacheinander folgenden Schnitte des motorischen Cortex. Differenz zwischen Transgen und Witdtypmaus

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Cortexdicke festgestellt werden. (motorischer Cortex rechts: p=0,548, motorischer Cortex links: p= 0.338, sensorischer Cortex rechts: p=0.541, sensorischer Cortex links: p= 0,876).



Abbildung 12.

Schematische Darstellung der cortikalen Dicke. Die Strecken von motorischem und sensorischem Cortex der Transgenmaus sind blau dargestellt, rot sind die Dicken von motorischem und sensorischem Cortex der Wildtypmaus. Mit schwarzen Linien ist die Standardabweichung dargestellt.

4.3 STRIATUM

Um die Messung der einzelnen Hirne immer in der gleichen Schnittebene vorzunehmen, wurde die Lokalisation der Schnitte im Vergleich mit einem Atlas des Maushirns (Franklin, Paxinos 1997) bestimmt und korrespondierende Schnitte gewählt (Position Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm).

Maus		Striatum mm ²	Diff. Re	Diff. Li
	Re	Li		
S 66 TG	2,4	1,4	0,3	-0,8
S 67 WT	2,1	2,2		
R 68 TG	1.4	2.3	-0.4	-0.2
R 69 WT	1,8	2,5	0,1	-,-
S 92 WT	1.4	1.6	-0.1	-0.1
S 93 TG	1,3	1,5	- ,	-,
S 97 TG	1.3	1,2	-0.5	-0,8
S 98 WT	1,8	2		
S 118 TG	1,3	1,4	-0,2	-0,2
S 119 WT	1,5	1,6		
R 165 WT	1,8	1,7	-0,3	0
R 166 TG	1,5	1,7		
R 74 TG	1,9	2,3	0	0,5
R 75 WT	1,9	1,8		
MittelwertTG	1,5	1,6		
Stand.ab TG	0,03	0,03		
MittelwertWT	1,7	1,7		
Stand.ab WT	0,04	0,04		

Tabelle 6.

Dargestellt ist der Mittelwert der Striatumoberflächen mm² der drei nacheinander folgenden Schnitte. Diff.- Differenz zwischen Transgen und Wildtypmäusen

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Transgenmaus in der Striatumfläche festgestellt werden. (Striatum p= rechts:0,935, Striatum links: p=0,569)



Abbildung 13.

Schematische Darstellung der Striatumgröße mm². Der Mittelwert des Striatum der transgenen Maus ist blau dargestellt, der Wildtypmaus rot. Mit schwarzen Linien ist sie Standardabweichung dargestellt.

4.4 HIPPOCAMPUS

Um die Messung der einzelnen Hirne immer in der gleichen Schnittebene vorzunehmen, wurde die Lokalisation der Schnitte im Vergleich mit einem Atlas des Maushirns (Franklin, Paxinos 1997) bestimmt und korrespondierende Schnitte gewählt (Position Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm).

			Hippocampus			
Maus	GD Re	GD Li	Ges Re	GesLi	Ca1-Ca3 Re	Ca1-Ca3 Li
S 66 TG	0,5	0,3	1,6	0,9	1	0,5
S 67 WT	0,5	0,6	1,4	1,7	1	1,1
R 68 TG	0,2	0,5	0,7	1,9	0,4	1,4
R 69 WT	0,3	0,3	1	1,4	0,7	0,9
S 92 WT	0,2	0,3	0,5	0,8	0,3	0,9
S 93 TG	0,3	0,4	0,9	1,3	0,5	0,9
S 97 TG	0,3	0,6	1	1,2	0,7	0,7
S 98 WT	0,4	0,5	1,5	1,6	1,1	1
S 118 TG	0,4	0,5	1,3	1,7	0,9	1,3
S 119 WT	0,5	0,5	1,3	1,4	0,8	1
R 165 WT	0,6	0,4	1,3	1	0,7	0,6
R 166 TG	0,3	0,3	0,8	1	0,6	0,7
R 74 TG	0,3	0,4	0,9	1,3	0,6	1
R 75 WT	0,3	0,3	0,8	0,8	0,6	0,7
MittelwertTG	0,3	0,4	1	1,3	0,6	0,9
Stand.ab TG	0,003	0,004	0,010	0,013	0,006	0,009
MittelwertWT	0,4	0,4	1,1	1,1	0,7	0,9
Stand.ab WT	0,004	0,004	0,011	0,011	0,007	0,009

Tabelle 7.

Darstellung der Hippocampusfläche (mm²). Es wurden die Flächen des Hippocampus (Gesamt) und der Gyrus dentatus (GD) ausgemessen. Weiterhin wurde die Differenz

zwischen Gesamthippocampus und Gyrus dentatus (Ca1-Ca3) ausgerechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei nacheinander folgenden Schnitten.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und

Transgenmaus in der gesamt Hippocampusfläche festgestellt werden.

(Hippocampus gesamt rechts: p=0,699, Hippocampus gesamt links: p=0,746)



Abbildung 14.

Schematische Darstellung der Hippocampusfläche (mm²)⁻ Die Fläche von gesamten Hippocampus der Transgenmaus sind blau dargestellt und rot die Wildtypmaus. Mit schwarzen Linien ist sie Standardabweichung dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Transgenmaus in der Gyrus dentatusfläche festgestellt werden.

(GD re: p=0,786, GD li: p=0,586)



Abbildung 15.

Schematische Darstellung des Gyrus dentatus (GD) (mm²) Die Fläche von Gyrus dentatus der Transgenmaus sind blau dargestellt und rot für die Wildtypmaus. Mit schwarzen Linien ist die Standardabweichung dargestellt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Transgenmaus in der Ca1-Ca3 Fläche festgestellt werden.

(CA1-CA3 rechts: p=0,98, CA1-CA3 links: p=0,698)



Abbildung 16.

Schematische Darstellung der Differenz zwischen den gesamten Hippocampus und Gyrus dentatus (Ca1-Ca3) mm². Die Fläche von Ca1-Ca3 der Transgenmaus sind blau dargestellt und rot die Wildtypmaus. Mit schwarzen Linien ist sie Standardabweichung dargestellt.

4.5 IMMUNHISTOCHEMIE



Abbildung 17.

In den immunhistochemischen Präparaten wurden antikörpermarkierte Zellen in den ausgewählten Regionen im Bereich des Gyrus cinguli über dem Corpus callosum (Bregma 0.50 mm Interaural 4.30 mm nach dem Atlas von Franklin und Paxinos 1997) ausgezählt. In dieser immunhistochemischen Färbung mit GFAP sind Astrozyten (braun) dargestellt. Es wurden Astrozyten (mm²) der drei nacheinander folgenden Schnitten

ausgezählt.

	GFAP Re	GFAP Li	Diff Re	Diff Li
Maus				
S 66 TG	86	92	-42	-15
S 67 WT	128	107		
R 68 TG	135	135	21	57
R 69 WT	114	78		
S 92 WT	121	121	-43	-50
S 93 TG	78	71		
8 07 TC	140	105	50	40
597 IG	142	135	50	49
5 98 W I	92	86		
S 118 TG	114	92		
S 119 WT				
R 165 WT	114	78	21	57
R 166 TG	135	135		
	101	100	00	0
R 74 TG	121	128	22	0
R 75 WT	99	128		
Mittelwert TG	95	112		
Stand.ab TG	4	5		
MittelwertWT	111	98		
Stand.ab WT	5	4		

Tabelle 8.

Die tabellarische Darstellung der GFAP-positiven Zellen. In der Tabelle sind die Mittelwerte der jeweiligen Mäuse mit der Standardabweichung und Differenzen zwischen Transgen und Wildtypmaus dargestellt.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Transgenmaus in der Zahl der GFAP-positiven Zellen festgestellt werden. (GFAP re: p=0,635, GFAP links: p=0,587)



Abbilldung 18.

Die schematische Darstellung von GFAP positiven Astrozyten in der GFAP-L1-Maus und der Wildtyp-Maus. Die Zellen wurde pro Gesichtsfeld 1mm² ausgezählt. Die Zahl der GFAP-positiven Zellen in der Transgenmaus ist blau dargestellt und rot für die Wildtypmaus. Mit schwarzen Linien ist die Standardabweichung dargestellt.

5. DISKUSSION

Thema der vorliegenden Arbeit war die morphometrische Untersuchung des Gehirns transgener Mäuse, welche das L1-Protein ektop in radiärer Glia und Astrozyten unter Einfluss des Promotors des humanen sauren Gliafaserproteins (GFAP) exprimieren. Das L1-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Neurogenese, der Migration, dem Neuritenwachstum und der Synaptogenese. Die Mauslinie wurde von der Arbeitsgruppe Schachner und Mitarbeitern im Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) generiert, um den Einfluss von L1 auf radiäre Glia und deren Funktion in der Neurogenese und dem Neuritenwachstum zu untersuchen. Im Rahmen früherer Arbeiten an transgenen Mäusen, die L1 ektop in Astrozyten unter den Einfluss des murinen GFAP-Promotors exprimieren, konnte gezeigt werden, dass es bei diesen Tieren in der Embryonalentwicklung zu einer transienten Vergrößerung des Durchmessers des Tractus corticospinalis kommt, und dass die Aussprossung der corticospinalen Axone früher erfolgt als bei Kontrolltieren (Ourednik et al., 2001). Außerdem wurde eine früher einsetzende und teilweise ektope Innervation des basalen Pons durch

Axonkollateralen aus dem Tractus corticospinalis beobachtet. Dabei verließen die Axonkollateralen den Tractus corticospinalis nicht in zwei separaten rostralen und caudalen Anteilen sondern in einer kontinuierlichen caudorostralen Richtung. Die ektopen Axonverzweigungen waren postnatal nur bis zum 22. Lebenstag nachweisbar. Die morphologischen Veränderungen gingen einher mit einem vorzeitigen Auftreten von GFAP positiven Zellen im basalen Pons als Zeichen einer vorzeitigen Differenzierung von Astrozyten.

Weitere Unterschiede in der Entwicklung des Zentralnervensystems von L1und Wildtyp-Mäusen wurden in der Untersuchung von Ourednik et al. (2001) nicht nachgewiesen. Beide Tiergruppen zeigten in der Schwangerschaft die gleiche Zunahme der Hirngröße.

Die Rückverfolgung corticospinaler Axone zu ihren corticalen Ursprungsneuronen mittels Fluoreszenzfarbstoff Di I erbrachte einen regelrechten Verlauf durch die Capsula interna, und das Mittelhirn. Auch in den caudal zum basalen Pons gelegenen Bahnen ergaben sich keine Hinweise auf Alterationen. Sowohl die Dicke des motorischen Cortex als auch die Neuronendichte und der Zeitpunkt der Neuronenentstehung zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen woraus die Autoren

folgerten, dass der Tractus corticospinalis in L1- und Wildtyp-Mäusen von der gleichen Anzahl corticaler Neurone gebildet wird und der vergrößerte Durchmesser des Tractus in den L1-Tieren durch die höhere Anzahl an Axonkollateralen zu erklären ist.

Später durchgeführte Verhaltensstudien erbrachten eine bessere Lernfähigkeit der transgenen Tiere (Wolfer et al., 1998).

Die vorgenannten Ergebnisse sowie der Nachweis einer verstärkten Neurogenese in vitro in neuronal vordifferenzierten (Dihne et al., 2003) und embryonalen Stammzellen (Bernreuther et al., 2006) bei Zusatz von L1 im Kulturmedium legten nahe, dass eine frühe Expression von L1 im embryonalen Nervensystem in der radiären Glia zu einer verstärkten Neurogenese führen könnte. Bei der radiären Glia handelt es sich um neurale Stammzellen, aus denen in der Embryonalentwicklung Neurone und Astrozyten entstehen. Für entsprechende in vivo Studien wurde die hier untersuchte transgene Maus generiert, die L1 ektop in Astrozyten und der radialen Glia unter Einfluss des humanen GFAP-Promotors exprimiert. Der humane GFAP-Promotor wird bereits an Tag 13 der Schwangerschaft aktiviert, der murine GFAP-Promotor dagegen erst gegen Ende der Schwangerschaft am 19. Tag.

Die vorliegende Studie wurde an insgesamt 14 Tieren durchgeführt, 7 Wildtyp Mäusen und 7 L1-GFAP Mäusen. Bezüglich der Größe der Ventrikel ergab sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Evaluation einzelner zentralnervöser Strukturen (Striatum, sensomotorischer Cortex, Hippocampus, Corpus callosum) erbrachte ebenfalls keine Unterschiede. Vormals festgestellte Differenzen bezüglich der Dicke des Corpus callosum zwischen transgenen Tieren, die L1 ektop unter Einfluss des murinen GFAP-Promotors exprimieren und Wildtyp Mäusen konnten bei den hier untersuchten Tieren nicht festgestellt werden.

Auf histologischer Ebene ergab sich für die Dichte der der Astrozyten entgegen der Arbeitshypothese kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Für das Fehlen jeglicher Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen in der vorliegenden Studie können verschiedene Ursachen verantwortlich sein:

 Im Gegensatz zu der Arbeit von Ourednik et al. (2001) wurden Tiere im Alter von 8 bis 16 Wochen untersucht, bei denen die ZNS Entwicklung bereits abgeschlossen ist. Etwaige Abweichungen in der ZNS-Entwicklung der transgenen Tiere könnten zu diesem Zeitpunkt

bereits korrigiert worden sein. Die Studien an transgenen L1-Mäusen mit murinem GFAP-Promotor erbrachten ausschließlich transiente Veränderungen.

- Da die Astrozytendichte nur stichprobenartig im Gro
 ßhirncortex bestimmt wurde, ist nicht auszuschlie
 ßen, dass es solche in anderen Arealen gibt. Allerdings ergaben sich aus der morphometrischen Analyse verschiedener zentralnervöser Strukturen hierf
 ür keine Anhaltspunkte.
- Darüber hinaus ist es möglich, dass die Unterschiede zwischen den Gruppen zu gering sind, um sie mit den hier angewandten morphologischen Methoden nachzuweisen.
- Eine weitere Ursache f
 ür fehlende Unterschiede zwischen der GFAP-L1-Maus und der Wildtyp Maus k
 önnte eine zu geringe Expression von L1 sein.
- 5. Weiterhin könnte der genetische Hintergrund der transgenen Tiere eine Rolle spielen. Zur Generierung der GFAP-L1-Maus wurde DNA in eine hybride Zygote aus c57bl/6j und SV126 injiziert. Die L1 exprimierenden Nachkommen wurden dann mit reinen c57bl/6j rückgekreuzt, um einen reinen genetischen Hintergrund zu schaffen.

Die für die durchgeführten morphologischen Untersuchungen verwendeten Tiere stammen aus der 5. Rückkreuzung, so dass es unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen ist, dass ein Einfluss des residualen SV126-Hintergrundes für den fehlenden Nachweis von Unterschieden verantwortlich ist.

In der Laborumgebung zeigten die hier untersuchten Tiere keine groben Verhaltensauffälligkeiten, was auf eine zumindest weitgehend normale Entwicklung des ZNS hinweist.

Zusammenfassend ergaben die hier durchgeführten morphologischen Untersuchungen – bei methodisch unterschiedlichem Ansatz und früherer Expression von L1 in der Embryonalentwicklung der transgenen Tiere im Vergleich zu den Studien von Ourednik et al. (2001) – in vielen Aspekten vergleichbare Ergebnisse wie bei der ektopen Expression von L1 unter dem Einfluss des murinen GFAP-Promotors.

Zur Klärung etwaiger transient auftretender Unterschiede in der ZNS-Entwicklung wären weitere Arbeiten an transgenen Mausembryonen notwendig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde das Gehirn transgener Mäuse untersucht, die das L1-Protein ektop in radiärer Glia und Astrozyten unter Einfluss des Promotors des humanen sauren Gliafaserproteins (GFAP) exprimieren. Diese Mauslinie wurde zwecks Untersuchung des Einflusses von L1 auf die Funktion der radiären Glia in der Neurogenese und dem Neuritenwachstum von der Arbeitsgruppe Schachner im ZMNH generiert.

Gehirne von 7 L1-Mäusen wurden morphologisch mit Gehirnen von 7 Wildtyp Mäusen verglichen. Als Variablen wurden die Balkendicke, Ventrikelgröße, Größe der Basalganglien und des Hippocampus in H.E.- Schnitten sowie die Expression glialer Marker GFAP immunhistochemisch untersucht.

Das L1-Protein beeinflusst die Synaptogenese, die Migration, das Neuritenwachstum und die Neurogenese.

Frühere Arbeiten an transgenen Mäusen, die L1 ektop in Astrozyten unter Einfluss des murinen GFAP-Promotors exprimieren, haben gezeigt, dass es bei diesen Tieren in der Embryonalentwicklung zu transienten Veränderung im Tractus corticospinalis kommt sowie zu einem früheren Auftreten GFAPpositiver Astrozyten (Ourednik et al., 2001). Beide Tiergruppen zeigten in der

Schwangerschaft jedoch die gleiche Zunahme der Hirngröße. In den Bahnen caudal des Pons ergaben sich keine Hinweise auf Alterationen, die Dicke des motorischen Cortex als auch die Neuronendichte zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen.

Verhaltensstudien erbrachten eine bessere Lernfähigkeit der transgenen Tiere (Wolfer et al., 1998).

Auch in der vorliegenden Arbeit, bei der transgene Mäuse untersucht wurden, die L1 unter dem humanen GFAP-Promotor bereits am Tag 13 der Schwangerschaft exprimieren, zeigte sich bezüglich des Hirnvolumens und der Ventrikelgröße kein Unterschied zu Wildtypmäusen. Die Untersuchung von Striatum, sensomotorischem Cortex, Hippocampus und Corpus callosum erbrachte ebenfalls keine Unterschiede. Es konnten die früher nachgewiesenen Differenzen bezüglich der Dicke des Corpus callosum zwischen transgenen Tieren, die L1 ektop unter Einfluss des murinen GFAP-Promotors exprimieren und Wildtyp Mäusen bei den hier untersuchten Tieren nicht bestätigt werden.

Histologisch ergab sich für die Dichte der Astrozyten entgegen der Arbeitshypothese kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Sofern die ektope Expression von L1 zu Alterationen in der Entwicklung der hier untersuchten Tiere führt, wären diese als transient anzusehen, da zum untersuchten Zeitpunkt im Alter von 8-16 Wochen keine Unterschiede zu den Wildtypmäusen festgestellt werden konnten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, (2004)
 Molekularbiologie der Zelle 4.Auflage
- 2. Alberts B., (2002) Lehrbuch der Zellbiologie.
- Appel F., Holm J., Conscience F.J., Schachner M. (1993). Several extracelulary domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhension. J Neurosci 13:4764-4775.
- 4. Bartsch U., Kirchhoff F., Schachner M. (1989). Immunhistological localization of adhension molecules L1, N-CAM and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. J Neurosci 11:451-462.
- 5. Behrendt A., (2005) Untersuchung zur Interaktionen zwischen dem Zelladhäsionsmilekül L1 und dem Zytoskelettprotein Cartacin.
- Brümmendorf, T., Ratjen, F.G. (1994). Cell Adhesion Molecules
 Immunglobulin Superfamily. Academic Press, London. Protein Profile
 1: 951-1042
- 7. Davis J.S., Benett V.,(1994) Ankyrin-binding activity of nervous system cell adhesion molecules expressed in adult brain. J Biol

Chem 269: 27163-66.

- Dahme M., Bartsch U., Martini R., Schachner M., Mantei N., (1997)
 Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. Nat Genet 17:346-9
- Dirks P., (2003) Die Familie neuraler Zellerkennungsmoleküle: postnataler Expressionsmuster und die Identifizierung cytoplasmatischer Interaktionen.
- Donato D., (1988) Calcium independent, pH regulated effects of S100 proteins on assembly-disassembly of brain microtubulin protein in vitro.Journal 17: 5913-22.
- 11. Franklin B.J., Paxinos G.T., (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates, Academic press New York
- Gaarskjaer F., (1986) The organization and development of the hippocampal mossy fiber system Brain Res 396:335-37
- Grumet M., Mauro V., Burgoon M.P., Edelmann G.M., Cunningham
 B.A. (1991) Structure of neurall cell adhesion molecules. J Cell Biol 133, 1399-1412.
- Gutwein P.,Olszewski M., Mechtersheimer S., Agmon-Levin N., Altevogt P.(2000). Role of src kinases in the ADAN-mediated release of L1

adhesion molecule from human tumor cells.

J Biol Chem 20:15490-15497

- 15. Hillebrand 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 11:813-26
- 16. Horsch M., (1997)The L1 family of neural cell adhesion molecule old proteins perfom1ing new tricks Neuron 17:587-93
- Holm J., Hillenbrand R., Steuber V., Bartsch U., Moos M., Lübbert H.,
 Montag D., Schachner M., (1996). Structual features of a close
 homologue of L1 (CHL1) in the mouse. Eu J Neurosci 8:1613-1629.
- 18. Horstkorte R., Schachner M., Magyar J.P., Vorherr T., Schmitz B. (1993). The fourth immunglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. J Cell Biol 121: 1409-1421.
- 19. Joachim Ude, Michael Koch, (2001) Die Zelle Spektrum 3. Auflage
- 20. Johnson P.W., Abramow, Newerly W., Seilheimer, B., Sadoul R., Tropak M.B., Arquit M., Dunn R. J., Schachner M., Roder J.C.

(1989). Recombinant myelin-associated glycoproteinconfers neural adhesion and neurite outgrowth function. Neuron 3:377-385.

- 21. Kadmon G., Kowitz A., Altevogt P., Schachner M. (1990). The neural cell adhesion molecule NCAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. J Neurosci 193-210.
- 22. Kamiguchi H., Long K.E., Pendergast M., Schaefer A.W., Rapoport I., Kirchhausen T., Lemmon V. (1998). The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrinmediated pathway J Neurosci 18:5311-5321.
- 23. Kirschner D.A., Ganser A.L., (1980) Compact myelin exists in the absence of basic protein in the shiverer mutant mause.
 Nature 238: 207-10.
- 24. Kristiansen L.V., Marques F.A., Soroka V., Ronn L.C., Kiselyov V., Pedersen N., Berezin V., Bock E., (1999). Homophile NCAM interactions interfere with L1 stimulated neurite outgrowth. FEBS Lett. 464(1-2):30-4.
- 25. Landry C.F., Ellison J.A., Campagnoni C., Kampf K., (1996) Myelin basic protein gene expression in neurons: development and regional changes in protein targeting within neuronal nuclei, cell bodies, and

processes. J Neurosci 3:342-53.

- 26. Lindner J., Rathjen F.G., Schachner M. (1983). L1 mono-and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. Nature 305: 427-430.
- 27. Lodisch H., A. Berk, Zipursky, Baltimore, Dornell (2000)
- 28. Molekulare Zellbiologie Spektrum 4. Auflage
- Luthl M., Laurent J.P., Figurov A., Müller D., Schachner M., (1994)
 Hippocampal longterm potentation and neural cell adhesion molecules
 L1 and NCAM. Nature 372:777-7.
- 30. Mohajeri M., Bartsch U., Van der Putten H., Saurig G., Mücke L., Schachner M., (1996) Neurite outgrowth on non-permissive substrates in enhaced by ectopic expression of the neural adhesion molecul L1 by mouse in astrocytes. J Neurosci 46:1-6
- 31. Montgomery A.M., Becker J.C., Siu C.H., Lemmon V.P., Cheresh D.A., Pancook J.D., Zhao X., Reisfeld R.A. (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta .J Neurosci 20: 475-485.
- 32. Newman S., Kitamura K., Campagnoni A.T., (1989) Identification of a cDNA coding for a fift from of myelin basic protein in mouse Pro Natl

Acad Sci USA 84:886-90

- 33. Pedraza I., (1997) Nuclear transport of myelin basic protein.J Neurosci 50: 258-64.
- 34. Perrin F., Rathjen F., Stoeckli E.T., Koroll M., Volkmer H. (2001) Districkt subpopulations of sensory afferens require F11 or axonin-1 for growth to their target layers within the spinal cord of the chick. Neuron 30, 707-26.
- 35. Prasad K., Barouch W., Martin B.N., Greene L.E., Eisenberg E., Pirfication of a new clathrin protein from bowine brain coated vesictes and its identification as myelin basic protein. J Biol Chem 51: 30551-6.
- 36. Price D.L., (1998) Genetic neurodegenerative disease: the human illnes and transgenetic models.
- 37. Rathjen F.G., Schachner M. (1984). Immunocytological and
 biochemical charaterization of new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. EMBO 3:1-10
- 38. Rose S.P., (1995). Glycoproteins and memory formation.

J Neurosci 20: 73-79.

Rosenbluth H.,(1980) Peripheral myelin in the mouse mutant shiverer
 J Camp Neurol 193(3):729-39.

- 40. Schmid R.S., Pruitt W., Maness P.F., (2000) AMAP-kinase signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires scr- dependet exocytosis. J Neurosci 20: 4277-88.
- 41. Schultheis M. Untersuchung zur Bedeutung der Serin-phosphoryrierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 für das Neritenwachstum
- 42. Super H., Martinez A., DelRio J., Sorianto E., (1998) Involvement of district pioneer neurons in the formation of layer-spezific connections in the hippocampus J. Neusosci 18:4616-26
- 43. Takeda Y., Asou H., Murakami Y., Muira M., Kabayashi M., Uyemura K., (1996) A nonneural isoform of cell adhesion molecule L1 :tissue-specific expression and functional analysis. J Neurochem 66: 2338-49
- 44. Ude J., Koch M. Die Zelle- Atlas der Ultrastruktur. Auflage Spektrum
- 45. Yamasaki M., Thomson P., Lemmon V., (1997) CRASH Syndrome: mutations in L1CAM corretate with severity of the disease. Neuropediatrics 28(3):175-8
- 46. Van Camp G., Fransen E., Vits L., Willems P.J. (1996). A locusspecific mutation database for the neutral cell adhension molecule L1CAM (Xq28). J Neurosci 21:391 8
- 47. Volkmer H., Hassel B., Wolff J.M., Frank R., Rathjen F.G. (1992).

Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and relationship to a neural subgroup of the immunglobulin superfamily. J Cell Bilo 1:149-161.

- 48. Wolter D.P., Mahajeri H.M., Lipp M.P., Schachner M., (1998) Increased flexibility and selectivity in spetial learning of transgenetic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. Eur Neurosci 2:708-17
- 49. Zimmer D.B., Cornvall E.H., Landar A., Song W., (1995) The S100 Family: history, function and expression.
- 50. Brain Ress Bull. 37(4): 417-29

7.1 TABELLENVERZEICHNIS

- 1. Mitglieder der L1- Familie und deren Vorkommen.
- 2. Die Antikörper.
- 3. Die tabellarische Darstellung der Ventrikelgröße.
- 4. Die tabellarische Darstellung der corticalen Dicke von sensorischen Cortex.
- 5. Die tabellarische Darstellung der corticalen Dicke von motorischen Cortex.
- 6. Die tabellarische Darstellung des Stratums.
- 7. Die tabellarische Darstellung des Hippocampus.
- 8. Die tabellarische Darstellung der GFAP und MBP.
7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- 1. A. Schematischer Aufbau neuraler Zelladhäsionsmoleküle B. Die homophile Wechselwirkung der N-CAMs.
- 2. Die IgSF mit ihren Mitgliedern
- 3. Schematische Darstellung der L1-Proteine.
- 4. Die intrazelluläre Domäne von L1
- 5. Der Signaltransduktionweg von L1.
- 6. Erzeugung transgener Mäuse durch DNA-Injektion.
- 7. Der frontale Schnitt durch das Gehirn der Maus
- 8. Der frontale Schnitt durch das Gehirn der Maus. H.E.
- 9. Der frontale Schnitt durch das Gehirn der Maus
- 10. Der frontale Schnitt durch das Gehirn der Maus H.E.
- 11. Schematische Darstellung der Ventrikelgröße
- 12. Schematische Darstellung der cortikalen Dicke.
- 13. Schematische Darstellung der Stratumgröße
- 14. Schematische Darstellung der Hippocampusgröße
- 15. Schematische Darstellung des Volumens des Gyrus dentatus
- 16. Schematische Darstellung des Volumens von Ca1-Ca3
- 17. Immunologische Färbung von Glia.
- Schematische Darstellung von GFAP positiven Zellen in der GFAP-L1-Maus und der Wildtyp-Maus

8. DANKSAGUNG

An der ersten Stelle möchte ich Prof. Dr. Christian Hagel und Dr. Christian Bernreuther aus dem Institut für Neuropathologie der Universität Hamburg für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit danken.

Ganz besonders möchte ich Ihnen danken für die ständige Hilfsbereitschaft, so viel Bemühung und Geduld.

Herrn Martin Haberkorn danke ich für die Einführung in die Laborarbeit, er hatte ein stets offenes Ohr für kleine und große Probleme. Mein besonderer Dank gilt Ulrike Rumpf, Yvonne Pulkenat. Herrn Dr. Jakob Matschke danke ich für alle technischen und materiellen Hilfen.

Ich möchte mich ebenfalls herzlich bei meinem Mann Michael bedanken. Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern, die mir durch die strenge Erziehung das Medizinstudium ermöglicht haben. Agnieszka und Daniel bin ich für die moralische Unterstützung ewig dankbar.

9. LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Martensen

Geburtsname: Korzeniewska

Vornamen: Sylwia Iwona

Geburtsdatum: 16.03.1982

Geburtsort: Gdynia (Polen)

AUSBILDUNG

1997-2001: Allgemeinbildendes Liceum nr. X und Abitur in Danzig

STUDIUM

09.2001- 03.2002: Technische Hochschule in Danzig Fach: Informatik

03.2002- 10.2008: Universität Hamburg Fach: Humanmedizin

20.03.2004: Physikum

1.09.-31.09.2005: Famulatur ZAD UKE

1.10.05-31.12.2005: Famulatur Rheumaklinik Bad Bramstedt

31.10.2008: Staatsprüfung

PROMOTION

Promotionsarbeit bei Prof. Dr. C. Hagel im Institut für

Neuropathologie der Universität Hamburg

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegeben Quellen und Hilfsmitteln nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenem Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

.....