Funktionelle Analyse von Zellerkennungsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie während der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems des Zebrafisches *Danio rerio* (HAMILTON, 1822)

Dem Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von Dipl.-Biol. Dimitrios Gimnopoulos geboren am 28.06.1970 in Hamburg

2002

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Frau Professor Dr. M. SCHACHNER

Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ

Tag der Disputation: 25. Oktober 2002

Hamburg, den 11. Oktober 2002



ldo Kre

Professor Dr. U. Wienand Dekan



Der Zebrafisch (Danio rerio) ©The Zebrafish Information Network

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG1
1.1	Neurale Zelladhäsionsmoleküle1
1.2	Die Immunglobulin-Superfamilie1
1.3	Das neurale Zelladhäsionsmolekül F3/F11/Contactin1
1.4	Die neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1 und L1.22
1.5	CLIM/NLI/Ldb-Cofaktor als regulatorisches Protein während der Entwicklung 3
1.6	Der Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)4
1.7	Der Zebrafisch als System bei der Regeneration des Nervensystems5
1.8	Morpholinos6
2	MATERIAL
2.1	Puffer, Lösungen
2.2	Nährmedien10
2.3	Antibiotika10
2.4	Vektoren10
2.5	Kits11
2.6	DNA-modifizierende Enzyme11
2.7	Referenzmoleküle11
2.8	Andere Biochemikalien11
2.9	Bakterienstämme12
2.10	Morpholinos12
2.11	Oligonukleotide12
2.12	Peptide12
2.13	Antikörper12
3	METHODEN 13
3.1 3.	Mikrobiologische Methoden 13 1.1 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien 13

J.1.4	I ransformation kompetenter Bakterien	13
3.1.3	Plasmid-Isolierung	13
32 M	slekularhiologische Methoden	13
321	Restriktionsverdau	13
3 2 2	PCR (Polymersse-Ketten-Reaktion)	14
3.2.2	Phenol/Chloroform-Extraction von Nukleinsäuren	14
3.2.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren an Glasyliessäulen	15
3.2.4	Snektronhotometrische Messung zur Bestimmung der Konzentration und des	15
J.2.J Doinhoi	spektrophotometrische Wessung zur Destimmung der Konzentration und des	15
2 2 6	Agarasa Galalaktronhorasa	15
5.2.0 2.2.7	Agalose-Oelelekiiopilolese	10
5.2.7 2.2.8	Denkognhogyliogung von DNA	10
5.2.0 2.2.0	Lightian	10
3.2.9	Ligation	10
3.2.10	Kionierung von DNA unabnangig von Kestriktionsschnittstellen mit dem ${}^{\mathbb{R}}$ Cl $\overset{\circ}{\longrightarrow}$ Kionierung von DNA unabnangig von Kestriktionsschnittstellen mit dem	17
Seamles	s Cloning Kit (Stratagene)	1 /
3.2.11	5 RACE PCR mit dem FirstChoice ⁴⁴ RLM-RACE Kit (Ambion)	1 /
3.3 RN	A: Molekularbiologische Methoden	18
3.3.1	Arbeiten mit RNA	18
3.3.2	Präparation von Gesamt-RNA	18
3.3.3	DNase-Behandlung	19
3.3.4	cDNA-Synthese, Reverse Transkription	19
3.3.5	in vitro Transkription	19
3.3.6	RNA-Gelelektrophorese	20
3.3.7	RNA-Fällung	20
34 Bi	chemische Methoden	20
3.4 Bio	ochemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten	 20
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen	20 20 20
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2 3.4.3	Chemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung	20 20 20 21
3.4 Bi 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern	20 20 20 21 21
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung	20 20 20 21 21 21
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6	Ochemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS BAGE und Western Plet	20 20 20 21 21 21 21
3.4 Bi 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 2.4.7	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Penegenet Förhung	20 20 20 21 21 21 21 21
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 2.4.8	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Snarifikärnen ühren Antilkärnen durch Dentid Desigdometion	20 20 21 21 21 21 21 22
3.4 Bi 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption	20 20 21 21 21 21 21 22 22
3.4 Bi 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption	20 20 20 21 21 21 21 22 22 22
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen	20 20 20 21 21 21 21 22 22 22 23
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2	behemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ilbiologische Methoden Einfrieren von Zellen Revitalisierung von Zellen	20 20 20 21 21 21 21 22 22 22 23 23
3.4 Bio 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Revitalisierung von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM	20 20 20 21 21 21 21 22 22 22 23 23
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Revitalisierung von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 23 23 23
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM Kit Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 23 23 23 23 23
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 3.5.5 	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Revitalisierung von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM Kit Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen	20 20 20 21 21 21 21 21 22 22 22 23 23 23 23 23 24
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 3.5.4 3.5.5 	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Revitalisierung von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM Kit Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen	20 20 20 21 21 21 21 22 22 23 23 23 23 23 24
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 3.5.5 3.6 Pe 3.6 1	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM Kit Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen	20 20 20 21 21 21 21 22 22 23 23 23 23 23 23 24 24 24
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 3.5.5 3.6 Pe 3.6.1 3.6.1 3.6.2 	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS [™] Kit Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen rtubations-Techniken RNA-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier	20 20 20 21 21 21 22 22 22 23 23 23 23 23 23 24 24 24 24 25
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 3.5.5 3.6 Pe 3.6.1 3.6.1 3.6.2 	bchemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung. Herstellung von Peptidantikörpern. Deglykosilierung. SDS-PAGE und Western Blot. Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM Kit Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen rtubations-Techniken RNA-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier Morpholino-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier	20 20 20 21 21 21 21 22 22 23 23 23 23 23 23 24 24 24 25
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 3.5.5 3.6 Pe 3.6.1 3.6.2 3.7 Me	bechemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM Kit Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen rtubations-Techniken RNA-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier Morpholino-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier	20 20 20 21 21 21 22 22 23 23 23 23 23 23 24 24 24 25 26
 3.4 Bit 3.4.1 3.4.2 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.5 Ze 3.5.1 3.5.2 3.5.3 Reagent 3.5.4 3.5.5 3.6 Pe 3.6.1 3.6.1 3.6.2 3.7 Me 3.7.1	bechemische Methoden Herstellung von Gehirn-Homogenaten Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen Proteinbestimmung Herstellung von Peptidantikörpern Deglykosilierung SDS-PAGE und Western Blot Ponceaurot-Färbung Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption Ibiologische Methoden Einfrieren von Zellen Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUS TM Kit. Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen rtubations-Techniken RNA-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier Morpholino-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier whole mount in situ Hybridisierung	20 20 20 21 21 21 21 22 22 23 23 23 23 23 23 23 24 24 24 25 26 26 26 26 26 26 26 21 21 21 21 21 22 22 22 23 23 23 23 23 23 23 24 24 25

3.7.3	X-Gal-Färbung	27
3.7.4	Überführen der Zebrafischlarven auf Objektträger	27
3.7.5	Herstellung von Gewebeschnitten	27
3.7.6	Indirekte Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten	28
3.7.7	Läsion des optischen Nerven	28
3.7.8	Läsionen des Rückenmarks und retrograde Farbstofffüllung	28
3.7.9	<i>in situ</i> Hybridisierung an Kryostatschnitten des Hirns und des Auges adulter	• •
Zebratisc	he	28
3.7.10	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	29
4 ERGE	BNISSE	30
4.1 Vla	niowana and Chaveltoniciowana des E2 Cons	20
4.1 KIO	Klonierung der vollständigen cDNA von E3	30
4.1.1	Kiomerung der vonstandigen cDNA von 15.	30
4.2 Seq	uenzanalyse des F3 Gens	31
4.3 F3 I	Expression in der frühen larvalen Entwicklung	32
4.3.1	F3 Expression in postmitotischen Neuronen	33
4.3.2	Untersuchungen zur Regulation der Genexpression durch CLIM-Cofaktoren	34
		•
4.4 Fun	ktionelle Analyse des F3 Gens	36
4.5 F3 I	Expression in der späten larvalen Entwicklung	36
4.6 F3 I	Expression während der Regeneration	38
4.6.1	F3 Expression während der Regeneration des optischen Nerven	38
4.6.2	Transiente Hochregulation von F3 im lädierten optischen Trakt	39
4.6.3	F3 Expression nach einer Läsion des Rückenmarks	40
4.7 Die	neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1 und L1.2	43
4.7.1	Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von L1.1 und L1.2	43
4.7.2	Biochemische Charakterisierung von polyklonalen Antiseren gegen L1.1 und	
L1.2.	44	
4.7.3	Deglykosylierung von adulten Gehirnhomogenaten	45
4.7.4	Zelluläre Lokalisation von L1.1 27 Stunden nach der Befruchtung	45
4.7.5	Zelluläre Lokalisation von L1.1 3 Tage nach der Befruchtung	47
4.7.6	Immunfärbung von 5 dpf-Larven mit einem polyklonalen Antiserum gegen L1. 47	.1
48 Fun	ktionelle Analyse von L1 1 und L1 2	48
481	Funktion von L1 1 und L1 2 bei der Faszikulierung der posterioren Kommissur	48
4.8.2	Funktion von L1.1 und L1.2 bei der Wegfindung des Seitenliniennervs	51
4.8.3	Funktion von L1.1 und L1.2 beim Auswachsen von Motoraxonen	53
4.8.4	Expression und immunhistochemische Untersuchung von L1.1- bzw. L1.2-	
Fusionsp	roteinen in CHO-Zellen	55
4.9 Übe	rexpression von neuralen Zellerkennungsmolekülen im Zebrafisch	59
5 DISKI	JSSION	60
5.1 Das	Expressionsmuster von F3 während der larvalen Entwicklung	60

5.2	Mögliche Beteiligung von CLIM-Cofaktoren an der Regulation von F3	60
5.3	F3 Expression während der Regeneration	61
5.4	Die Funktionen von L1.1 und L1.2 beim axonalen Wachstum	62
5.5	Effektivität von Morpholinos	65
5.6	Überexpression von L1.1, L1.2 und F3	66
5.7	Qualität der polyklonalen Antiseren	67
6	LITERATURVERZEICHNIS	69
7	ANHANG	80

1 Einleitung

1.1 Neurale Zelladhäsionsmoleküle

Neurale Zelladhäsionsmoleküle sind an Interaktionen neuronaler Zellen mit ihrer Umgebung beteiligt. Vier Gruppen sind besonders gut beschrieben: Integrine (Hynes, 1992;Reichardt and Tomaselli, 1991), kalziumabhängige Cadherine (Kemler and Ozawa, 1989;Takeichi, 1991), Moleküle der extrazellulären Matrix (Reichardt and Tomaselli, 1991;Sanes, 1989), die auch von nicht neuronalen Zellen exprimiert werden und Zelloberflächen-Glykoproteine der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie (Brümmendorf and Rathjen, 1993;Williams and Barclay, 1988;Williams et al., 1994).

1.2 Die Immunglobulin-Superfamilie

Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind Proteine unterschiedlicher Struktur, es verbindet sie jedoch der Besitz von Immunglobulindomänen. Antikörper (Edelman et al., 1969) und MHC-Antigene (Orr et al., 1979) sind die ursprünglichen Vertreter dieser Familie. Viele Immunglobulin-Moleküle des Immunsystems sind an Zell-Zell-Erkennungsprozessen beteiligt (Springer, 1990).

Die Ig-Proteine des Nervensystems enthalten darüber hinaus weitere Strukturmerkmale, die sich innerhalb ihrer Polypeptidketten wiederholen. Dazu gehören Fibronektindomänen des Typs-(III). Erstmals beschrieben wurde dieses Motiv als ein aus 90 Aminosäuren bestehendes Modul im extrazellulären Matrixmolekül Fibronektin (FN) (Kornblihtt et al., 1985), später wurden Fibronektin Typ-(III)-Domänen auch in anderen ECM-Molekülen entdeckt (Engel, 1991). Fibronektindomänen sind an Zell-ECM-Interaktionen beteiligt (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Untersuchungen an den ECM-Molekülen Tenascin-C und Tenascin-R zeigten, dass FN-Typ-(III)-Domänen weitere Funktionen, wie z.B. die Förderung des Neuritenwachstums, vermitteln können (Dorries et al., 1996;Xiao et al., 1996). Je nach der Anzahl und der Anordnung ihrer Proteindomänen, können die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie in verschieden Subfamilien klassifiziert werden, wie z. B. die L1-Subfamilie, die Contactin/TAG-1-, oder die NCAM-Subfamilie (Hortsch, 2000). Die Namen dieser Subfamilien sind von prominenten Vertretern abgeleitet worden.

1.3 Das neurale Zelladhäsionsmolekül F3/F11/Contactin

Das neurale Glykoprotein F3/F11/Contactin gehört aufgrund seiner Proteinstruktur zur Immunglobulin-Superfamilie der Zellerkennungsmoleküle und besteht aus sechs Ig-Domänen am N-terminalen Ende und vier Fibronektin Typ-(III)-Domänen. F3/F11/Contactin ist über einen Glykosylphophatidylinositol-(GPI)-Anker mit der Zellmembran assoziiert und wird daher der Contactin/TAG-1-Subfamilie zugeordnet (Hortsch, 2000;Wolff et al., 1989). Das Protein wird von Neuronen und Gliazellen exprimiert (Brümmendorf et al., 1989;Gennarini et al., 1989;Ranscht, 1988;Wolff et al., 1989). In neuralen Zellen ist das Protein entweder auf Axonen lokalisiert, oder wird in einer löslichen Form in die Zellumgebung freigesetzt (Durbec et al., 1992;Gennarini et al., 1989). Während der Phase des axonalen Wachstums ist die Expression von F3/F11/Contactin am höchsten. In der Maus erreicht die Expression der entsprechenden mRNA während der zweiten postnatalen Woche ihr Maximum und nimmt im Verlauf der weiteren Entwicklung stetig ab (Gennarini et al., 1989). F3/F11/Contactin interagiert homophil, aber auch heterophil mit einer Vielzahl von neuronalen, glialen und ECM-Molekülen, *in vitro*. Je nach Interaktionspartner ist das Protein an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt. Deletionsstudien in der Maus ließen auf eine Rolle von F3/F11/Contactin bei der Regulation des axonalen Wachstums (Berglund et al., 1999) und der Myelinisierung von Axonen (Boyle et al., 2001) *in vivo* schließen. Studien durch Blockierung der Proteinsynthese von Contactin in Xenopus zeigten eine Korrelation zwischen dem Fehlen des Proteins und der abnormalen Entwicklung neuronaler Zellen im Rückenmark (Fujita et al., 2000). Dabei handelte es sich im Einzelnen um eine wachstumshemmende Wirkung auf Neuriten der Rohon-Beard-Zellen, oder um eine Defaszikulierung ihrer peripheren Axontrakte.

In vitro fördern homophile Interaktionen die Zelladhäsion und das Neuritenwachstum (Gennarini et al., 1991). Heterophile Interaktionen mit Ng-CAM (Brümmendorf et al., 1993), Nr-CAM/Bravo (Morales et al., 1993) und TAG-1 (Buttiglione et al., 1998) begünstigen diese Prozesse ebenfalls. Die Bindung an das ECM-Molekül Tenascin-R wirkt sich dagegen hemmend auf das Neuritenwachstum aus und fördert zudem die Defaszikulierung von Axonen (Pesheva et al., 1993;Xiao et al., 1996;Xiao et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass F3/F11/Contactin *in vitro* zusammen mit L1 und Fyn Kinase in einem Proteinkomplex vorliegt (Olive et al., 1995). Ob und welche funktionelle Bedeutung dieser Komplex jedoch hat ist bisher nicht bekannt.

F3/F11/Contactin unterliegt einer komplexen Regulation. Die Expression des Gens erfolgt in einer neuronenspezifischen Weise und ist darüber hinaus abhängig vom

Entwicklungsstadium. Es wurden drei alternative Promotorregionen in der regulatorischen Region des Mausgens identifiziert, deren Gebrauch sich zwischen zentralem und peripherem Nervensystem unterscheidet. Darüber hinaus liegen bis zu elf Spleißvarianten vor, die wiederum in Abhängigkeit zum gewählten Promotor stehen und post-transkriptionelle Regulationsmechanismen vermuten lassen. Die streng regulierte, differentielle Genexpression von F3/F11/Contactin liegt wahrscheinlich an der Wahl der alternativen Promotoren, an denen verschiedene Transkriptionsfaktoren binden können, und in den unterschiedlichen Spleißvarianten begründet (De Benedictis et al., 2001).

1.4 Die neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1 und L1.2

Die neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1 und L1.2 (Tongiorgi et al., 1995) des Zebrafisches sind mit L1-ähnlichen Molekülen aus Säugern verwandt und gehören damit zur L1-Subfamilie der Immunglobulin-Superfamilie. Die Mitglieder der L1-Subfamilie sind membranständige Glykoproteine (Moos et al., 1988) und sind an Zell-Zell-Interaktionen (Keilhauer et al., 1985) und Interaktionen mit der extrazellulären Matrix beteiligt. Sie zeichnen sich durch den Besitz von sechs N-terminalen Ig-Domänen, fünf Fibronektin Typ-(III)-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer hoch konservierten cytoplasmatischen Domäne am C-Terminus aus. L1-verwandte Moleküle sind aus Säugern (Adams et al., 1992, (Moos et al., 1988; Reid and Hemperly, 1992) (Schachner et al., 1990), Vögeln (Burgoon et al., 1991; Grumet et al., 1991; Volkmer et al., 1992), Fischen (Giordano et al., 1997; Tongiorgi et al., 1995; Vielmetter et al., 1991) und Wirbellosen (Bieber et al., 1989) bekannt. L1-verwandte Moleküle werden vornehmlich, aber nicht nur, von neuronalen Zellen während der Entwicklung des Nervensystems exprimiert (Hortsch, 1996). In verschiedenen Phasen der embryonalen und post-embryonalen Entwicklung exprimieren verschiedene Klassen von Neuronen und Gliazellen ein oder mehrere L1-verwandte Moleküle an ihrer Zelloberfläche (Moscoso and Sanes, 1995).

Alle L1-verwandten Moleküle sind stark homophile Ca²⁺-unabhängige Adhäsionsmoleküle. Homophile Interaktionen aktivieren in Neuronen die FGF-(*fibroblast growth factor*)-

Rezeptoren, die wiederum über eine Signalkaskade Neuritenwachstum induzieren (Hall et al., 1996; Walsh and Doherty, 1997; Williams et al., 1994). Aber auch heterophile Interaktionen mit anderen Zellerkennungsmolekülen und Molekülen der extrazellulären Matrix sind beschrieben worden (Brümmendorf et al., 1998; Grumet, 1997; Hortsch, 2000). L1-abhängiges Neuritenwachstum kann z.B. durch heterophile Interaktionen mit DM-GRASP (DeBernardo and Chang, 1996), F3/F11 (Morales et al., 1993) und axonin-1/TAG-1 (Felsenfeld et al., 1994; Malhotra et al., 1998) induziert werden, die ebenfalls Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind. L1-verwandte Moleküle sind darüber hinaus an der Faszikulierung von Axonen (Cervello et al., 1991; Fischer et al., 1986; Weiland et al., 1997), der axonalen Wegfindung (Brümmendorf et al., 1998;Hortsch, 1996) und Prozessen der Zellmigration (Asou et al., 1992;Lindner et al., 1983) beteiligt. Dem Kohlenhydrat HNK-1 wird eine Beteiligung an Protein-Protein- Interaktionen zugesprochen. HNK-1 wird von Zellerkennungsmolekülen und Molekülen der extrazellulären Matrix gebunden und wurde auf vielen Axonen während der Embryonalentwicklung nachgewiesen (Metcalfe et al., 1990;Schachner and Martini, 1995). Im Zebrafisch konnte darüber hinaus dem HNK-1-Kohlenhydrat eine Rolle bei der Axon-Faszikulierung und bei der axonalen Wegfindung nachgewiesen werden (Becker et al., 2001). Die L1-Homologe im Zebrafisch, L1.1 und L1.2, werden während der Embryonalentwicklung

von postmitotischen Neuronen exprimiert. Die Expression geht einher mit dem Beginn der Entwicklung des Nervensystems bei ca. 16 hpf. Viele Neuronen exprimieren sowohl L1.1 als auch L1.2 mRNA, dazu gehören die posteriore Kommissur (pc), die Epiphyse und frühe kommissurale Neuronen und Motoneuronen im Rückenmark. Dennoch unterscheiden sich die Expressionsmuster der beiden Gene geringfügig. Während alle Rohon-Beard-Zellen im Rückenmark L1.1 mRNA stark exprimieren, trifft dies im Falle von L1.2 nur auf eine Subpopulation dieser Zellen zu. Einige Rohon-Beard-Zellen scheinen sogar L1.2-negativ zu sein. Gleiches gilt auch für die olfaktorische Placode und das anteriore Seitenlinienganglion. Es wird darüber spekuliert, ob die subzelluläre Lokalisation von L1.1 und L1.2 in coexprimierenden Neuronen unterschiedlich ist (Tongiorgi et al., 1995). Nach einer Läsion des optischen Nerven im adulten Zebrafisch werden L1.1 und L1.2 von Retinaganglienzellen des lädierten Auges hochreguliert (Bernhardt et al., 1996). Die beiden Gene werden zwar während der Axonogenese in der Embryonalentwicklung von Retinaganglienzellen stark exprimiert, im adulten Zebrafisch ist jedoch die Expression von L1.1 und L1.2 stark reduziert. Interessanteweise geht mit der Regeneration des optischen Nerven auch eine gliale Expression von L1.1 und L1.2 im lädierten optischen Trakt einher (Bernhardt et al., 1996). Auch bei Regenerationsprozessen des Rückenmarks werden L1.1 und L1.2 in neuronenspezifischer Weise und in Abhängigkeit von der Entfernung der Läsionsstelle zum Soma der Nervenzellen unterschiedlich stark hochreguliert (Becker et al., 1998). Diese Befunde lassen vermuten, dass L1.1 und L1.2 an Prozessen der Regeneration des ZNS im Zebrafisch beteiligt sind.

1.5 CLIM/NLI/Ldb-Cofaktor als regulatorisches Protein während der Entwicklung

Die Embryonalentwicklung ist ein zeitlich und räumlich streng kontrollierter Prozess, der durch die aufeinander abgestimmte Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die während der Embryonalentwicklung einer Vielzahl von Organismen wirken, sind die LIM-Homeodomänen-Proteine (LIM-hd) (Bach, 2000;Dawid and Chitnis, 2001;Hobert and Westphal, 2000). Die Mitglieder dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch den Besitz der LIM-Domäne aus, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. LIM-hd-Transkriptionsfaktoren sind nicht nur für die Entwicklung von bestimmten neuronalen Zellpopulationen erforderlich, wie z.B., Motoneuronen und Interneuronen (Jurata et al., 2000;Pfaff et al., 1996), sondern auch für andere neuronale und nicht neuronale Strukturen (Bach, 2000;Hobert and Westphal, 2000). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LIM-hd-Transkriptionsfaktoren an der Regulation der axonalen Wegfindung beteiligt sind (Kania et al., 2000;Sharma et al., 1998;Thor et al., 1999).

Die Proteine CLIM1/Ldb2 und CLIM2/NLI/Ldb1/Chip gehören zur Familie der CLIM-Transkriptionscofaktoren und binden als Homodimere an die LIM-Domäne der LIM-hd-Transkriptionsfaktoren (Agulnick et al., 1996;Bach et al., 1997;Jurata et al., 1996;Kania et al., 2000;Morcillo et al., 1997). In Abhängigkeit vom jeweiligen Promotor kann der Komplex aus CLIM-Cofaktor und einem LIM-hd-Transkriptionsfaktor entweder die Expression des entsprechenden Gens induzieren (Bach et al., 1997;Mochizuki et al., 2000), oder aber inhibierend wirken (Jurata and Gill, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung der CLIM-Cofaktoren für einige Eigenschaften der LIM-hd-Transkriptionsfaktoren erforderlich ist, und dass der intrazelluläre CLIM-Level eine wichtige Rolle bei der Aktivität von LIM-hd-Transkriptionsfaktoren spielt (Agulnick et al., 1996;Bach et al., 1999;Jurata and Gill, 1997;Milan and Cohen, 1999;Morcillo et al., 1997;Rincon-Limas et al., 2000;van Meyel et al., 1999;van Meyel et al., 2000).

1.6 Der Zebrafisch (Danio rerio)

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein Vertreter aus der Familie der Weißfische (Cyprinidae) in der Ordnung der Karpfenartigen (Cypriniformes) und zählt damit zur Klasse der Knochenfische (Osteichthyes) und zum Unterstamm der Wirbeltiere (Vertebraten). Zebrafische sind tropische Süßwasserbewohner mit Verbreitungsgebieten in Indien, Pakistan, Nepal und Südostasien.

Der Zebrafisch stellt für genetische und entwicklungsbiologische Untersuchungen aus mehreren Gründen ein sehr geeignetes Modellsystem dar: Zebrafisch-Embryonen sind durchsichtig, dadurch kann die Entwicklung von Organen und Geweben direkt am lebenden Embryo beobachtet werden. Speziell für neurobiologische Untersuchungen sind Zebrafische sehr nützlich, da einzelne Neuronen im sich entwickelnden Nervensystem identifiziert werden können. Die Entwicklung des Nervensystems setzt bei Zebrafischen ca. 16 Stunden nach der Befruchtung ein. Sie entwickeln sich relativ zügig, innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Befruchtung sind im wesentlichen alle Organe angelegt. Die Entwicklung erfolgt außerhalb des Muttertieres, so dass Pertubationen im frisch befruchteten Ei bzw. einige Stunden nach der Befruchtung vorgenommen werden können. Die Zebrafisch-Larve schlüpft bereits nach drei Tagen und erreicht ihre Geschlechtsreife nach drei bis vier Monaten. Zu diesem Zeitpunkt hat der Zebrafisch eine Größe von zwei bis drei Zentimetern erreicht. Zebrafische vermehren sind ganzjährig und liefern eine hohe Zahl an Nachkommen (bis zu ca. 300 Eier pro Woche). Darüber hinaus sind Zebrafische einfach zu handhaben. Das Genom des Zebrafisches umfasst ca. $1,7 \ge 10^9$ bp und ist auf 25 Chromosomen verteilt. Die vollständige Sequenz des Zebrafisch-Genoms soll im Jahr 2003 vorliegen. Es sind bereits eine Anzahl von Genen beschrieben worden, die in doppelter Ausführung im Zebrafisch-Genom vorliegen (Gates et al., 1999;Postlewait et al., 2000;Robinson-Rechavi et al., 2001; Taylor et al., 2001b; Woods et al., 2000). Aus diesem Grund, wird von einer Genduplikation in Teilen des Genoms ausgegangen, die bereits früh in der Evolution stattgefunden haben muß (Aparicio, 2000;Kappen, 2000;Taylor et al., 2001a;Wittbrodt et al., 1998).

Fische und Amphibien sind in der Lage, Läsionen im ZNS spontan zu regenerieren (Gaze, 1970; Jacobson, 1993; Stuermer, 1988). Diese Besonderheit wird am eindrucksvollsten bei der Wiederherstellung der Sehfähigkeit nach einer Läsion des optischen Nerven deutlich (Gaze, R. M., 1970 The formation of nerve connections). Als Folge einer Läsion des ZNS setzt in den lädierten Neuronen eine Änderung des transkriptionellen Programms ein, bei der die RNA- und Proteinsynthese erhöht wird (Barron et al., 1985;McQuarrie and Grafstein, 1982). Bisher gibt es nur wenige Befunde über Faktoren, die bei der Regulation der Genexpression in lädierten Neuronen eine Rolle spielen (Herdegen et al., 1993). Allerdings konnten bereits Gene identifiziert werden, die in lädierten Neuronen hochreguliert werden. So korreliert das Ausmaß der GAP-43-Expression (growth associated protein 43) mit der Regenerationsfähigkeit lädierter Axone (Becker et al., 1998). Weitere Untersuchungen konzentrieren sich auf neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, die bei Prozessen des axonalen Wachstums, der Faszikulierung von Axonen und bei der Wegfindung von Axonen beteiligt sind (Becker et al., 1998;Bernhardt et al., 1996;Giordano et al., 1997; Paschke et al., 1992; Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Diese Untersuchungen zeigten, dass die Fähigkeit neurale Zelladhäsionsmoleküle nach einer Läsion verstärkt zu synthetisieren einhergeht mit einer erfolgreichen Regeneration. Somit eignet sich der Zebrafisch als Modellsystem zur Untersuchung von zellulären und molekularen Mechanismen, die einer erfolgreichen axonalen Regeneration zugrunde liegen. Eine Läsion des optischen Nerven führt bei Fischen nicht zu einer Degeneration der Retinaganglienzellen (RGC) (Meyer et al., 1985). Lädierte RGC-Axone wachsen wieder aus und projezieren zum optischen Tektum. Untersuchungen am Goldfisch führten zu einer Einteilung der Regeneration von RGC-Axonen in zwei Phasen: in der frühen Phase wachsen die Axone wieder zum optischen Tektum und bilden Synapsen aus. Diese Phase hält beim adulten Goldfisch ca. 30 Tage an. In der späten Phase (1-3 Monate nach der Läsion) werden die Zielregionen im optischen Tektum für die regenerierten RGC-Axone definiert, sodass die ursprüngliche Retinotropie annähernd genau wiederhergestellt wird. Während der Wiederherstellung der optischen Projektion erfolgt eine zeitlich und räumlich regulierte verstärkte Expression von Genen, die der Immunglobulin-Superfamilie zuzuordnen sind, wie an Beispielen des Zebrafisches und des Goldfisches gezeigt werden konnte. Zu ihnen gehören L1.1 und L1.2, sowie N-CAM (Bernhardt et al., 1996) im Zebrafisch, sowie im Goldfisch das L1-Ortholog E587 (Vielmetter et al., 1991), N-CAM (Bastmeyer et al., 1990) und Neurolin/DM-GRASP (Laessing et al., 1994; Paschke et al., 1992). Der Zebrafisch eignet sich ebenfalls als System für Untersuchungen bei der Regeneration des Rückenmarks. Nach einer Rückenmarksläsion sind Fische weitgehend unbeweglich. Bereits nach drei bis vier Wochen sind sie wieder in der Lage, ihre Rücken- und Schwanzflossen zu bewegen, und gewinnen allmählich ihre Schwimmfähigkeit zurück (Bernstein, 1964) (Bernstein, 1988;Coggeshall et al., 1982;Coggeshall and Youngblood, 1983). Anatomische Studien zeigten, dass nach einer Rückenmarksläsion gewisse Neuronenpopulationen vollständig regenerieren, während andere nur bedingt oder gar nicht dazu befähigt sind (Becker et al., 1997;Becker et al., 1998;Bunt and Fill-Moebs, 1984;Sharma et al., 1993;Zottoli et al., 1994). Im Zebrafisch sind es vor allem Neuronen im Nukleus des medialen longitudinalen Faszikels (NMLF), in der intermediären retikularen Formation (IRF) und im magnozellularen oktavalen Nukleus (MaON), die ihre Axone nach einer

Rückenmarksläsion erfolgreich regenerieren können. Bei ca. 50% der Neuronen in diesen Nuklei ist erneutes axonales Wachstum zu beobachten. Dagegen regenerieren nur 10-20% der Neuronen des Nukleus *ruber*, des Nukleus des lateralen Lemniscus und der Mauthner-Zellen ihre Axone (Becker et al., 1997;Becker et al., 1998). Auch bei der Regeneration spinaler Neurone sind neurale Zellerkennungsmoleküle wie L1.1, L1.2, N-CAM in neuronenspezifischer Weise beteiligt.

Becker *et al.* (1998) stellen darüber hinaus in ihren Untersuchungen fest, dass sich zwei Klassen von regenerierenden Neuronen im Rückenmark unterscheiden lassen: (1) Neuronen, die ihre Axone unabhängig von der Lage der Läsionsstelle regenerieren können und (2) Neuronen, die ihre Axone nur dann regenerieren können, wenn die Läsionsstelle sich in der Nähe des Zellsomas befindet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Vergleich zum retinotektalen System das Wiederauswachsen der Axone im Rückenmark weniger effizient ist (Bernhardt, 1999).

1.8 Morpholinos

Antisense-Oligonukleotide werden eingesetzt, um die Synthese der zu untersuchenden Proteine spezifisch zu blockieren. Sie finden nicht nur zur Untersuchung von Genfunktionen ihren Einsatz, sondern sollen künftig möglichst als Therapeutika eingesetzt werden (Summerton and Weller, 1997).

Antisense-Oligonukleotide der ersten Generation waren natürlichen Ursprungs (RNA, ssDNA). Im Laufe der Zeit entwickelte man eine Reihe von Oligonukleotiden, die nicht natürlichen Ursprungs waren und gewisse Modifikationen enthielten (Summerton and Weller, 1997). Dabei handelte es sich um Modifikationen des Riboserestes, oder des

Phosphatrückrats. Diese Modifikationen begünstigten die Stabilität oder die Löslichkeit Oligonukleotide, da sie eine gewisse Lebensdauer benötigen, die es ihnen ermöglicht über mehrere Stunden in der extrazellulären Matrix und in der Zelle intakt zu bleiben, bis sie an ihren Wirkungsort gelangen und ihre Funktion ausüben können. Aber obwohl diese weiterentwickelten *antisense*-Oligonukleotide die eine oder andere Verbesserung aufwiesen, gab es keines, das komplett zufriedenstellend war.

Erst mit der Morpholino-Oligostruktur wurde ein antisense-Oligonukleotid geschaffen, das eine hohe Effizienz, Spezifität, Löslichkeit und eine hohe Resistenz gegen Nukleasen aufweisen konnte. Diese Struktur beinhaltete den Austausch zweier schwacher Nukleophile (die 2'- und die 3'-Hydroxylgruppe der Riboseinheit) durch ein starkes Nukleophil (das N-Atom des Morpholinrestes) und die Umwandlung des Phosphats in ein Phosphodiamidat. Ausgangsmaterial für die Herstellung von Morpholinos ist RNA, die aus speziellen RNAausscheidenden Hefestämmen gewonnen wird. Der Riboserest wird zunächst in einer Drei-Schritt-Reaktion zu einem Morpholinrest umgewandelt. Das N-Atom an der Phosphatgruppe (nicht-ionische Phosphodiamidat-Bindung) trägt zu einer hohen RNA-Bindungsaffinität bei, sie ist höher als die von DNA und anderen Resten zu RNA (Summerton and Weller, 1997). Morpholinos sind gegen eine große Bandbreite an Nukleasen resistent: DNase I und II, RNase A und T1, Nuklease P1, Phosphodiesterase u.a.. Sie wirken spezifischer als vorherige antisense-Oligonukleotide, weil ihr Wirkungsmechanismus nicht RNase H-abhängig ist: DNA und S-DNA-Oligonukleotide binden an RNA und aktivieren damit RNase H, die spezifisch RNA degradiert. Die DNA bzw. S-DNA sucht dann erneut nach einer komplementären Sequenz.

Das Spezifitätsproblem im Falle von DNA und S-DNA entsteht, weil bereits fünf aufeinanderfolgende Basenpaarungen ausreichen, um von RNase H erkannt und gespalten zu werden. Teilweise komplementäre Abschnitte werden somit auch degradiert. Dieses Problem ist im Falle von Morpholinos zumindest unerheblich, da Morpholinos RNase H unabhängig wirken. Sie blockieren lediglich die Translation, eine Degradation der mRNA ist nicht erforderlich. Man spricht daher von einem *knockdown*, da lediglich die Proteinsynthese blockiert wird. Ein weiterer Faktor, der die Spezifität von Morpholinos erhöht ist, dass sie viel weniger Zielsequenzen haben als DNA oder S-DNA: RNase H-unabhängige *antisense*-Oligonukleotide blockieren nur dann effizient die Translation, wenn sie an regulatorische

Bereiche am 5'-Ende der mRNA binden. Dadurch reduziert sich die Zahl an Zielsequenzen auf 2-5% der Sequenz im gesamten mRNA-Pool (Summerton and Weller, 1997). Vermutlich sind die Ribosomen während der ATP-abhängigen Translokation eher in der Lage *antisense*-Oligonukleotide auf der codierenden Region der mRNA zu verdrängen, als auf der 5'regulatorischen Region (Summerton and Weller, 1997). Dort liegt erst die 40S-Unterheit der Ribosomen auf der mRNA vor, sie durchsucht das Transkript nach dem Startcodon, wo das komplette Ribosom zusammengebaut wird.

In ersten Versuchen wurden bereits bekannte mutante Phänotypen des Zebrafisches kopiert, indem Morpholinos gegen die entsprechenden mRNAs in frisch befruchtete Zebrafischeier injiziert wurden (Nasevicius and Ekker, 2000). Diese ersten Experimente lieferten vielversprechende Resultate, so dass innerhalb kürzester Zeit eine Fülle von Genfunktionen auf die gleiche Weise untersucht wurde (Brent and Drapeau, 2002;McClintock et al., 2002;Nasevicius et al., 2000;van der Sar et al., 2002;Yang et al., 2001)

Allerdings sind bereits auch unspezifische Phänotypen an Morpholino behandelten Systemen beschrieben worden (Nasevicius and Ekker, 2000). Diese unspezifischen Effekte treten mit einer Häufigkeit von 18% auf und sind dosisabhängig oder entstehen durch fehlerhafte Hybridisierung der Morpholinos an nur teilweise komplementäre Sequenzabschnitte (Ekker and Larson, 2001).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, sich die Eigenschaften dieser neuen *antisense*-Oligonukleotide zu Nutze zu machen, um damit zügig eine funktionelle Analyse der neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1, L1.2 und F3/F11/Contactin durchzuführen. Durch die Kombination von verschiedenen genspezifischen Morpholinos lassen sich zudem mögliche Effekte bei der gleichzeitigen Blockierung zweier Gene untersuchen.

2 Material

2.1 Puffer, Lösungen

Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Aqua_{demin} angesetzt. Die mit * versehenen Puffer wurden 20 min bei 120^{0} C (1 bar) autoklaviert.

10% (w/v) APS Blockpuffer für Immunfärbungen

DAB-Stammlösung 1 x Danieau Lösung

0,1% (v/v) DEPC-H₂O

0,5 M EDTA Ethidiumbromid-Stammlösung 0,5 μg/ml Ethidiumbromid-Lösung Extraktionspuffer

Färbelösung für *in situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten

0,5 M Ferrocyanid 0,5 M Ferricyanid 5 x FGRB

Formaldehyd Gel Loading Buffer

10 x Grundmix

Homogenisierungspuffer

50 mM HEPES, pH 7,6 Hybridisierungsmix

HB4 Hybridisierungspuffer

0,5 g APS ad 5 ml 1% (v/v) DMSO, 1% (v/v) normal goat serum, 1% (w/v) BSA, 0.7% (v/v) Triton-X 100 0,5 mg Diaminobenzidin ad 5 ml 58 mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,4 mM MgSO₄, 0,6 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM HEPES, pH 7,6 1 ml Diethylpyrocarbonat ad 1 l, ü.N. rühren * 73,06 g ad 500 ml * 10 mg/ml0,02 ml der Stammlösung in 400 ml 25 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 Tablette CompleteTM Proteasen – Inhibitoren-Cocktail, in 50 ml 33,5 µl NBT (100 mg/ml in Dimethylformamid, 70% (v/v), 33,5 µl X-Phosphatlösung (50 mg ml in Dimethylformamid), 10 ml Puffer 3, 2,5 mg Levamisol (Sigma) 6,6 g ad 30 ml * 4,9 g ad 30 ml * 0,1 M MOPS, pH 7, 40 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA, pH 8 * 50% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, pH 8, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol FF 2 ml 1 M Tris, pH 7,5, 200 µl 0,5 M EDTA, 2 ml 50 x Denhardt's solution (Sigma), 2 ml tRNA, (25 mg/ml, Boehringer) 1 ml poly-(A)-RNA (10 mg/ml), 2,8 ml DEPC-H₂O 25 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA 1,19 g ad 100 ml, steril filtrieren 25 ml 100% (v/v) Formamid, 5 ml 10 x Grundmix, 3,33 ml 5 M NaCl, 2,5 ml M DTT, 4,17 ml DEPC-H₂O, 10 ml Dextransulfat 50% (v/v) Formamid, 5 x SSC, 50μ g/ml Heparin, 0,1% (v/v) Tween 20, 5 mg/ml Hefe-RNA

4 M LiCl 0,5 M MgCl₂ 0,5 M MOPS 3 M Na-Acetat 5 M NaCl 50 mM Na-Acetat 4% (w/v) Paraformaldehyd

10 x PBS (Biochemie)

10 x PBS (Morphologie)

PBST Puffer 1 Puffer 2

Puffer 3

10 x Ponceaurot-Stammlösung

2 x Probenpuffer

5% (w/v) Rhodamindextran 10% (w/v) SDS 20 x SSC 2 x SSCT 0,2 x SSCT Stopp- und Beladelösung

50 x TAE TE-Puffer 10 x Transferpuffer für Western Blot X–Gal–Färbelösung

16,96 g ad 100 ml DEPC-H₂O * 10,17 g ad 100 ml * 10,46 g ad 100 ml, pH 6,8 * 49,22 g ad 200 ml * 73,05 g ad 250 ml * 2,05 g ad 500ml * 4 g Paraformaldehyd bei 60^oC in 30 ml lösen, 2 Tropfen 1 M NaOH, 10 ml 10 x PBS (Morphologie), ad 100 ml Aquademin, steril filtrieren (eine Woche haltbar bei $4^{0}C$ 1,5 M NaCl, 81 mM Na₂HPO₄, 17,39 mM NaH₂PO₄, pH 7,5 * 1,36 mM NaCl, 0,1 M Na₂HPO₄ 27 mM KCl, 18 mM KH₂PO₄ * 1 x PBS/0,1% (v/v) Tween 20 100 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 1% (w/v) Blocking Reagent (Boehringer), 0,5% (w/v) BSA, bei 60° C in Puffer 1 lösen 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5 2 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure, 30 g Sulfosalicylsäure ad 10 ml 2,5 ml 0,5 mM Tris, 4 ml 10% (w/v) SDS, 2 ml Glycerin, 0,2 ml β-Mercaptoethanol, 0,2 mg Bromphenolblau, ad 10 ml 50 mg Rhodamindextran (MW=10000) 5 g Natriumdodecylsulfat ad 50 ml * 3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat, pH 7 * 2 x SSC/0,1% (v/v) Tween 20 0,2 x SSC/0,1% (v/v) Tween 20 1,25 g Ficoll 400 in 1,5 ml Aquademin lösen, 0,0125 g Bromphenolblau, 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8), ad 5 ml 2 M Tris, 50 mM EDTA, 5,7% Essigsäure 10 mM Tris. 1 mM EDTA * 146 g/l Tris, 60 g/l Glycin 10 ml 10 x PBS, 10 ml 50 mM Ferricyanid, 10 ml 50 mM Ferrocyanid, 0,2 ml 1 M MgCl₂, 70 ml H₂O

2.2 Nährmedien

LB-Agar LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

GMEM

15 g/l Agar (GIBCO BRL) in LB-Medium 10 g /l Peptone 140 (GIBCO BRL), 5 g/l Hefeextrakt (GIBCO BRL), 10 g/l NaCl, pH 7–7,4 400 ml Aqua_{bidest}, 50 ml 10 x GMEM, 18,1 ml Natriumbicarbonat, 5 ml NEAA, 5 ml G+A, 5 ml Na-Pyruvat, 10 ml Nucleoside, 50 ml dialysiertes FCS, 5 ml Pen/Strep

2.3 Antibiotika

Ampicilin-Stammlösung	100 mg/ml
Kanamycin-Stammlösung	25 mg/ml

2.4 Vektoren

pBluescript KS+, universeller Klonierungsvektor	Stratagene, Amsterdam, NL
pBluescript SK+, universeller Klonierungsvektor	Stratagene
pCR [®] -Blunt II-TOPO [®] , Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pcDNA3, eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen
pDrive Cloning Vektor, Klonierungsvektor für PCR-Produkte	QIAGEN, Hilden, DE
pEGFP-N1, eukaryotischer Expressionsvektor	Clonetech, Palo Alto, USA
pCS2+,eukaryotischer Expressionsvektor	Labor Rupp, Tübingen
pCS2+MT, eukaryotischer Expressionsvektor	Labor Rupp
pCS2+nβgal, eukaryotischer Expressionsvektor für	
kernlokalisierte β-Galactosidase	Labor Rupp
#73,	
enthält den gesamten ORF des L1.1 Gens in pBluescript KS+	Labor Schachner
L1.1Myc,	
Expressionsvektor für L1.1	diese Arbeit
L1.1EGFP,	
Expressionsvektor für L1.1	diese Arbeit
Clone XII,	
enthält den gesamten ORF des L1.2 Gens in pBluescript SK+	Labor Schachner
L1.2Myc,	
Expressionsvektor für L1.2	diese Arbeit
F3/Blunt II,	
enthält den gesamten ORF des isolierten F3 Gens	diese Arbeit
F3Myc,	.
Expressionsvektor für F3	diese Arbeit

2.5 Kits

BCA Protein Assay Kit ECL Western Blotting Detection Reagents FirstChoiceTM RLM-RACE Kit GFXTM Micro Plasmid Prep Kit High Pure PCR Product Purification Kit LipofectAMINE PLUSTM Reagent Kit MEGAScript TM SP6, T7 und T3 Kits mMessage mMachine KitTM MinElute Gel Extraction Kit Omniscript RT Kit ProbeQuantTM G-50-Säulen **QIAGEN PCR Cloning Kit** QIAGEN Plasmid Midi Kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit QIAquick Gel Extraction Kit Rapid DNA Ligation Kit RNeasy Midi Kit Seamless[®] Cloning Kit Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit

Pierce, Rockford, USA Amersham Pharmacia, Freiburg, DE Ambion, Huntingdon, UK Amersham Pharmacia Roche, Basel, CH Life Technologies Ambion Ambion **OIAGEN** QIAGEN Amersham Pharmacia **QIAGEN QIAGEN QIAGEN** QIAGEN Roche **QIAGEN** Stratagene Invitrogen

2.6 DNA-modifizierende Enzyme

Restriktionsenzyme und deren Puffer, sowie andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen AGS Hybaid, NEB Biolabs, oder Boehringer Mannheim erworben.

2.7 Referenzmoleküle

100-bp-Leiter 1-kb-Leiter	Life Technologies Life Technologies
Proteinmarker	
BenchMark Prestained Protein Ladder	Life Technologies

2.8 Andere Biochemikalien

Polysciences, Inc., Warrington, USA
Roche
Roche
Sigma, München, DE
Sigma
Roche
GIBCO BRL
SH Prod. Maastricht, NL
Amersham Pharmacia
Roche
Roche

RNasin TissueTec[®] Versene Perkin Elmer, Boston, USA Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL GIBCO BRL

2.9 Bakterienstämme

E. coli DH5 α *E. coli* NR 3704 (dam⁻) *E. coli* One Shot[®] TOP10 Chemicaly Competent

Labor Schachner Labor Schachner Invitrogen

2.10 Morpholinos

L1.MO1 L1.1MO2 L1.2MO1 L1.2MO2 F3MO1 F3MO2 Standard-Kontroll-Morpholino Standard-Kontroll-Morpholino (3'-Carboxy-Fluoreszein-markiert) ATGAAAACAGCCCCGACTCCAGACA AGGTGAATCTGTGTGTGTGGTCTGGA GCTGTTTTTGTGACGTGGCAGGCAT AACACAGCGGTGCAGGAAAGCCGTG GCCTCTGGAATCATGGCTTACAGCA GATCTTCAGACATCAGGATTGCCTG CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

2.11 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen Metabion und MWG Biotech synthetisiert.

2.12 Peptide

Folgende Polypeptide wurden von der Firma Eurogentec zur Immunisierung von Kaninchen synthetisiert:

L1.1: H₂N-CIDSALSPNRTKKLYN-CONH₂ L1.2: H₂N-VKDGVEFDPSKDPDLC-CONH₂

2.13 Antikörper

4C4 (Maus); Antikörper gegen Mikroglia GA 5 (Maus), Antikörper gegen GFAP Anti-Tubulin (Maus) Anti L1.1 (Kaninchen) Anti L1.1 (Kaninchen) Anti L1.2 (Kaninchen) Labor Scholes, London Sigma Sigma Labor Schachner Eurogentec, Seraing, BE Eurogentec

Sekundäre Antikörper gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2, Cy3) und HRP wurden von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen. Anti-DIG-AP Fab Fragmente wurden von der Firma Roche Diagnostics bezogen, der monoklonale FITC gekoppelte Anti-Myc-Antikörper 9E10 von der Firma Covance (Princeton, USA).

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien

Bakterien von verschiedenen *E. coli*-Stämmen wurden auf Agarplatten ausplattiert, die zur Selektion des reinen *E. coli*-Stammes entsprechende Antibiotika enthielten. Diese Platten wurden 20 Std bei 37^{0} C inkubiert und anschließend bis zu vier Wochen bei 4^{0} C gelagert. Um eine Stationärkultur anzuzüchten, wurden 5 ml Nährmedium plus Antibiotikum mit einer Einzelkolonie von einer Stammplatte in einem Reagenzglas angeimpft und 20 h bei 37^{0} C geschüttelt. Zur dauerhaften Lagerung der reinen plasmidtragenden Bakterienstämme wurde 1 ml einer Stationärkultur mit 400 µl einer sterilen 50%igen Glycerinlösung vermischt und bei -80^{0} C gelagert.

3.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α wurde mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Pro Transformation wurden 50 ng Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten Zellen pipettiert. Die Ansätze wurden dann 30 min im Eisbad inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 1 min auf 42^oC erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Jeder Ansatz wurde mit 1 ml LB-Ampicilin-Medium aufgefüllt und zum Wachstum transformierter Zellen 30 min bei 37^oC inkubiert. Nach der Inkubation wurden 50 µl der Ansätze abgenommen und zu 300 µl vorgelegtem LB-Ampicilin-Medium pipettiert. Das gesamte Volumen wurde auf eine LB-Ampicilin-Platte ausgespatelt und 20 Std bei 37^oC inkubiert.

3.1.3 Plasmid-Isolierung

Die Plasmide aus den über-Nacht-Kulturen wurden mit dem GFX Micro Plasmid Präparationskit von Amersham Pharmacia für Minipräparationen, bzw. mit den Midi- und Maxi-Kits von Qiagen für größere Präparationen laut Protokoll der Hersteller isoliert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonucleasen sind in der Lage, relativ kurze spezifische Sequenzen in der DNA zu erkennen und diese an bestimmten Stellen zu schneiden. Die Schnittstelle eines Restriktionsenzyms liegt oft abseits der Erkennungsstelle, in manchen Fällen jedoch sind Erkennungs- und Schnittstelle identisch. Oft weisen die Schnittstellen einer Restriktionsendonuklease eine zweifache Rotationssymetrie auf und werden daher als Palindrome bezeichnet.

Für einen DNA-Verdau ist die einzusetzende Menge an Restriktionsenzym von der Anzahl an Schnittstellen pro μ g DNA abhängig. Die Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben. Per Definition ist 1 Unit die Enzymmenge, die ausreicht, um in einer Minute 1 μ mol Substrat umzusetzen.

In dieser Arbeit wurden 0,3 bis1,0 µg Plasmid-DNA für 20 µl-Ansätze eingesetzt. Die Restriktionsverdaue wurden mindestens 2 Std bei der für das entsprechende Enzym notwendigen Temperatur inkubiert.

0,3 bis1,0 μg Plasmid-DNA 2 λ 10 x Restriktionspuffer 10 bis 20 U Restriktionsenzym H₂O ad 20 μl

3.2.2 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die PCR-Technik dient zur in-vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen ausgehend von einem DNA-template. Diese Amplifikation gliedert sich in drei sich wiederholende Schritte. Beginnend mit dem Denaturierungsschritt werden die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix voneinander getrennt. Dies erfolgt bei einer hohen Temperatur. Die Trennung ist notwendig, damit zwei spezifische Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär zum jeweiligen 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ist, in der anschließenden Annäherungsphase (Annealing) an die template-DNA binden können. Die spezifische Oligonukleotid-Bindung wird durch Absenken der Temperatur erreicht, wobei die optimale Annealing-Temperatur von der Länge der Nukleotide und ihrem AT/GC-Verhältnis abhängig ist. In einem Polymerisationsschritt werden ausgehend von den gebundenen Oligonukleotiden die komplementären Einzelstränge durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei 72[°]C synthetisiert. Durch Wiederholung des Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Polymerisation wird der spezifische DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert. Das Temperatur- und Zeitprofil der einzelnen Schritte ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, sowie von der Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide und muss dementsprechend variiert werden.

In dieser Arbeit wurde das HotStar Taq PCR System, oder das HotStar Taq Master Mix Kit von Qiagen zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen verwendet. Letzteres vereinfacht die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes, indem es die einzelnen Komponenten in einem Grundmix vereinigt. Ein typischer PCR-Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

	Endkonz.	Vol. (µl)
DNA (5-100 ng)		1
5' Primer	25 pmol	2,5
3' Primer	25 pmol	2,5
dNTP Mix (je 10 mM)	0,2 mM	4
10 x PCR-Puffer	1 x	5
MgCl ₂	0,75 mM	0,75
HotStar Taq DNA- Polymerase	2,5 u	0,5
H ₂ O		33,75

Bevor der erste Zyklus einsetzte, wurde die Polymerase 15 min bei 95⁰C aktiviert (*hot-start*-Prinzip).

- 1. 94° C, x min, Denaturieren
- 1. $x^{0}C$, x sek, Annealing
- 2. 72° C, x min, Polymerisation

Insgesamt wurden 40 Zyklen gefahren. Jeweils 1 µl der Reaktionsansätze wurden anschließend auf einem Agarosegel überprüft.

3.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion lassen sich Nukleinsäuren aufreinigen, da das Phenol Proteine und andere Verunreinigungen bindet. Das Chloroform dient wiederum zur Beseitigung des Phenols. Die Präparationen wurden dafür mit dem einfachen Volumen eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) versehen und kräftig geschüttelt. Durch 2minütige Zentrifugation bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge setzte sich die phenolhaltige Phase aufgrund ihrer höheren Dichte von der wäßrigen Phase, in der sich die Nukleinsäuren befanden, ab. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt. Zur Beseitigung des restlichen Phenols wurde das einfache Volumen an Chloroform dazugegeben und erneut nach kräftigem Mischen zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abermals abgenommen und in ein neues Eppendorgefäß überführt. Handelte es sich um DNA, so wurde diese durch die Zugabe des 2,5fachen Volumens an kaltem Ethanol und 1/10 des Volumens an 5 M Natriumacetat gefällt. Dafür wurden die Ansätze 30 min bei -80°C inkubiert und anschließend 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Falle von RNA erfolgte die Fällung mit dem einfachen Volumen an kaltem Isopropanol und 20minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und die Nukleinsäurepellets, nach 10minütigem Trocknen in einer Speed-Vac-Zentrifuge, mit H₂O (gegebenenfalls RNase-frei) resuspendiert.

3.2.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren an Glasvliessäulen

Eine alternative Methode zur Aufreinigung von Restriktionsansätzen oder PCR-Produkten stellt das High Pure PCR Product Purification Kit dar (Roche Diagnostics). Damit erfolgte die Aufreinigung innerhalb kürzester Zeit, ohne die Verwendung von Phenol oder Chloroform. Das Prozedere erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2.5 Spektrophotometrische Messung zur Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades von DNA und RNA

Nukleinsäurekonzentrationen lassen sich im Spektralphotometer bestimmen. DNA und RNA haben ein Extinktionsmaximum bei 260 nm. Eine A_{260} von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg dsDNA/ml bzw. 40 µg ssRNA/ml. Proteine haben dagegen ein Extinktionsmaximum bei 280 nm, absorbieren aber bei 260 nm immer noch UV-Licht. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt den Reinheitsgrad der DNA-Probe an. Liegt der Quotient bei 1,8-1,9, so liegt relativ reine DNA vor. Ein Quotient von < 1,7 bedeutet einen zu hohen Proteingehalt der Probe. Eine Reinigung kann in diesem Fall durch eine erneute Phenol/Chloroform-Extraktion erfolgen und anschließendem Zusatz von 0,1 M NaCl für die Präzipitation der DNA. Durch Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{230} wird der Gehalt an Polysaccharidgehalt zu hoch und kann aber unter Zugabe von 0,1 M NaCl und weiterem Waschen mit Ethanol verringert werden (Grimont und Grimont, 1991). RNA von ausreichender Reinheit liegt dagegen bei einem Quotienten von 1,8-2,0 vor (MEGAscript Handbuch).

Die photometrische Messung der DNA erfolgte in dieser Arbeit in einer Quarzküvette mit einem Photometer unter 1:20 Verdünnung der Proben in H₂O. Bei dieser Verdünnung ist die abgelesene Absorption gleichzeitig die Konzentration in $\mu g/\mu l$.

RNA wurde dagegen 1:25 in DEPC-H₂O verdünnt, da dann die abgelesene Absorption der Konzentration in $\mu g/\mu l$ entspricht.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse des Restriktionsmusters wurden stets 2 µl des Verdaus auf ein 1%iges horizontales Agarosegel aufgetragen. Der gesamte Restriktionsansatz wurde für die Gelextraktion von bestimmten Fragmenten aufgetragen. Bei PCR-Produkten reichte 1 µl des Reaktionsansatzes.

Die Proben wurden zu Beladung der DNA mit Stopp- und Beladelösung versehen und die Elektrophorese 1,5 Std bei 90 Volt durchgeführt. Anschließend wurde die aufgetrennte DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.7 Gelextraktion

Die DNA Fragmente aus den Restriktionsverdauen oder den PCR-Reaktionen wurden mit einem Skalpell aus den Gelen geschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel eluiert (s. QIAquick Gel Extraction Kit Protocol) und in 30 μ l 10 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert. 2 μ l wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.2.6) überprüft. Gelextraktionen, bei denen es darauf ankam, höhere DNA-Konzentrationen zu erzielen, wurden mit dem MinElute System von Qiagen durchgeführt.

3.2.8 Dephosphorylierung von DNA

An der zu liegierenden linearisierten Vektor-DNA mit komplementären (*sticky*) oder stumpfen (*blunt*) Enden wurde durch eine Dephosphorylierungsreaktion der 5'-terminale Phosphatrest entfernt, um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Die Restriktionsansätze wurden nach dem Verdau zur Inaktivierung des Restriktionsenzyms 5 min bei 70^oC erhitzt. Anschließend wurde 1 μ l *shrimp alkaline phosphatase* sowie 1/10 des Endvolumens *shrimp alkaline phosphatase*-Puffer zugefügt. Die Ansätze wurden 60 min bei 37^oC inkubiert. Nach 30 min wurde nochmals 1 μ l der Phosphatase hinzugefügt. Abschließend wurden die dephosphorylierten Fragmente gelextrahiert.

3.2.9 Ligation

Zu klonierende DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Roche Diagnostics) in die gewünschten Vektoren ligiert. Das Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA variierte dabei, entsprechend der Größe der zu klonierenden DNA-Fragmente. Insgesamt überstieg die Gesamtmenge an eingesetzter DNA aber nicht 200 ng. Die Ligationsansätze wurden 30 min bei RT inkubiert (s. Packungsbeilage Rapid DNA Ligation Kit).

3.2.10 Klonierung von DNA unabhängig von Restriktionsschnittstellen mit dem Seamless[®] Cloning Kit (Stratagene)

Konventionelle *blunt end-* oder *sticky end-*Ligationen basieren auf der Restriktion von DNA-Fragmenten und der Insertion der zu klonierenden DNA in die benutzte Restriktionsschnittstelle des Vektors. Oftmals ist es allerdings schwierig geeignete Restriktionsschnittstellen zu finden. In dieser Arbeit wurde ein Expressionsvektor für das F3 Gen konstruiert, bei dem aufgrund der teilweise nicht geeigneten Restriktionsschnittstellen eine Klonierungsstrategie gewählt werden musste, die unabhängig von der vorhandenen *multiple cloning site* war.

Das Seamless[®] Cloning Kit kombiniert die PCR mit den Eigenschaften des Restriktionsenzyms *Eam1104* I, das DNA außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet. Bei dieser Methode werden für die vorangehende PCR Primer benutzt, die die *Eam1104* I-Erkennungssequenz enthalten. Es wird durch die Wahl von geeigneten Primer-Paaren sowohl das zu klonierende DNA-Fragment als auch der Vektor amplifiziert. Das System erlaubt die Wahl der Primer in einer Weise, in der praktisch jedes Nukleotid als Klonierungsstelle benutzt werden kann, ohne dass eine Rasterschubmutation dabei entsteht. Die Reaktionsansätze und –bedingungen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt (s. Handbuch Seamless[®] Cloning Kit, Stratagene).

3.2.11 5'RACE PCR mit dem FirstChoiceTM RLM-RACE Kit (Ambion)

Für die Klonierung des vollständigen F3 Gens wurde das FirstChoiceTM RLM-RACE Kit von Ambion benutzt. Das fehlende 5'-Ende dieses Gens wurde bei dieser Methode in einer 2-Schritt PCR-Reaktion aus einer RNA-Population (Gehirn) amplifiziert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Ligation eines 45 bp langen Adapter-Primers (Ambion) an das 5'-Ende der mRNA-Moleküle. An diesen Adapter hybridisiert ein 5' RACE *outer* Primer (Ambion) der zusammen mit einem genspezifischen Primer in einer ersten PCR-Reaktion ein Amplifikat liefert. Theoretisch wird dabei das 5'-Ende des gewünschten Gens zu einem gewissen Maß amplifiziert und dient in einer zweiten PCR-Reaktion nunmehr als *template*. In der zweiten PCR-Reaktion werden ein *inner* Primer (Ambion) und ein zweiter genspezifischer Primer, die jeweils unmittelbar 3'wärts der erstbenutzten Primer liegen, benutzt, um das 5'-Ende des gewünschten Gens nochmals zu amplifizieren. Das Protokoll entspricht dem des Herstellers. Folgende Reaktionsbedingungen wurden eingestellt:

1. PCR

- 1. 95[°]C, 15 min
- 2. $94^{\circ}C$, 45 sek
- 3. 60° C, 45 sek
- 4. 72° C, 2 min
- 5. *GoTo* 2, 39 x
- 6. 72° C for 10 min
- 7. 4^{0} C for ever
- 8. end

Template:		2 µl
Primer1: 5' RACE Outer Primer	10 µM	1 µl
Primer2: F3race2	10 µM	1 µl
dNTP's:	10 µM	1 µl
Qiagen Puffer :	10 x	5 µl
H ₂ 0:		39,5 µl
Hot Star Taq Polymerase:		<u>0,5 µ</u> l
		50,0 µl

2.	PCR	, 2 An	ısätz	ze
	1	$05^{0}C$	15	min

1.95C, 15 mm		
2. $94^{\circ}C$, 45 sek		
3. 64^{0} C, 45 sek		
4. $72^{\circ}C$, 2 min		
5. <i>GoTo</i> 2, 39 x		
6. 72° C for 10 min		
7. 4^{0} C for ever		
8. end		
Tomplate: aug 1 PCP		1 ul (sowie 1:10 aug 1 PCP)
Tempiale. aus 1. FCK		$1 \mu I (Sowie 1.10 aus 1. FCK)$
Primer1: 5' RACE Inner Primer	10 µM	1 µl
Primer2: F3race1	10 µM	1 µl
dNTP's:	10 µM	1 µl
Qiagen Puffer :	10 x	5 µl
H ₂ 0:		39,5 μl
Hot Star Taq Polymerase:		0,5 µl
		<u>50,0 μl</u>
		•

3.3 RNA: Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Arbeiten mit RNA

Jegliche Arbeiten mit RNA müssen unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden. Arbeitsplatz und Pipetten wurden mit RNaseZAP (Ambion) gereinigt, Pipettenspitzen und Eppendorfgefäße wurden bei 120^oC autoklaviert, Glaswaren bei 200^oC mindestens 8 Std gebacken und alle verwendeten Lösungen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC 0,1%ig eingesetzt) behandelt und anschließend autoklaviert.

3.3.2 Präparation von Gesamt-RNA

RNA-Präparationen aus adulten Zebrafisch-Gehirnen wurden mit dem RNeasy Midi Kit von Qiagen laut Hersteller angefertigt. Dafür wurden 25 Gehirne präpariert, was einem Gewicht von ca. 250 mg Gewebe entspricht. Die extrahierte RNA wurde in RNase-freiem H_2O (Ambion) aufgenommen und bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

3.3.3 DNase-Behandlung

RNA, die revers transkribiert werden sollte, durfte keine Spuren von genomischer DNA enthalten, damit Produkte nachfolgender PCR-Reaktionen nur auf die Amplifikation eines cDNA-, nicht aber eines genomischen DNA-*templates* zurückgeführt werden konnten. Zu 100–200 μ g RNA wurde 1 μ l DNase (2U/ μ l, Ambion) gegeben und 15 min bei 37^oC inkubiert.

3.3.4 cDNA-Synthese, Reverse Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase schreibt RNA in einzelsträngige cDNA um. Pro Ansatz wurden bis zu 2 μ g DNase-behandelte RNA eingesetzt. Zusammen mit 2 μ l 10 x Reaktionspuffer, 2 μ l eines dNTP-Mixes (jedes dNTP, 5 mM), 2 μ l 10 μ M Oligo-(dT)-Primer, 1 μ l RNase-Inhibitor (RNasin, 10 U/ μ l,) und 1 μ l Omniscript Reverse Transcriptase wurde ein Grundmix angesetzt. Die RNA wurde zunächst 5 min bei 65^oC denaturiert, in einem Eisbad heruntergekühlt und anschließend dem Grundmix beigefügt. Das Reaktionsvolumen umfasste insgesamt 20 μ l. Das Reaktionsgemisch wurde 60 min bei 37^oC in einem Heizblock inkubiert. Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei –20^oC gelagert. Die cDNA-Synthese erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich mit dem Omniscript RT Kit von Qiagen.

3.3.5 in vitro Transkription

RNA-Sonden, sowie die für die Injektionen verwendete RNA wurde mit den MEGAscript Kits von Ambion synthetisiert. Als Template für die RNA-Polymerase diente 1 μ g linearisierte Plasmid-DNA. Die Linearisierung erfolgte unmittelbar am 3'-Ende der kodierenden Sequenz. Die Reaktionsansätze wurden folgendermaßen pipettiert:

Template	x µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
50 mM ATP	2 µl
50 mM CTP	2 µl
50 mM GTP	2 µl
50 mM UTP	1,33 µl
DIG-11-UTP	0,67 µl
Enzym-Mix	2 µl
DEPC- H2O	ad 20 µl

Die Reaktionsansätze für RNA-Präparationen, die für die Injektionen Verwendung finden sollten, enthielten 0,6 μ l 50 mM GTP und 1,6 μ l 40 mM CAP-Analog, anstatt DIG-11-UTP. Die Reaktiosansätze wurden 4 Std bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das DNA-*template* durch Zugabe von 1 μ l RNase-freier DNase (2u/ μ l) und 15minütiger Inkubation bei 37°C beseitigt. Die Aufreinigung der RNA-Präparationen erfolgte über ProbeQuantTM G-50-Säulen (Amersham Pharmacia) laut Protokoll der Hersteller.

3.3.6 RNA-Gelelektrophorese

RNA-Agarosegele wurden nach Sambrock (1989) gegossen. Alle benötigten Lösungen und Puffer wurden mit DEPC-H₂0 angesetzt. In der Regel wurden 1%ige Agarosegele gegossen. Dafür wurden zunächst 0,5 g Agar in 31 ml DEPC-H₂O in der Mikrowelle gelöst und anschließend 8,9 ml Formaldehyd (2,2 M Endkonz.) und 10 ml 5 x FGRB dazugefügt. Das Gel wurde unter einem Abzug gegossen und 30 min zur Polymerisation stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die aufzutragenden Proben folgendermaßen vorbereitet:

> 4,5 μ l RNA (\leq 30 μ g) 2,0 μ l 5 x FGRB 10 μ l Formamid 3,5 μ l Formaldehyd Σ 20 μ l

Die RNA wurde dann 15 min bei 65^{0} C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgeschreckt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die RNA mit 2 µl Formaldehyd Gel Loading Buffer beschwert. RNA-Gele wurden in der Regel 2 h bei 90 Volt gefahren. Die Färbung der Gele erfolgte mit einer RNase-freien Ethidiumbromidlösung.

3.3.7 RNA-Fällung

Wenn es erforderlich war eine hohe Konzentration an RNA zu erzielen, wurden RNA-Präparationen mit dem einfachen Volumen an 4 M Ammoniumacetat und dem sechsfachen Volumen an absolutem Ethanol über Nacht bei -80° C gefällt, anschließend 5 min bei RT stehen gelassen, damit die Salze in Lösung gingen und dann 30 min bei 13000 rpm und RT pellettiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 15 µl RNase-freiem H₂O (Ambion) resuspendiert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Gehirn-Homogenaten

Aus zehn adulten Zebrafischen wurde mit zwei spitzen Pinzetten unter dem Binokular das Gehirn vollständig entnommen. In einem Homogenisator wurden die Gehirne zerkleinert und in 10 μ l Extraktionspuffer pro mg Gewebe aufgenommen. Durch Zugabe von NP 40 (1% Endkonz.) und Rotation der Präparation bei 4^oC für 4 Std wurde das Gewebe lysiert. Das Gehirn-Homogenat wurde abschließend durch 30minütige Zentrifugation bei 2000 rpm und 4^oC vom Zellpellet getrennt und aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20° C gelagert.

3.4.2 Herstellung von Membranfraktionen aus adulten Gehirnen

Zwanzig adulte Gehirne wurde entnommen und in 1 ml Homogenisierungspuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 10 min bei 1000 g und 4^{0} C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde dann in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und nochmals homogenisiert (s.o.), um die Proteinausbeute zu erhöhen. Die vereinigten Überstände wurden dann 1 Stunde in der Ultrazentrifuge bei 10000 g und 4° C zentrifugiert. Die pelletierte Membranfraktion wurde in 1 ml Homogenisierungspuffer, 1% (v/v) Triton resuspendiert.

3.4.3 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge der erhaltenen Gehirn-Homogenate wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt. Das System beruht auf der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung der gebildete Chelate zwischen Bicinchoninsäure (BCA) und dem reduzierten Gesamtprotein. Das gebildete Farbprodukt hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Bei aufsteigenden Proteinkonzentrationen verhält sich die Absorption über einen weiten Bereich linear. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA im jeweils verwendeten Puffer angesetzt.

3.4.4 Herstellung von Peptidantikörpern

Bei der Firma Eurogentec wurden aus der Proteinsequenz von L1.1 bzw. L1.2 geeignete Peptide ausgewählt (Kap. 2.12), synthetisiert und in Kaninchen injiziert. Jeweils eine Woche nach der Injektion wurde den Kaninchen Testblut abgenommen. Das Serum wurde vom Blutkuchen abzentrifugiert und gekühlt gelagert. Insgesamt erfolgten sechs Injektionen. Die Reaktivität des Serums wurde im Westernblot und in der Immunzytochemie getestet.

3.4.5 Deglykosilierung

Bei den neuralen Zellerkennungsmolekülen der Ig-Superfamilie handelt es sich um Glykoproteine, die durch den Besitz von Asparagin-gebundenen N-Glycanketten modifiziert sind (s. Einleitung). Das Enzym N-Glykosidase F spaltet Asparagin-gebundene N-Glycanketten , vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen und dass das Oligosaccharid die Mindestgröße der Chitobiose core Einheit aufweist (Chu, 1986;Tarentino et al., 1985).

Die während dieser Arbeit hergestellten Antikörper gegen L1.1 bzw. L1.2 wurden u.a. dazu benutzt, die Zebrafischmoleküle L1.1 und L1.2 auch biochemisch genauer zu charakterisieren.

Für die Reaktionsansätze wurden je 1 μ l 5% EDTA zu 40 μ g der Membranfraktion (Kap. 3.4.2) pipettiert und 5 min bei 100⁰C denaturiert. Nachdem die Ansätze abgekühlt waren, erfolgte die Zugabe von 20 μ l 2 x N-Glykosidase F -Puffer und 10 μ l N-Glykosidase F (10 U). Die Deglykosylierungsreaktion erfolgte ü.N. bei 37⁰C. Als Kontrollreaktionen dienten Ansätze ohne Zugabe des Enzyms. Des weiteren wurden Reaktionsansätze ohne Zugabe von N-Glykosidase F bei 4⁰C pipettiert, um zu überprüfen, ob es aufgrund der langen Inkubationszeit bei 37⁰C zu einer Denaturierung des Proteingemisches kommt.

3.4.6 SDS-PAGE und Western Blot

Die Proteinauftrennung erfolgte mit einer SDS-Polyacrylgelektrophorese in einem 8% igen denaturierenden Gel. Die aufzutrennenden Proben wurden mit dem einfachen Volumen an 2 x Probenpuffer versehen und 2 min bei 100^oC denaturiert. Die Gellaufzeit betrug 1,5 h bei 25 mA pro Gel. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran geblottet. Dafür wurde die Membran kurz mit Aqua_{bidest} benetzt und in Transferpuffer

überführt. Das Gel wurde ebenfalls für einige Minuten in Transferpuffer getränkt und anschließend auf die Nylonmembran gelegt. Das Gel und die Membran wurden zwischen jeweils drei Lagen 3MM-Whatman-Papier gelegt und in die Blotapparatur überführt. Unter Kühlung wurde 1,5 h bei 80 Volt in Transferpuffer geblottet. Anschließend wurde der Proteintransfer überprüft, indem die Membran mit Ponceaurot gefärbt wurde. Bei einem erfolgreichen Transfer wurde dann die Nylonmembran zur Blockierung unspezifischer Bindung 1 h bei RT auf einem Schüttler mit 5% (w/v) Magermilchpulver (D. F. Wulf, Reformhaus) in PBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper ü.N. bei 4^oC auf einem Schüttler. Der Antikörper wurde dafür entsprechend in 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Membran 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Mit einer geeigneten Verdünnung eines sekundären anti-Spezies-Antikörpers wurde die Membran dann 1 h auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls abgegossen und die Membran nochmals mit PBS gewaschen (s.o.). Die Detektion erfolgte mit dem ECL Chemilumineszenzsubstrat Analyse System (Amersham Pharmacia). Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Protein Marker von Life Technologies verwendet.

3.4.7 Ponceaurot-Färbung

Die Nylonmembran wurde nach dem Proteintransfer (Kap. 3.4.6) in einer Plastikschale überführt und 10 min unter leichtem Schütteln in 1 x Ponceaurot-Lösung getränkt. Sobald die Proteinbanden sichtbar wurden, erfolgte das mehrmalige Waschen der Nylonmembran mit Aqua_{demin}, um die überflüssige Lösung zu entfernen. Anschließend wurde mit der immunologischen Detektion fortgefahren.

3.4.8 Spezifitätsprüfung von Antikörpern durch Peptid-Präadsorption

Die von der Firma Eurogentec hergestellten Antikörper gegen L1.1 und L1.2 (Kap. 3.4.4) wurden auf spezifische Bindung gegen das entsprechende Protein getestet. Abweichend vom Protokol für Western Blots (Kap. 3.4.6) wurden dafür die Antikörper vor der Inkubation auf die Nylonmembran mit dem entsprechenden Peptid, das für die Immunisierung der Kaninchen benutzt wurde, präadsorbiert. Dadurch sollte eine Blockierung der Antikörper erreicht werden, so dass die entsprechenden Proteinbanden auf der Nylonmembran nicht mehr gebunden werden könnten. Eine fehlende Detektion der L1.1- bzw. L1.2-spezifischen Bande ist dann ein Hinweis für die Spezifität der jeweiligen Antikörper. Der Präadsorptionssansatz wurde folgendermaßen in ein 100 μ I Eppendorfgefäß pipettiert: 1 μ I AK-Serum, 5 μ I Peptid ($\geq 125 \ \mu$ g), 14 μ I PBS. Nach 1,5 h Inkubation bei RT wurde der Ansatz in 10 ml 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS verdünnt und 1 h bei RT auf der Nylonmembran inkubiert. Die Detektion erfolgte wie in Kap. 3.4.6 beschrieben.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden trypsinisiert, in Medium aufgenommen und die Suspension in der Eppendorf Zentrifuge sedimentiert (3 min, 200 g). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium (10% DMSO/10% FCS in GMEM) aufgenommen und in Einfrierröhren überführt. Die Zellen wurden bei -80° C gelagert.

3.5.2 Revitalisierung von Zellen

Nach langsamen Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension entnommen, in 5 ml vorgewärmtes Medium überführt und in der Zentrifuge 3 min bei 200 g sedimentiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

3.5.3 Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit dem LipofectAMINE PLUSTM Reagent Kit

CHO-Zellen wurden in 70 cm³ T-Flasks bei 37^oC inkubiert bis sie zu ca. 80% konfluent waren. Dann wurde das Medium abgesaugt und die Zellen nach 5 min Inkubation bei 37⁰C mit 3 ml Versene (GIBCO BRL) von der Oberfläche abgelöst. Nachdem die Zellen durch Abklopfen vollständig resuspendiert und das Volumen mit GMEM auf 10 ml aufgefüllt wurde, erfolgte das Ernten der Zellen durch Zentrifugation (3 min, 1000 rpm, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml frischem GMEM resuspendiert. Am Vortag der Transfektion wurden je 280 µl der Zellen zusammen mit 2 ml GMEM in 6 well plates ausplattiert und ü.N. bei 37^oC inkubiert. Am Tage der Transfektion wurden je 2 µg Plasmid-DNA in 1,5 ml-Eppendorfgefäße vorgelegt und 6 µl PLUS-Reagenz verdünnt in 100 ul GMEM (FCS-, Pen/Strep.-frei) zur DNA hinzugefügt, um die DNA so zu "packen". Während das Gemisch 15 min bei RT inkubierte, wurden die Zellen mit FCS- und Pen/Strepfreiem Medium gewaschen. Nach der Inkubation wurde noch 4 µl LipopfectAMINE (in 100 µl serumfreiem GMEM) zu dem Gemisch hinzugegeben und nach erneuter Inkubation (15 min, RT) und Zugabe von 800 µl GMEM (serumfrei) konnte der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben werden. Den Zellen wurden nach dreistündiger Inkubation bei 37^oC 1 ml serumhaltiges GMEM hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug noch einen weiteren Tag. Am folgenden Tag wurden die transfizierten Zellen auf poly-L-Lysin beschichtete Coverslips (Kap. 3.5.4) überführt. Dafür wurden die Zellen nochmals mit Versene behandelt und mit einer Pipette von der Oberfläche gespült. In frische 6 well plates wurden die Coverslips zusammen mit 2 ml GMEM ausgelegt und 280 µl der Zellsuspension pro well hinzu pipettiert. Abschließend wurden die Ansätze über Nacht bei 37⁰C inkubiert.

3.5.4 Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin

11 mm Deckgläser wurden mit Aceton bedeckt und für ca. 30 min in einem Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden die Deckgläschen gründlich mit Aqua_{bidest} gewaschen und über Nacht bei 4⁰C, oder 4-5 h bei RT mit einer poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach einer gründlichen Reinigung mit Aqua_{bidest} wurden die

Deckgläschen in einer mit Alufolie ausgelegten Wanne unter der Sterilbank getrocknet und vor Gebrauch für 15 min unter UV-Licht sterilisiert.

3.5.5 Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen

CHO-Zellen wurden mit den hergestellten Expressionsvektoren für L1.1 und L1.2 transfiziert und deren Expression mit den in dieser Arbeit hergestellten Immunseren überprüft. Dadurch konnte zum einen nachgewiesen werden, dass die synthetisierten Proteine an der Zelloberfläche lokalisiert sind, und zum anderen, dass die Immunseren in Zellkultur zur Detektion dieser Proteine geeignet sind.

Da die Epitope, gegen die die L1.1- bzw. L1.2-Antikörper gerichtet sind, sich jeweils in der extrazellulären Domäne befinden, wurde die immunhistochemische Untersuchung an lebenden Zellen durchgeführt. d.h., die Zellen waren weder fixiert noch permeabilisiert. L1.1 und L1.2 wurden mit dem EGFP- oder dem Myc-Epitop als Fusionsproteine exprimiert, wobei diese am jeweiligen C-Terminus fusioniert sind und sich somit in der intrazellulären Domäne des jeweiligen Proteins befinden.

Da EGFP im Gegensatz zum Myc-Epitop eine Eigenfluoreszenz besitzt, ist es hier nicht notwendig, eine Immunfärbung mit EGFP-Antikörpern durchzuführen. Im Falle der Myc-Fusionsproteine war dagegen zum Nachweis der Proteinexpression eine Immunfärbung mit dem monoklonalen Myc-Antikörper 9E10 erforderlich. Daher unterscheiden sich die Versuchsprotokolle für die jeweiligen Konstrukte etwas voneinander.

Für die EGFP-Konstrukte wurden die sich auf poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen befindlichen transfizierten Zellen dreimal mit GMEM (FCS-, Pen/Strep-frei) gewaschen und anschließend auf einer mit Parafilm ausgelegten Plastikschale ausgelegt auf der die Inkubation mit dem Serum erfolgte. Das Serum wurde unter 1:500 Verdünnung eingesetzt und 15 min bei RT auf den transfizierten Zellen inkubiert. Nachdem die Zellen drei mal gewaschen wurden, um nicht gebundenen Antikörper zu beseitigen, erfolgte die Inkubation mit Kaninchen-Cy3 (1:500, 15 min, RT) im Dunkeln. Ungebundener Antikörper wurde dann ebenfalls durch Waschen mit GMEM (FCS-, Pen/Strep-frei) entfernt (s.o.) bevor die Zellen dann durch 10-minütige Inkubation in Methanol (-20⁰C) fixiert wurden.

Bei den Zellen, die mit den Myc-Konstrukten transfiziert wurden, war es erforderlich die Zellen zu permeabilisieren, bevor sie mit dem monoklonalen Myc-Antikörper 9E10 inkubiert wurden. Dies geschah, indem die Zellen zunächst kurz mit PBS gespühlt wurden, bevor sie mit Methanol fixiert wurden. Das Methanol hat gleichzeitig die Eigenschaft die Membranen durchlässig zu machen. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 20 min mit Ziegenserum (150 µl ad 10 ml PBS) gegen unspezifische Antikörperbindung blockiert. mAb 9E10 wurde 1:1000 in PBS verdünnt und ü.N. bei 4⁰C mit den Zellen inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Die transfizierten Zellen wurden zur mikroskopischen Untersuchung mit Aqua Poly/Mount auf Objektträger überführt.

3.6 Pertubations-Techniken

3.6.1 RNA-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Genen auf zwei Wegen untersucht. Zum Einen kann durch verschiedene Techniken versucht werden die Synthese eines funktionsfähigen Genprodukts zu inhibieren, oder aber das zu untersuchende Gen wird überexprimiert. Im letzteren Fall liegt das entsprechende Genprodukt im Überschuss in der Zelle vor. Gleichzeitig ist es dabei möglich, dass das Genprodukt frühzeitig in der Zelle vorliegt. Eine frühzeitige Synthese des Proteins fände auch in den hier untersuchten Fällen statt, da das Nervensystem des Zebrafisches ca. 16 h nach der Befruchtung gebildet wird und mit der die Synthese der neuralen Zelladhäsionsmolekülen einhergeht.

Für die Injektionen war es wünschenswert, dass sich die Eier im 1- bis 8-Zellstadium befanden, da zu diesem Zeitpunkt eine effiziente Aufnahme und Verteilung der injizierten Lösung in alle Zellen gewährleistet ist.

Die frisch gelegten Zebrafischeier wurden aus dem Beckenboden mit einem Schlauch aufgesaugt und zur Beseitigung von Kontaminationen mit 0,5% PA in PBS gespühlt. Die Eier wurden dann dreimal gründlich mit 10% HBSS (GIBCO BRL) gewaschen und mit Hilfe einer Glaspipette in eine vorgegossene Agarschale überführt. Unter Zuhilfenahme einer Schablone konnte zuvor eine Furche in den Agar geformt werden, in der die desinfizierten Eier für die Injektion aufgereiht wurden.

Zunächst musste die Glaskanüle (3 μ m, GB 150F-8P, Sciences Products GmbH, Hofheim) mit der zu injizierenden Lösung gefüllt werden. Dies geschah indem die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte über das stumpfe Ende bis zur Spitze der Kanüle aufgesogen wurde. Die beladene Kanüle wurde anschließend an einen Mikromanipulator befestigt, der seinerseits an einen Picospritzer (PLI-100, Medical Systems Corp., Greenvale, USA) angeschlossen war. Die Injektionen erfolgten in den Dotter der Eier bei 6 PSI und 90 msec, wobei darauf geachtet wurde, dass die Lösung in die Nähe der Zellen deponiert wurde. Die injizierte Menge wurde durch Färbung der Lösung mit 5% (w/v) Rhodamindextran (M_w = 10000, 0,5 μ l/3 μ l RNA-Lösung) kontrolliert.

Für die Überexpression wurde *in vitro* transkribierte RNA (Kap. 3.3.5) in frisch befruchtete Zebrafischeier injiziert.

3.6.2 Morpholino-Injektionen in befruchtete Zebrafischeier

300 nmol Morpholinos wurden im gefriergetrockneten Zustand geliefert und nach Erhalt mit 37,5 μ l RNase-freies Wasser (Ambion) resuspendiert. Das entsprach einer Konzentration von 8 mM (65ng/nl). Die Morpholino-Stammlösung wurde in 3 μ l-Aliquots aufgeteilt und bei -80^oC gelagert. Für die Injektionen wurde die gewünschte Konzentration mit Danieau-Lösung eingestellt.

Zunächst war es erforderlich die geeignete Menge an Morpholinos zu ermitteln, bei der eine optimale Überlebensrate der Larven und eine normale Entwicklung gewährleistet war. Dafür wurde eine Titration mit einem Standard-Kontroll-Morpholino (Genetools) durchgeführt, bei der 0,5 ng bis 16 ng injiziert wurde. Dieser Morpholino enthält eine nicht codierende, zufällige Sequenz. Dabei stellte sich heraus, dass 8-10 ng des Morpholinos weder die Entwicklung der Larven beeinflussen, noch eine erhöhte Sterblichkeitsrate im Vergleich zu nicht injizierten Wildtypen verursachen. Auf diesen Daten basierend erfolgten die Injektionen mit den genspezifischen Morpholinos.

3.7 Morphologische Methoden

3.7.1 whole mount in situ Hybridisierung

Um eine Degradation der RNA-Sonden durch RNasen zu verhindern wurden alle Lösungen und Puffer mit DEPC-H₂O angesetzt.

Die Embryonen wurden, nachdem sie das gewünschte Wachstumsstadium erreicht hatten, mit zwei spitzen Pinzetten dechorioniert und in Aminobenzolsäure-Ethylmethylester (MS222) betäubt. Die Fixierung erfolgte mit 4% PA ü.N. bei 4⁰C. Am folgenden Tag wurde das PA durch viermaliges Waschen mit PBST für jeweils 5 min beseitigt. Die Embryonen wurden dann für 5 min in 100% Methanol inkubiert und anschließend für mindestens weitere 30 min bei -20° C. Zur Beseitigung des Methanols wurden die Embryonen durch eine Methanolreihe (75%, 50%, 25% Methanol in PBST) für jeweils 5 min geführt und zweimal mit PBST gewaschen. Durch Proteinase K-Verdau wurden die Embryonen permeabilisiert. Dafür wurde eine Proteinase K-Lösung (10 µg/ml) angesetzt in der die Embryonen in einer 4 well plate, je nach Wachstumsstadium (11hpf- 33 hpf), 11-15 min inkubiert wurden. Nach dem Verdau wurde die Proteinase K-Lösung mit einer Glaspipette abgenommen und die Embryonen wurden zweimal mit Glycin/PBST (2 mg/ml) gewaschen. Anschließend wurden die permeabilisierten Embryonen 20 min mit 4% PA bei RT fixiert. Nach 20 min wurde das PA durch viermaliges Waschen für je 5 min mit PBST entfernt. Für die Prähybridisierung wurden die Embryonen in RNase-freie Eppendorfgefäße überführt und mit 350 µl HB4 1-6 h bei 55^oC inkubiert. Für die Hybridisierung wurde die RNA-Sonde 1:250-1:4000 in HB4 verdünnt und 10 min bei 80[°]C denaturiert. Bis zu ihrem Einsatz wurde die Sonde in einem Eisbad gekühlt. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 55^oC. Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung mit einer Glaspipette abgenommen und nicht hybridisierte Sonde durch zweimaliges Waschen mit 50% Formamid/2 x SSCT für je 30 min, 15minütigem Waschen mit 2 x SSCT und zweimaligem Waschen für je 30 min mit 0,2 x SSCT entfernt. Das Waschen erfolgte stets bei 55°C.

Die DIG-markierten RNA-Sonden wurden mit anti-DIG-AP Fab Fragmenten detektiert. Die Antikörper wurden unter 1:200-Verdünnung in Blockierungs-Reagenz (Roche) eingesetzt. Dafür wurden die Embryonen wieder in Kulturschalen mit 24 Vertiefungen überführt und mit 150 µl der Antikörper-Lösung versehen. Zur Inkubation wurden die Präparationen ü.N. bei 4⁰C gelagert. Am folgenden Tag wurde nicht gebundener Antikörper durch sechsmaliges Waschen mit PBST für jeweils 20 min entfernt, bevor dann die Färbereaktion mit BCIP/NBT (Sigma), im Falle von DIG-markierten Sonden, erfolgte. Die Färbereaktion dauerte bis zu mehreren Stunden. Sobald eine deutliche Färbung der Embryonen zu sehen war, wurde die Färbelösung abgenommen und die Embryonen wurden mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Embryonen auf Objektträger überführt (Kap. 3.7.4).

3.7.2 Immunfärbung von Zebrafischlarven (whole mount)

Die Embryonen wurden, nachdem sie das gewünschte Wachstumsstadium erreicht hatten, mit zwei spitzen Pinzetten dechorioniert und mit Aminobenzolsäure-Ethylmethylester (MS222) betäubt. Zur Fixierung wurden sie 45 min in 4% PA/1% (v/v) DMSO in PBS inkubiert. Nachdem die Larven fixiert waren, wurden sie 3 x 5 min mit PBS gewaschen und in Kulturschalen mit 24 Vertiefungen überführt. Zur Blockierung unspezifischer Bindung des primären Antikörpers wurden die Larven 30 min in Blockpuffer inkubiert. Larven, die 32 Stunden alt waren, wurden vorher 5 min mit 2 mg/ml Collagenase behandelt und anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Blockpuffer ü.N. bei 4^{0} C. Am folgenden Tag wurde ungebundener Antikörper durch 3 x 15 min Waschen in PBS beseitigt.

Falls der primäre Antikörper nicht fluoreszenzmarkiert war, erfolgte die Detektion über einen HRP-gekoppelten sekundären Antikörper. Ungebundener Antikörper wurde ebenfalls entsprechend verdünnt und ü.N. bei 4^{0} C inkubiert. Nachdem dieser durch 3 x 15 min Waschen mit PBS beseitigt wurde erfolgte die Detektion mit DAB und H₂O₂. Dafür wurden 500 µl aus einer 1:120 in PBS verdünnten DAB-Stammlösung (0,5mg/ml) zu den Larven pipettiert und 20 min bei 4^{0} C inkubiert. Durch die Zugabe von 50 µl 0,035% H₂O₂ in PBS entstand nach ca. 10 min ein braunes Reaktionsprodukt. Wenn die Färbung die gewünschte Intensität erreicht hatte, wurde die Färbelösung durch Waschen mit PBS beseitigt. Die Larven wurden abschließend auf Objektträger überführt (Kap. 3.7.4.).

3.7.3 X-Gal-Färbung

Frisch befruchtete Zebrafischeier wurden mit *lacZ*–RNA injiziert, um zu überprüfen, ob die Überexpression von Genen in diesem System grundsätzlich möglich ist. Das Gen *lacZ* codiert für das Enzym β –Galactosidase. Die Hydrolyse von X–Gal (5–Bromo–4–Chloro–3-Indolylbeta-D–Galactosid) durch β –Galactosidase führt zu einer blaugrünen Färbung der Zellen, in denen das Enzym exprimiert wurde.

Die mit *lacZ*–RNA injizierten Zebrafischlarven wurden dafür in kleine Petrischalen überführt und bei 37⁰C mit ca. 5 ml X–Gal–Färbelösung inkubiert. Eine erfolgreiche Blaufärbung wurde erst nach 2–3 h sichtbar und war auf die erfolgreiche Aufnahme der injizierten *lacZ*–RNA und ihrer effizienten Translation zurückzuführen.

3.7.4 Überführen der Zebrafischlarven auf Objektträger

Die Embryonen wurden durch eine aufsteigende Glycerinreihe (30%, 50%, 70% in PBS) geführt. Anschließend wurde ihnen mit zwei spitzen Pinzetten der Dottersack abgenommen. Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen 70% (v/v) Glycerin aufgetragen, in dem die Embryonen eingebettet wurden. Um zu verhindern, dass die Embryonen durch das Deckglas zerquetscht werden, wurde an allen vier Ecken des Deckglases etwas Silikonfett als Abstandshalter aufgetragen.

3.7.5 Herstellung von Gewebeschnitten

Das gewünschte Gewebe wurde mit zwei spitzen Pinzetten unter dem Binokular entnommen und in eine mit Tissue-Tek[®] gefüllte Form ausgelegt. Das Gewebe wurde eingefroren, indem die Form 10 sek in durch flüssigen Stickstoff gekühltes Isopentan getaucht wurde. Bei Bedarf wurden die Präparate bis zur weiteren Verarbeitung bei -80^oC gelagert.

Das Gewebe wurde in einem Kryostaten bei -20° C geschnitten und auf Superfrost-Objektträger überführt. Nachdem die Schnitte luftgetrocknet waren wurden sie über Nacht bei 4° C in einer Glasküvette mit 4% PA fixiert.

3.7.6 Indirekte Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

Das Gewebe wurde im Kryostaten geschnitten (Kap. 3.7.5) und die Schnitte auf Superfrost-Objektträger überführt. Mit einem Fettstift (Pap-Pen) wurden die Schnitte umrahmt und 10 min luftgetrocknet, bevor sie in einer Glasküvette 10 min mit Methanol (-20^oC) fixiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in PBS rehydriert und zur Blockierung unspezifischer Bindung des Antikörpers 20 min mit dem entsprechenden Preimmunserum bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in PBS in einer feuchten Kammer ü.N. und bei 4^oC auf den Schnitten inkubiert. Nicht gebundener primärer Antikörper wurde am folgenden Tag durch 4 x 7 min Waschen mit PBS entfernt. Für die Detektion wurde ein fluoreszierender sekundärer Antikörper (Cy3) 1:200 in PBS verdünnt und in einer feuchten Kammer im Dunkeln 45 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurden die Präparate mit Elvanol eingedeckt.

3.7.7 Läsion des optischen Nerven

Um den optischen Nerven zu lädieren, wurden adulte Zebrafische mit 1:3000 (0,03g/100ml) verdünntem MSS22 betäubt. Mit zwei spitzen Pinzetten wurde das linke Auge vorsichtig aus der Augenhöhle gehoben und der Sehnerv gequetscht. Die erfolgreiche Läsion zeigte sich an einem klaren Abdruck an der Läsionsstelle. Die lädierten Fische wurden dann in Einzeltanks überführt, wobei das Wasser mit 25 μ l/l eSHa 2000 versehen wurde, um die Fische vor Infektionen zu schützen. Zu verschiedenen Zeitpunkten (2 dpl, 7 dpl, 30 dpl, 90 dpl und 180 dpl) nach der Läsion wurden die Fische mit einer 1:1000 Verdünnung (0,1g/100ml) an MSS22 betäubt und das Gehirn sowie die Augen heraus präpariert, um die F3 Expression in der Retina, im Sehnerven, im optischen Trakt und im optischen Tektum durch *in situ* Hybridisierung zu untersuchen. Augen und Gehirn wurden in jeweils eine mit TissueTec[®] gefüllte Gummiform gelegt und mit unter Flüssigstickstoff gekühltem Isopentan eingefroren. Die Präparate wurden bis zur weiteren Behandlung bei -20° C gelagert.

3.7.8 Läsionen des Rückenmarks und retrograde Farbstofffüllung

Läsionen des Rückenmarks wurden nach der Methode von Becker et al. (1997) durchgeführt und von B. Lieberoth zur Verfügung gestellt. Dafür wurden adulte Fische mit 1:3000 (0,03g/100ml) verdünntem MSS22 anesthäsiert und die Wirbelsäule zwischen der Rückenflosse und dem Operculum am achten Wirbel durchtrennt. Durch das Auftragen von RDA-Kristallen (MW 10000) auf das durchtrennte Rückenmark sollten die lädierten Axone fluoreszenzgefärbt werden. Sechs Tage bzw. zwei Wochen nach der Operation wurden die Fische mit 4% PA perfundiert und die Gehirne heraus präpariert. Von den fixierten Gehirnen wurden mit einem Vibratom 50 µm-Schnitte hergestellt.

3.7.9 *in situ* Hybridisierung an Kryostatschnitten des Hirns und des Auges adulter Zebrafische

Nachdem das Gewebe ü.N. fixiert war wurde das PA durch dreimaliges Waschen für je 10 min mit PBS entfernt. Die Schnitte wurden dann 10 min in 70% (v/v) EtOH dehydriert und anschließend zweimal mit Millipore-Wasser gespült.

Dann wurden die Schnitte für 10 min mit 0,1 M HCl behandelt, zweimal 10 min mit PBS gewaschen und 20 min in 200 ml 0,1 M Triethanolamin/0,5 ml Essigsäureanhydrid inkubiert.

Das Triethanolamin-Essigsäureanhydrid-Gemisch wurde durch 2 x 15 min Waschen mit PBS entfernt bevor die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (je 5 min in 70%, 80%, 95% in H₂O) dehydriert wurden. Anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit einem Fettstift umrandet. Damit sollte das Volumen der Hybridisierungslösungen minimiert werden. Die getrockneten Objektträger wurden in eine große mit Kleenextüchern ausgelegte Plastikschale gelegt. Die Kleenex-Tücher wurden mit Formamid/PBS (1:1) getränkt. Die Schnitte auf jedem Objektträger wurden 3 Std bei 37^oC mit 300-500 µl Formamid/ Hybridisierungspuffer (1:1) prähybridisiert. Abschließend wurde die Sonde in Hybridisierungspuffer verdünnt, wobei je nach Sonde, unterschiedliche Verdünnungen gewählt wurden. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 55^oC in einem Hybridisierungsofen. Am folgenden Tag wurde nicht hybridisierte Sonde entfernt, indem die Objektträger in Glasküvetten überführt und bei 55^oC folgendermaßen gewaschen wurden: zunächst zweimal 30 min mit 0,2 x SSC bei 55^oC, dreimal 90 min mit 0,1 x SSC/50% (v/v) Formamid bei 55^oC und abschließend 10 min mit 0,2 x SSC bei RT.

Da die in dieser Arbeit verwendeten RNA-Sonden DIG-markiert waren erfolgte die Detektion stets mit einem anti-DIG-markierten Antikörper (Roche). Die Schnitte wurden dafür zunächst 10 min in Puffer 1 äquilibriert und anschließend mindestens 30 min bei RT mit Blockpuffer (Roche) inkubiert um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermeiden. Der Antikörper wurde 1:500 in Blockpuffer verdünnt und auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte ü.N. bei 4⁰C in einer mit Parafilm versiegelten Plastikschale. Am folgenden Tag wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen mit Puffer 1 (2 x 15 min) entfernt. Die Schnitte wurden abschließend für 5 min mit Puffer 3 äquilibriert. Die Färbereaktion erfolgte in einer mit Kleenex Tüchern ausgelegten Plastikkammer, in der die Kleenex-Tücher mit Puffer 3 benetzt wurden. Dafür wurden die Schnitte mit ca. 200 µl Färbelösung versehen. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit PBS gestoppt.

3.7.10 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Beim konfokalen Mikroskop werden nur Strukturen abgebildet, die in einer Fokusebene liegen. Einzelne fluoreszierende Punkte des Präparates werden in den Fokus eines Lasers gebracht und so mit einer hohen Energie angeregt. Der Laser wird auf eine Ebene (z-Ebene) im Präparat fokussiert, indem die Strahlung durch eine Lochblende (Pinhole) auf das Objektiv geführt wird. Durch Ablenkung des Lasers in der x- und y-Ebene können schrittweise dicht nebeneinander liegende Punkte im Präparat angeregt werden. Auf diese Weise wird eine definierte Ebene im Präparat gescannt. Das vom Präparat emittierte Licht fällt durch das Objektiv des Mikroskops und wiederum durch eine Lochblende veränderbarer Größe, die dem Photodetektor vorgeschaltet ist. Diese Lochblende bewirkt, dass nur solche Bildpunkte auf dem Detektor abgebildet werden, die in der Fokusebene liegen. Lichtstrahlen, die von Punkten außerhalb der Fokusebene emittiert werden, werden nicht detektiert, so dass kein undeutliches Bild entstehen kann. Die Daten werden digitalisiert, von einem Computer aufgenommen und verarbeitet auf einem hochauflösenden Bildschirm dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Laser Scanning Mikroskop von Zeiss benutzt.
4 Ergebnisse

4.1 Klonierung und Charakterisierung des F3 Gens

4.1.1 Klonierung der vollständigen cDNA von F3

Um die Rolle des F3 Gens beim axonalen Wachstum und seine Regulation zu untersuchen wurde ein F3-homologes Gen des Zebrafisches kloniert. Dafür konnte aus einer EST-Datenbank (http://zfish.wustl.edu) ein Klon (fj64d10.y1) mit einer hoch homologen Sequenz zu F3 aus anderen Vertebraten identifiziert werden. Der EST-Klon hatte ein *insert* von ca. 3,5 kb. Das *insert* enthielt einen offenen Leserahmen von 2292 bp, der für vier Immunglobulin-Domänen und vier Fibronektin-Typ-(III)-ähnliche Domänen codierte. Das 5'-Ende des offenen Leserahmens fehlte. Aufgrund der aus anderen Spezies bekannten Struktur des Proteins war ersichtlich, dass die beiden N-terminalen Immunglobulin-Domänen und das Signalpeptid, das für den Transport der Polypeptidkette an die axonale Membran verantwortlich ist, fehlten.

Um das vollständige Gen zu klonieren wurde eine RACE PCR durchgeführt (Kap. 3.2.11). Als Ausgangsmaterial diente eine RNA-Präparation aus adulten Zebrafischgehirnen. Es resultierte ein RACE-Fragment von 906 bp (Abb. 4.1). Die Sequenzierung des Fragments ergab, dass das Fragment für die fehlenden Strukturdomänen und das Signalpeptid kodierte.



Abb. 4.1: 5'RACE PCR für F3. Das Produkt der 5'RACE PCR wurde auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Fragment wurde aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Die Position des 1 kb Markers ist angegeben.

Da nunmehr die vollständige Sequenz des neuen Gens bekannt war, wurde mit zwei geeigneten Primern mittels PCR aus cDNA adulter Zebrafischgehirne das vollständige Gen amplifiziert. Dafür wurde eine *pfu*-Polymerase benutzt, die eventuelle Lesefehler während der Amplifikation korrigierte. Das resultierende Amplifikat wurde in den Vektor pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] kloniert und hatte eine Gesamtlänge von 3099 bp (Abb. 4.2). Es enthielt den vollständigen offenen Leserahmen des neuen Gens.



4.2 Sequenzanalyse des F3 Gens

Die Domänenstruktur des neuen Gens wurde anhand der abgeleiteten Proteinsequenz unter Zuhilfenahme der Pfam HMM Datenbank (http://pfam.wustl.edu) und der DGPI Datenbank (http://129.194.186.123/GPI-anchor) analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass das neue Gen für sechs N-terminale Immunglobulin-Domänen und vier Fibronektin-Typ-(III)-ähnlichen Domänen kodierte. Die ersten 26 Aminosäuren bilden das Signalpeptid. Am C-Terminus befand sich die Spaltungsstelle, an der das Protein über einen GPI-Anker an der Membran verbunden ist (Abb. 4.3).

Damit entsprach die Domänenstruktur dieses neuen Proteins der beschriebenen Struktur bekannter F3-homologer Moleküle aus anderen Spezies.

Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz aus der cDNA des neuen Gens zeigte, dass das neue Protein zu ca. 55% identisch zu anderen F3-Homologen war (Tab. 4.1) und damit im Bereich des Identitätsgrades von anderen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie lag (Challa et al., 2001;Lee et al., 2001;Tongiorgi et al., 1995).

	Zebrafisch	Xenopus	Maus	Huhn	human
Zebrafisch	-	55	55	56	55
Xenopus	55	-	67	70	68
Maus	55	67	-	77	95
Huhn	56	70	77	-	77
human	55	68	95	77	-

Tab. 4.1: Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Zebrafisch F3 mit F3-Homologen aus anderen Spezies. Das Zebrafisch-Protein ist zu ca. 55% identisch zu F3-äquivalenten Molekülen aus anderen Spezies. Die Zugangsnummern der benutzten Sequenzen sind: *Xenopus* (D86505) Maus (X14943) Huhn (X14877) human (NM 001843).

Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz lieferte konkrete Hinweise auf die Identität des neuen Gens als F3-Homolog des Zebrafisches. Um diese Hinweise zu erhärten war es aber auch notwendig, das zeitliche und räumliche Expressionsmuster des neuen Gens zu untersuchen und es mit dem Expressionsmuster F3-verwandter Gene aus anderen Spezies zu vergleichen.

Zebrafisch Xenopus Maus Huhn human	1 1 1 1	HIGHTEDHERDELEGENEEREE MIPEAFORAMKHTTTVIMLALSSRSWSVCADFPEVFGG <mark>S</mark> SAGRGPVFEEQBLDTIYPEESP <mark>BEKITLICRIRANG</mark> PAS <mark>WRWRLNNAELVE</mark> AEGGDPHYSVSEGNLLISS 1: WMPLITQVIYVFLCWABG-KRYGPVFEEQPIDTI MKMPLLVSHLLISITSCLGDFTWHRRYGHGVSBDCKGFGFIFEQPIDTIYPESLEGKVSLNCRARASPFVYKWRMNNGDVDLTNDRYSMVGGNLVINN 11 MKMPLIVSHLLISITSCLGDFTWHRRYGHGVSBDCKGFGFIFEQPIDTIYPESSDGDVSMCGRARAMPFFIYKWRLNNMBIDLTKDRYSMVGGRLVINN 11 MKMVLLVSHLVIISITSCLGDFTWHRRYGHGVSBDCKGFGFIFEQPIDTIYPESSDGDVSMCGRARAMPFFIYKWRLNNMBIDLTKDRYSMVGGRLVINN 11	10 6 02 4 02
zebrafisch	111	PDKSKHAGNYTGVASNOYGSVTSRRARVOFGYLDMFSTDEREAVYVKEGOGAVLLCAPPPHFPEDLSFRWMLNEFPEFTPLDORRFVSQSTGNLYISTVRSTDSGNYSCF2	20
Xenopus	87	PDKYKDSARYMGIVSNWEGKWMSREATINFGYLDPFPTERERYEVKVKEGGAVLLCAPPPHFPEDLNYRWLLNEFPVFISTDNRRFVWGTGNLYIAWVSGTDBGNYSCF1	96
mouse	103	PDKOKDAGVYYCLASNNYGWVRSTEATLSFGYLDPFPPEERPEVKVKEGGOVLLCDPYHFPDDLSYRWLLNEFPVFIMDKRRFVSQTNGNLYIANVESSDRGNYSCF2	12
Huhn	95	PMKSRDAGKYMGVVSNTFGTVRSSEATLSFGYLDPFPPEEHYEVKVEGGAVLLCBPYHFPDDLSYRWLLNEFPVFIADRRFVSQTNGNLYIANVESSDRGNYSCF2	04
human	103	PDKOKDAGYYGLASNNYGWVRSTEATLSFGYLDPFPPEEHYEVKVEGGAVLLCBPYHFPDDLSYRWLLNEFPVFIADRRFVSQTNGNLYIANVESSDRGNYSCF2	12
Zebrafisch	221	VSSPATAKSVFSKFIPLVPIAERSLRKYPADIKVK <mark>SPD</mark> SWALLGONVTLECFALGNEIPOIRWRKLDGVIPPLRHDVSMSGAUJHLYSLOYEDEGLYECEADNSKGKD 3:	28
Xenopus	197	VSSPSVTKSVFSKFIS <mark>U</mark> POTTSEKEKRYTPVINVKFKDTRALKDONVTLECFALGNPVPVI <mark>D</mark> WRKINEAMP-ASABISMSGAVLKIFNIQPEDEGTYECEAENNKGLD 3	05
Maus	213	VSSPSITKSVFSKFIPLIPIPERFTKPYPADIVVOFKDIVITMGONVTLECFALGNPVPDIRWRKVLEPMP-STAEIS <mark>U</mark> SGAVLKIFNIQLEDEGLYECEAENIRGKD 3	19
Huhn	205	VSSPSITKSVFSKFIPLIPIPARFTKPYPADIVVOFKDIVALLGONVTLECFALGNPVPDIRWRKVLEPMP-ATABISMSGAVLKIFNIQLEDEGLYECEAENIRGKD 3	10
human	213	VSSPSITKSVFSKFIPLIPIPERFTKPYPADIVVOFKDIVALLGONVTLECFALGNPVPDIRWRKVLEPMP-ATABISMSGAVLKIFNIQLEDEGLYECEAENIRGKD 3	19
Zebrafisch	329	MEKTHLYVEGAFLWLEQISSSEVDIGEDYINSEGASGEREPHVHFLKNGHMYMKGHEVRESRIGFEDSGMYQCVAENRHGVIHANAELRVFASAFSFQYNFVKEKLLGAR 4	38
Xenopus	306	THRAVYVEGYPEWVEHINDTERDIGSDLEMSCVVKGKVGPSIRWLKNGASYEKG-BLRKSGLTLLDAGIYQCIAENAHGUIYANAELKILALAPTFEFTEMRRKVLAAK 4	14
Maus	320	KHQARIYVQASPEWVEHINDTEVDIGSDLYWPCIATGKPIPTIRWLKNGVSYEKG-BLRLQGUTFEDAGMYQCIAENAYGSIYANAELKILALAPTFEMPMKKKILAAK 4	28
Huhn	311	KHQARVYVQASPEWVEHINDTEVDIGSDLYWPCVATGKPIPTIRWLKNGVSYEKG-BLRLQGUTFEDAGMYQCIAENAYGSIYANAELKILALAPTFEMPMKKKILAAK 4	19
human	320	KHQARVYVQASPEWVEHINDTEVDIGSDLYWPCVATGKPIPTIRWLKNGVSFRKG-BLRLQGUTFEDAGMYQCIAENAYGSIYANAELKILAAFTFEMPMKKKILAAK 4	28
Zebrafisch Xenopus Maus Huhn human	439 415 429 420 429	NGRVVFECRPRAAERPNITWSKGTELLENSSRISIWLDGSLELLNISKSDECKYTCFAENDRGRANSTGSLSITDATKITLAPSNADVSVGEDARMECVASHDBGLDLT5 GGRVIIECKPRAAERAKFSWSKGTELLINNSSRIJUDGSLEIINITKLDEGSYTCTAENDRGRANSTGTLVISVTAATXITLAPSNADVTVCENATMOCNASHDBTLDLSV GGRVIIECKPRAAERPKFSWSKGTEMUNSSRIJIWDGSLEINNITRNDGGTYTCFAENNRGKANSTGTLVITNETRILAPINADT GGRVIIECKPRAAERPKFSWSKGTELVNGSRIJIWDGSLEIINTRDDGGTYTCFAENNRGKANSTGTLVITNETRILAPINADT GGRVIIECKPRAAERPKFSWSKGTELVNGSRIJIWDGSLEIINTRNDGGTYTCFAENNRGKANSTGTLVITNETRILAPINADT GGRVIIECKPRAAERPKFSWSKGTEMUNSSRIJIWDGSLEIINTRNDGGTYTCFAENNRGKANSTGTLVITDFRIILAPINADT TVGENATMOCTASHDETLDIF 5.	48 24 38 29 38
Zebrafisch	549	IWSEDGHTIDLORDACHYORKMOSASG-TSSSELLITHTOLRHAGRYSCTAQTEVDNTTASAELVVRGPPGPGGVRVDEVTSDSVRVIWSHGTDNLSPISRYTVOLR 6	55
Xenopus	525	IWSINGFFIEDDWEDRHYERAIRLELONDVGSELIIKNAOLKHAGRYTCTAQTIVDNSSASADLVVRGPPGPGGCRVEELRDTSVKLTWSGGTDNHOPISKYNDQXR 6	32
Maus	539	WWSENGYVIDENKBITHIHYORNEMLDANGELLIRWQLKHAGRYTCTAQTIVDNSSASADLVVRGPPGPGGERIEDIRATSVALTWSRGSDNHSPISKYTIQTK 6	44
Huhn	530	IWSINGSVIDESKBHEHYERNYMIIGNGELLIRWQLKHAGRYTCTAQTIVDNSSASADLVVRGPPGPGGERIEDIRATSVALTWSRGTDNHSPISKYTIQTK 6	33
human	539	WWSENGYVIDENKBIIHYERNYMIIGNGELLIRWQLKHAGRYTCTAQTIVDNSSASADLVVRGPPGPGGERIEDIRDTSVALTWSRGTDNHSPISKYTIQTK 6	42
Zebrafisch Xenopus Maus Huhn human	656 633 645 634 643	ESAAQQDWRDAATSEVNVEGNAEMATVVNELPWNEYEFTVIATNTLGTGEPSEPSPKTTTREARPTVAPSDIGGGGGTSRELTITWTEVQSQYYYGSNFGYILAFKPHNO N-ILSDDWKDWKTENENENEEGMEMARVIDLIPWWDYSFRVIATNTLGVGEPSIPSPKIENEGAAPIIVAPAEVGGGGGNRELTITWTEVQSQYYYGSNFGYILAFKPFNV I-ILSDDWKDAKTDPFIIGNMESAKAVDIIPWMEYEFTVATNTLGTGEPSIPSNRIKTDGAAPNVAPSDVGGGGGNRELTITWAPLSREYHYGNFGYIVAFKPFGE F-ILSDDWKDAKTDPFIIGNMESAKAVDIIPWMEYEFTVATNTLGTGEPSYPSCRIETEGAPINVAPSDVGGGGGNRELTITWAPLSREYHYGNNFGYIVAFKPFGE F-ILSDDWKDAKTDPFIIGNMESARVIDIIPWMEYEFTVATNTLGTGEPSYPSCRIETEGAPINVAPSDVGGGGGNRELTITWAPLSREYHYGNNFGYIVAFKPFGE F-ILSDDWKDAKTDPFIIGNMESARVIDIIPWMEYEFTVATNTLGTGEPSYPSCRIETEGAPINVAPSDVGGGGGNRELTITWAPLSREYHYGNNFGYIVAFKPFGE F-ILSDDWKDAKTDPFIIGNMESARVIDIIPWMEYEFTVATNTLGTGEPSYPSCRIETEGAPINVAPSDVGGGGGNRELTITWAPLSREYHYGNNFGYIVAFKPFGE F-ILSDDWKDAKTDPFIIGNMESARVIDIIPWMEYEFTVATNTLGTGEPSYPSCRIETEGAPINVAPSDVGGGGGNRELTITWAPLSREYHYGNNFGYIVAFKPFGE F-ILSDDWKDAKTDPFIIGNMESARVIDIIPWMEYEFTVATNTLGTGEPSYPSCRIET	65 41 53 42 51
Zebrafisch	766	PEWLRVTVTDPEVOKYVHKDPKIPPSTREEVKWKAFNSCEGEPESNSAFIYSAQDVEAEAPIITEARALSATBAIVINVPVOLPTVERYGVRYWRESVENBASACRVLVS	75
Xenopus	742	REWREVIYSNEBSEEYVHKDFIITEARGFOIKVKAFNKVERGPYSSTVWYYSAEDVETEAPIAVVNILSSTEVSVAWHPVYSKSIBEYGORYWRE-ODKBAAAHRVOVK 8	50
Maus	754	ESWKKVTVTNEDTGRYVHKDETMTPSTAFQVKVKAFNNKGGPYSLVAVINSAQDAPSEAPTEVGVKVLSSSEISVHMKHVLEKIVESYQIRYWAG-HDKEAAAHRVOVK 8	62
Huhn	743	REWREVTVTNEDIGRYVHKDESMPSTGYQVKVKAFNNKGGGPSSITAVIYSAQDAPESAPTEVGVKVLSSSEISVSMHHTEKSVESYQIRYWAA-HDKEAAAGRVGVS 8	51
human	752	ESWKKVTVTNEDIGRYVHKDESMPSTGYQVKVKAFNNKGGGPSSLTAVIYSAQDAPESAPTEVGVKVLSSSEISVSMHHTEKSVESYQIRYWAA-HDKEAAAGRVGVS 8	60
Zebrafisch	876	SRENHTRIDNMKPDSHYLVEVRACNSAGYGPASORNRIYTKKSPPSRPPRIISTKMHYGGSSINLAMEKVESINNESTVAGYKVLYROHGOPSETLYTTEROSIDLEMR 91	85
Xenopus	851	AADITTREESEVENTHYNLEVRAENSAEDGEESRTLTFLERKAPESORFOITSAVR-YGSOVIITWEHVALGSSINLAMEKVESINNESKVULYRODGORDGKLYTTERGSIDLEMR 91	58
Maus	863	SOEYSARLENULPDIOYFIEVGACNSAGCGESSDVIETFTRKAPESORPRIISSVR-SGSRYIITWOHVVALSNESTVTGYKL	70
Huhn	852	NOEYSTKLENUKENTRYFIDVSAENSAGYGEESRTIDIIERKAPESORPRIISSVR-SGSRYIITWOHVVALSNESTVTGYKULYRPDGOHDGKLESTEKHSIEVFIPR 9	59
human	861	SOEYSARLENULPDIOYFIEVGACNSAGCGEESRTIDIIERKAPESORPRIISSVR-SGSRYIITWOHVVALSNESTVTGYKULYRPDGOHDGKLESTEKHSIEVFIPR 9	68
Zebrafisch	985	GEYIVEVRAHSEGGDGAVAQVFITGSAPAPALASALDLPLDWTEML 1032	
Xenopus	959	EGEYVVEVRAHSEGGDGAVADIKISGATGILEGFLGVLLPILSLEWYLEF 1009	
Maus	971	DGEYVVEVRAHSEGGDGWSQVKISGV9T-LSSELUELLPSLGEUYSEF 1020	
Huhn	960	DGEYVVEVRAHSEGGDGVSQVKISGAPT-LSSELUELLPAGGIWYEF 1010	
human	969	DGEYVVEVRAHSEGGDGVSQVKISGAPT-LSSELUELLPAGGIWYEF 1018	

Abb. 4.3: Abgeleitete Aminosäuresequenz der Zebrafisch F3 cDNA und Sequenzvergleich mit F3homologen aus anderen Vertebraten. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Schwarze Balken geben die Immunglobulin-Domänen an, graue Balken zeigen Fibronektin-Typ-(III)-ähnliche Domänen an. Der gepunktete weiße Balken markiert das Signalpeptid. Die Bindungsstelle für den GPI-Anker ist durch einen gestreiften Balken gekennzeichnet.

4.3 F3 Expression in der frühen larvalen Entwicklung

Durch *in situ* Hybridisierung an ganzen Larven wurde mit einer F3 Sonde die Expression des neuen Gens zwischen 10 hpf und 24 hpf untersucht. F3 mRNA war erstmals nach 16 hpf im Trigeminalisganglion und in Rohon-Beard-Zellen detektierbar (Abb. 4.4 A und B). Zwischen 18 hpf und 24 hpf war die Färbung in diesen Zelltypen am stärksten (Abb. 4.4 C-E). Darüber hinaus war rostral des otischen Vesikels eine Expression in einer Zellpopulation zu erkennen. Dabei handelte es sich um Neuronen des anterioren Seitenlinienganglions und des akustisches Ganglions. Neurone anderer Ganglien waren zu diesem Zeitpunkt nicht gefärbt. Im Stammhirn waren mindestens sechs Zellhaufen schwach gefärbt. Bei diesen Zellen handelte es sich vermutlich um sich differenzierende Neuronen, die aus den Rhombomeren

hervorgegangen waren. Im Tegmentum war eine schwache Expression im Nukleus des medialen longitudinalen Faszikels detektierbar, sowie in Zellen des dorsalen Diencephalons, die vermutlich die Epiphyse darstellten. Weitere Expressionsdomänen waren in davon anterior liegenden Bereichen nicht gefärbt.

Im Rumpf von 24 hpf-Larven exprimierten Motoneuronen am ventralen Rand des Rückenmarks geringe Mengen an F3 mRNA. Rohon-Beard-Zellen am dorsalen Rand des Rückenmarks waren dagegen sehr stark gefärbt (Abb 4.4 E). Eine Kontrolle der *in situ* Hybridisierung erfolgte mit einer F3 *sense*-Sonde. In den Kontrollen war keine F3 mRNA-Färbung sichtbar (Abb. 4.4 F). Außerhalb des Nervensystems wurde keine F3 mRNA-Expression detektiert.



Abb. 4.4: F3 wird in Zebrafischlarven von einer Subpopulation von Neuronen exprimiert. *In situ* Hybridisierungen von Zebrafischlarven mit einer F3-Sonde (rostral ist links). (A und B): Bei 16 hpf wird F3 im Trigeminalisganglion (tg) in (A) und in Rohon-Beard-Zellen (Pfeile in B) exprimiert. (C und D): (C) ist eine Seitenansicht vom Stammhirn einer 24 hpf-Larve und (D) eine dorsale Ansicht. Die stärkste Färbung befindet sich im Trigeminalisganglion (tg). Eine schwächere Färbung ist im anterioren Seitenlinienganglion/akustischen Ganglion (al/ac) detektierbar. Zellhaufen im Stammhirn (Pfeile) sind ebenfalls schwach gefärbt. (E und F): Seitenansicht vom Rumpf zweier 24 hpf-Larven. Starke F3 mRNA-Expression findet in Rohon-Beard-Zellen (Pfeilköpfe) des Rückenmarks statt, Motoneurone (Pfeile in E) sind schwach gefärbt. In situ Hybridisierung mit einer sense-Sonde (F) zeigt keine Färbung im Rumpf einer 24 hpf-Larve. (ov) otisches Vesikel. Die Länge des Maßstabes in (E) beträgt 50 μm für (A, C-F) und 25 μm für (B).

4.3.1 F3 Expression in postmitotischen Neuronen

Die Identität der F3 mRNA positiven Zellen als Neuronen wurde durch die Kombination einer *in situ* Hybridisierung mit einer F3-Sonde und einer anschließenden Tubulinfärbung festgestellt (Abb. 4.5). Tubulin ist ein zytoskeletales Protein neuronaler Zellen und färbt vor allem deren Fortsätze. Die in die Epidermis wachsenden Axone von Neuronen des Trigeminalisganglions wurden durch anti-Tubulin-Antikörper gefärbt (Abb. 4.5 A). Die zentralen Axone der F3 mRNA positiven Rohon-Beard-Zellen vereinigen sich mit dem dorsalen longitudinalen Faszikel. Sie waren ebenfalls Tubulin gefärbt (Abb. 4.5 B). Ebenso konnten die primären Motoneuronen durch die Färbung ihrer Axone identifiziert werden, die aus dem ventralen Rückenmark wachsen (Abb. 4.5 B, Einsatz).



Abb. 4.5: Identifizierung von F3 exprimierenden Neuronen durch Doppelfärbung mit Tubulin-Antikörper. In der Seitenansicht einer 24-hpf-Larve erscheint die F3-Färbung in neuronalen Somata purpurfarben und die gefärbten Axone braun. (A): Periphere Axone von F3 mRNA positiven Neuronen im Trigeminalisganglion (tg) sind durch Pfeile gekennzeichnet. (B): Die Pfeilköpfe deuten auf einige der F3 mRNA positiven Rohon-Beard-Zellen, die sich dorsal des dorsalen longitudinalen Faszikels (dlf) im Rumpf befinden. Die Pfeile markieren das zentrale Axon der Rohon-Beard-Zellen. Im Einsatz sind die Somata der Motoneuronen durch (*) gekennzeichnet. Sie sind schwach F3 mRNA positiv. Ihre Axone sind durch einen Pfeil markiert. Rostral ist links. Die Länge des Maßstabes in (A) beträgt 50 µm; in (B) 25 µm in (B) und 37,5 µm für den Einsatz.

4.3.2 Untersuchungen zur Regulation der Genexpression durch CLIM-Cofaktoren

Das Expressionsmuster von F3 ähnelte stark den Antikörperfärbungen von LIM-Domänen-Transkriptionsfaktoren des islet-(isl)-Typs und von LIM-Domänen-bindenden CLIM-Cofaktoren (Bach, 2000). Die Immunreaktivität von isl-Transkriptionsfaktoren ist in Rohon-Beard-Zellen und im Trigeminalisganglion sehr stark, im Gegensatz zu einer schwächeren Färbung in Motoneuronen und im anterioren Seitenlinienganglion/akustischen Ganglion (Becker et al., 2002;Korzh et al., 1993). Ebenso ist die Immunreaktivität des CLIM-Cofaktors in Rohon-Beard-Zellen und im Trigeminalisganglion besonders stark, abgesehen von einer weiteren Verteilung des Cofaktors im gesamten Nervensystem (Becker et al., 2002). Diese Befunde ließen die Vermutung zu, dass aufgrund der überlappenden Expressionsmuster, die Regulation von F3 abhängig von CLIM ist. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde RNA in frisch befruchtete Zebrafischeier injiziert, aus der ein verkürztes CLIM-Protein translatiert wird, das dominant-negativ wirkt (DN-CLIM; (Bach et al., 1997;Bach et al., 1999;Ostendorff et al., 2002)). Anschließend wurde mit den injizierten Larven 24 Stunden nach der Befruchtung eine in situ Hybridisierung mit einer F3-Sonde durchgeführt, um die Expression des Gens zu überprüfen. Sowohl die Anzahl F3 mRNA positiver Zellen im Trigeminalisganglion und in Rohon-Beard-Zellen, als auch die Intensität der Färbung, war in DN-CLIM injizierten Larven stark reduziert im Vergleich zu Wildtyp-Larven (Abb. 4.6). Parallel dazu wurden Kontrollen an 24

hpf-Larven mit L1.1- bzw. L1.2-Sonde durchgeführt. Diese beiden neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie sind mit F3 verwandt (Kap. 1.2) und werden in postmitotischen Neuronen exprimiert, unter anderem auch im Trigeminalisganglion und in Rohon-Beard-Zellen.

Die Verringerung der mRNA-Expression von F3, L1.1 und L1.2 in Neurone des Trigeminalisganglions wurde quantifiziert, indem nur die gefärbten Zellen auf der oberen Seite der lateral eingebetteten Larven gezählt wurden. Das Trigeminalisganglion auf der unteren Seite konnte wegen des darüberliegenden Gewebes nicht vollständig fokussiert werden. Die durchschnittliche Anzahl gefärbter Zellen pro Ganglion wurde angegeben.



Abb. 4.6: Die Injektion von DN-CLIM führt zu einer starken Reduktion der F3 mRNA Expression bei 24 hpf. (A und B):*In situ* Hybridisierungen an ganzen Larven mit F3- bzw. L1.1-Sonde. In der Seitenansicht (rostral ist links) einer Wildtyp-Larve sind einige stark gefärbte F3 mRNA positive Neuronen des Trigeminalisganglions zu sehen (Pfeil in A). In DN-CLIM injizierten Larven sind dagegen nur einige Neuronen schwach gefärbt (Pfeil in B). (C und D): In der Seitenansicht des Rumpfes sind in Wildtyp-Larven Rohon-Beard-Zellen stark F3 mRNA positiv (Pfeile in C), nicht aber in DN-CLIM injizierten Larven (D). (E und F): In der gleichen Ansicht wie in (C und D), färbt die L1.1 Sonde Rohon-Beard-Zellen (Pfeile) und ventral liegende kommissurale Neuronen des Rückenmarks (Pfeilköpfe), ohne detektierbare Unterschiede zwischen Wildtyp- (E) und DN-CLIM-injizierten Larven (F). (G und H): Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der Neuronen, die im Trigeminalisganglion (G) die angegebene mRNA exprimieren (für Wildtyp- und DN-CLIM-injizierte Larven). Entsprechend auch für Rohon-Beard-Zellen (H). Die n-Zahl der untersuchten Larven ist unter jeder Säule angegeben. (*)=statistische Signifikanz. Die Länge des Maßstabes in (F) beträgt 50 µm für (A-F).

Die durchschnittliche Anzahl F3, L1.1 oder L1.2 mRNA-positiver Rohon-Beard-Zellen wurde bestimmt, indem die gefärbten Zellen in den vier Rumpfsegmente caudal des Dotterfortsatzes pro Larve ausgezählt wurden. Im letzteren Fall wurden die Rohon-Beard-Zellen auf beiden Seiten der Larven gezählt, da die Larven an dieser Stelle dünn genug waren. Die Untersuchung der DN-CLIM-injizierten Larven ergab, dass die durchschnittliche Anzahl der F3 mRNA positiven Neuronen im Trigeminalisganglion auf 38% reduziert war, im Vergleich zu Wildtyp-Larven. (Abb. 4.6 A, B und G; DN-CLIM: $6,8 \pm 1,36$ SEM Zelle/Larve, n=13 Larven; wt: 17,6 ± 1,33 SEM, n=9 Larven; Mann-Whitney U, P=0,0003).

Ebenso war die durchschnittliche Anzahl der L1.1 bzw. L1.2 mRNA positiven Neuronen im Trigeminalisganglion signifikant reduziert, wenn auch in einem geringeren Ausmaß. Im Falle von L1.1 waren immer noch 62% der Neuronen gefärbt (Abb. 4.6 G; DN-CLIM: 13.6 ± 1.46 SEM Zellen/Larve, n=7 Larven; wt: $22,0 \pm 1,61$ SEM, n=10 Larven; Mann-Whitney U, P=0,0028). 66% der Neuronen im Trigeminalisganglion exprimierten nach einer Injektion von DN-CLIM immer noch L1.2 (Abb. 4.6 G; DN-CLIM: 14,3 ± 1,65 SEM Zellen/Larve, n=8 Larven; wt: $21,4 \pm 0,81$ SEM, n=5 Larven; Mann-Whitney U, P=0,0098). In den Rohon-Beard-Zellen war die Zahl von F3 mRNA positiven Zellen ähnlich stark reduziert (Abb. 4.6 C, D und H). Im Vergleich zu Wildtyp-Larven reduzierte sich die Zahl F3 exprimierender Rohon-Beard-Zellen um 34% nach Injektion von DN-CLIM (DN-CLIM: 6,1 \pm 0,77 SEM Zellen/Larve, n=14 Larven; wt: 18,1 \pm 1,41 SEM, n=9 Larven; Mann-Whitney U, P=0,0003). Die Anzahl der L1.1 mRNA positiven Rohon-Beard-Zellen war dagegen nicht reduziert (Abb. 4.6 E, F und H: DN-CLIM: $22,7 \pm 0.93$ SEM Zellen/Larve, n=9 Larven; wt: $22,3 \pm 1,11$ SEM, n=10 Larven). Die geringe Reduktion in der Anzahl von L1.2 mRNA positiven Rohon-Beard-Zellen (auf 81% im Vergleich zu wt) war nicht statistisch signifikant (Abb. 4.6 H; DN-CLIM: 10.8 ± 0.59 SEM Zellen/Larve, n=10 Larven; wt: 13.4 ± 1.15 SEM, n=7 Larven; Mann-Whitney U, P=0,1).

4.4 Funktionelle Analyse des F3 Gens

Um die Funktion von F3 während der Axonogenese zu untersuchen wurde ein Überexpressionsvektor konstruiert aus dem RNA *in vitro* transkribiert und in frisch befruchtete Zebrafischeier injiziert wurde. Die Detektion des ektopischen Proteins sollte über den Nachweis des kovalent gebundenen Myc-Epitops erfolgen. Allerdings konnte keine Expression der injizierten RNA festgestellt werden (s. auch Kap. 4.9). Ebenso erfolglos waren Experimente zur Inhibition der Translation der entsprechenden mRNA durch die Injektion von genspezifischen Morpholinos. Zwei verschiedene Morpholinos (F3MO und F3MO2), die komplementär zum 5'-Ende der cDNA waren, wurden getestet. Siebenundzwanzig Stunden nach der Befruchtung wurde der Phänotyp durch eine Immunfärbung gegen Tubulin untersucht (F3MO, 8 ng, n=98; F3MO, 16 ng, n=31; F3MO2, 8 ng, n=48; F3MO2, 16 ng, n=13; F3MO+F3MO2, je 8ng, n=17). Insbesondere wurde dabei auf das Wachstum der peripheren Fortsätze der Rohon-Beard-Zellen geachtet, da vergleichbare Experimente in *Xenopus laevis* hier bereits ein verschlechtertes Auswachsen ersichtlich werden ließen (Fujita et al., 2000).

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Befunden ließ sich daher F3 keine Funktion bei der Entwicklung des ZNS des Zebrafisches zuweisen.

4.5 F3 Expression in der späten larvalen Entwicklung

Die Expression von F3 mRNA wurde auch zu späteren Entwicklungsstadien insbesondere in der optischen Projektion von 5 dpf- und 4 wpf-Larven durch *in situ* Hybridisierung untersucht. Eine schwache Färbung konnte im gesamten Gehirn von 5 dpf-Larven festgestellt werden (Abb. 4.7 A) und deutete auf eine konstitutive basale Expression von F3 in diesem Entwicklungsstadium hin, wenn auch auf einem niedrigen Niveau. In den verschiedenen Schichten der Retina wurde F3 ebenfalls exprimiert, auch in den Retinaganglienzellen, die sich zwischen 30 hpf und 35 hpf zu differenzieren beginnen und mit ihren Axonen zum optischen Tektum projezieren, sowie in der Schicht der amakrinen Zellen. Weitere Expressionsdomänen während der späten larvalen Entwicklung fanden sich u.a. in den bereits beschriebenen Neuronen des Trigeminalisganglions.

In 4 wpf-Larven war die F3-Expression im Gehirn bereits auf einem basalen Niveau. Allerdings hat in dieser Phase der Entwicklung die Myelinisierung bereits eingesetzt und die Axone der Retinaganglienzellen sind weitgehend myelinisiert. In diesem Stadium ließen sich Gliazellen entlang der optischen Projektion im Sehnerven (Abb. 4.7 D) im optischen Trakt (Abb. 4.7 E) und im optischen Tektum (nicht gezeigt) mit einer F3-Sonde stark anfärben. Innerhalb der Retinaganglienzellschicht, in der Nähe des optischen Nervkopfs, befanden sich Zellen, die sich durch eine F3-Sonde färben ließen (Abb. 4.7 F). Eine Expression von F3 in nur einigen wenigen Retinaganglienzellen schien eher unwahrscheinlich. Die Lage und die Größe dieser F3 mRNA positiven Zellen innerhalb der Retinaganglienzellschicht ließ dagegen auf intraretinale Gliazellen schließen.



Abb.4.7: F3 Expression in der optischen Projektion in späten larvalen Entwicklungsstadien des Zebrafischhirns. *In situ* Hybridisierung mit einer F3-Sonde an Kryostatschnitten von 5 dpf- (A-C) und 4 wpf-Larven (D-F). (A): Im gesamten Gehirn einer 5 dpf-Larve wird F3 schwach exprimiert. In der Schicht der Retinaganglienzellschicht (*) wird F3 ebenfalls exprimiert. Eine *sense*-Sonde (B) zeigt keine Färbung. (C): Vergrößerung des Auges einer 5 dpf-Larve. (*) markiert die Retinaganglienzellschicht. Bei 4 Wochen alten Larven wird in der optischen Projektion F3 von Gliazellen im Sehnerven (D) und im optischen Trakt (E) exprimiert. In der Nähe des optischen Nervkopfs wird F3 von intraretinalen Gliazellen exprimiert (Pfeile in F). Die Länge des Maßstabes in (B) beträgt 50 μm für (A und B); in (E) 25 μm für (C-F).

4.6 F3 Expression während der Regeneration

4.6.1 F3 Expression während der Regeneration des optischen Nerven

Retinaganglienzellen exprimierten in der adulten Retina geringe Mengen F3 mRNA (Abb. 4.8 B). Eine Woche nach der Läsion des optischen Nerven ging das Wiederauswachsen der lädierten Retinaganglienzellaxone mit einer erhöhten F3 Expression in Retinaganglienzellen im Vergleich zum unlädierten Auge einher (Abb. 4.8 B und C). Der zeitliche Verlauf der F3 Expression in Retinaganglienzellen nach einer Läsion des optischen Nerven wurde zwischen 2 dpl und 180 dpl genauer untersucht. Es stellte sich heraus, dass bereits 2 Tage nach der Läsion eine Hochregulation von F3 in Retinaganglienzellen einsetzt, die nach einer Woche ihr Maximum erreichte (Abb. 4.8 C) und nach einem Monat deutlich reduziert war. 30 Tage nach der Läsion war die Expression auf einem nicht mehr detektierbaren Niveau. Die einzigen Zellen, die F3 mRNA in der adulten Retina stark exprimierten waren Gliazellen in der Nähe des optischen Nervkopfs, die bereits vier Wochen nach der Befruchtung mit einer F3-Sonde detektierbar waren (Pfeile in Abb. 4.8 A und Abb. 4.7 F). Eine deutliche Hochregulation von F3 erfolgte eine Woche nach der Läsion von Gliazellen im lädierten optischen Nerven und zwar rostral und caudal der Läsionsstelle (Abb. 4.8 E). Die Färbung dieser Zellen war auch einen Monat nach der Läsion deutlich sichtbar, aber bereits 3 Monate nach der Läsion färbte eine F3-Sonde diese Zellen nur noch schwach (nicht gezeigt).



Abb. 4.8: Expression von F3 mRNA in Retinaganglienzellen und im optischen Nerven während der Regeneration des adulten Auges. *In situ* Hybridisierung mit einer F3-Sonde an Kryostatschnitten des Auges und des Sehnerven adulter Zebrafische eine Woche nach der Läsion. (A): In der Retina des Kontrollauges wird F3 von einigen Gliazellen in der Nähe des optische Nervkopfs und im intraretinalen Bereich des optischen Nervs (*) exprimiert. (B und C): In der Retinalganglienzellschicht (Pfeil in B) des unlädierten Auges ist F3 mRNA in geringen Mengen detektierbar. Dagegen findet in der lädierten Retina eine starke Hochregulation in Retinaganglienzellen statt (Pfeil in C). (D): Der optische Nerv einer Kontrolllarve zeigt keine Färbung mit einer F3-Sonde. Die Pfeilköpfe markieren Pigmentzellen. Dagegen wird F3 im lädierten optischen Nerven (E) von Gliazellen stark hochreguliert (Pfeile). Der große Pfeil in (E) deutet auf die Läsionsstelle hin. Die Retinalganglienzellschicht in (B und C) ist oben, in (D und E) ist die Retina links. Die Länge des Maßstabes in (A) beträgt 50 μm; in (E) 25 μm für (B-E).

4.6.2 Transiente Hochregulation von F3 im lädierten optischen Trakt

Die F3 Expression im lädierten optischen Trakt wurde ebenfalls zwischen 2 und 180 Tagen nach der Läsion durch in situ Hybridisierung untersucht. Eine schwache Hochregulation war bereits zwei Tage nach der Läsion des optischen Nerven detektierbar, wenn auch nur in einigen wenigen Zellen (Abb. 4.9 B). Dagegen fand bereits eine Woche nach der Läsion eine starke Hochregulation im gesamten optischen Trakt statt (Abb. 4.9 C). Sowohl die Anzahl der F3 mRNA positiven Zellen als auch die Intensität ihre Färbung war sehr hoch. Allerdings handelte es sich um eine transiente Hochregulation von F3: einen Monat nach der Läsion war immer noch eine große Zahl F3 mRNA positiver Zellen im lädierten optischen Trakt detektierbar (Abb. 4.9 D), die Expression ging dann aber im weiteren Verlauf der Regeneration der optischen Projektion allmählich zurück. Dieser Befund bestätigte sich auch durch die Auszählung von F3 exprimierenden Zellen in einer definierten Region des optischen Trakts zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Läsion (Abb. 4.9 K). Dabei wurden gefärbte Zellen auf der Höhe des prätektalen Komplexes ausgezählt und auf die Fläche dieser Region im optischen Trakt bezogen. Nach drei Monaten waren kaum noch F3 exprimierende Zellen vorhanden (Abb. 4.9 E) und 6 Monate nach der Läsion war F3 mRNA im optischen Trakt nicht mehr detektierbar (nicht gezeigt). Auch im optischen Tektum, wo die Axone der Retinaganglienzellen projezieren, fanden sich F3 hochregulierende Gliazellen (Abb. 4.9 J). In den Kontrollen waren im optischen Tektum keine F3 mRNA-positiven Zellen detektierbar (Abb. 4.I).

Bei den Zellen, in denen F3 hochreguliert wurde, handelte es sich offenbar um Gliazellen, weil keine Neurone im optischen Nerven und Trakt vorhanden sind. Um die Identität dieser Zellen genauer zu charakterisieren, wurden die Schnitte direkt nach der *in situ* Hybridisierung einer Immunfärbung mit einem Antikörper gegen Makrophagen/Mikroglia gefärbt. Es stellte sich heraus, dass es sich bei den F3 mRNA positiven Zellen im optischen Trakt nicht um Mikrogliazellen handelte, da die Färbemuster nicht überlappten (Abb.: 4.9 F-H). Zusätzlich wurde eine Immunfärbung mit einem Antikörper (anti-GFAP) durchgeführt, der Astrozyten erkannte (nicht gezeigt). Auch in diesem Falle wurde keine Colokalisation zwischen F3 mRNA positiven Zellen des lädierten optischen Traktes und GFAP-positiven Zellen festgestellt. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass es sich möglicherweise um Oligodendrozyten handelte, in denen während der Regeneration der lädierten optischen Projektion F3 transient hochreguliert wurde.

	unlädierter Trakt	2 dpl	7 dpl	30 dpl	90 dpl	180 dpl
Zellen/mm ²	0	212±59	1333±296	909±146	82±20	37±19
n (Trakte)	3	6	3	3	6	3
Р	-	0,056	0,011	0,003	0,01	0,122

Tab. 4.2: Quantifizierung der F3 mRNA positiven Zellen im lädierten optischen Trakt. Die Signifikanz (P-Wert) ist nach dem Mann-Whitney-U-Test berechnet worden.



Abb. 4.9: F3 wird während der Regeneration des adulten optischen Nerven hochreguliert. (A-E und I,J): *in situ* Hybridisierung mit einer F3-Sonde an Kryostatschnitten adulter Gehirne nach einer Läsion des optischen Nerven. (A): F3 ist im unlädierten optischen Trakt nicht detektierbar. (B): Zwei Tage nach der Läsion wird F3 von wenigen Gliazellen und in geringem Maße im optischen Trakt hochreguliert. (C): Nach einem Monat sind im gesamten optischen Trakt F3 exprimierende Zellen detektierbar (Pfeile). Die Expression F3 exprimierender Zellen geht im weiteren Verlauf zurück (D und E). Während einen Monat nach der Läsion (D) F3 mRNA im gesamten optischen Trakt detektierbar ist, wird F3 drei Monate nach der Läsion nur noch vereinzelt von einigen Gliazellen exprimiert (E). (F-H): F3 hochregulierende Zellen im lädierten optischen Trakt sind keine Mikroglia. Der schwarze Pfeilkopf kennzeichnet eine F3 exprimierende Zelle. Die Färbung überlappt nicht mit Signal der Immunfärbung gegen mikrogliale Zellen (weißer Pfeilkopf). (I und J): Hochregulation von F3 im lädierten optischen Tektum. In (I) markiert der Pfeil den dorsalen Rand des unlädierten optischen Tektums (30 dpl). Im gleichen Gehirn wird auf der lädierten Seite des optischen Tektums (J) F3 von Gliazellen hochreguliert. (K): Die Hochregulation von F3 ist transient. Sie erreicht ihr Maximum bei 1 dpl und geht allmählich wieder zurück. Die Länge des Maßstabes in (E) beträgt 50 μm für (A-E); in (J) 25 μm für (I und J).

4.6.3 F3 Expression nach einer Läsion des Rückenmarks

Um zu überprüfen, ob das Wiederauswachsen von spinalen Axonen von Neuronen im Hirn nach einer Axotomie ebenfalls mit einer erhöhten Expression von F3 einher geht, wurde adulten Zebrafischen das Rückenmark durchtrennt und das F3 Expressionsmuster 6 bzw. 14 Tage nach der Läsion durch *in situ* Hybridisierung an 50 µm-Schnitten des Hirnstammes analysiert. Es stellte sich heraus, dass in Nukei des Hirnstammes mit deszendierenden lädierten Axonen die Expression von F3 in ähnlicher Weise verändert war wie in Retinaganglienzellen. Die axotomierten Neurone konnten dabei durch retrograde Farbstofffüllung (Kap. 3.7.8) visualisiert werden (Abb. 4.10 A-F).

Eine erhöhte F3 Expression konnte im Nukleus des medialen longitudinalen Faszikels (NMLF, Abb. 4.10 A-C) festgestellt werden. In unlädierten Fischen exprimierten hier nur wenige Neurone F3 konstitutiv auf einem niedrigen Niveau. Nach einer Läsion des Rückenmarks war eine erhöhte Expression in mehreren Neuronen des NMLF detektierbar (Abb. 4.10 B). Dorsal des NMLF färbte eine F3-Sonde, sowohl in unlädierten als auch in lädierten Fischen (vergl. Abb. 4.10 A und B), Neurone im Cerebellum. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Purkinje-Zellen, die offenbar F3 konstitutiv exprimierten, denn die Axone dieses neuronalen Zelltyps waren durch die Läsion nicht betroffen. Deshalb waren diese Zellen eine interne Positiv-Kontrolle. In der intermediären retikularen Formation (IMRF) war ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression in axotomierten Neuronen detektierbar (vergl. Abb. 4.10 D und E). Bei unlädierten Kontrollen war hier kaum F3 mRNA detektierbar (Abb. 4.10 D).

Die Vermutung, dass in axotomierten Neuronen des Hirnstammes beim Wiederauswachsen der Axone eine erhöhte Expression von F3 einsetzt, konnte durch Fluoreszenzfärbung der lädierten Neurone bestätigt werden (Abb. 4.10 C und F). Deren Axone konnten mit RDA-Kristallen gefüllt werden, die sich im gesamten Neuron verteilten. Ihr Färbemuster überlappte weitgehend mit dem Färbemuster der *in situ* Hybridisierung, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die veränderte Expression von F3 mRNA in lädierten Neuronen betrachtet wurde.

Im Rückenmark konnte 14 Tage nach der Läsion ebenfalls eine Veränderung des Expressionsmusters caudal der Läsionsstelle festgestellt werden (Abb. 4.10 G und H). In unlädierten Fischen wurde F3 von Neuronen in der grauen Substanz exprimiert. Dabei handelte es sich vermutlich um Motoneuronen und, wie aus ihrer Lage und ihrer Größe entnommen werden konnte. Dagegen wurde F3 in rückenmarkslädierten Fischen in diesen Neuronen stark hochreguliert. Eine Hochregulation von F3 war aber auch in Gliazellen der weißen Substanz detektierbar (Abb. 4.10 H).

Abb. 4.10: F3 Expression in Hirnstammnuklei und im Rückenmark während der Regeneration im adulten Zebrafisch. (A und B): Die Expression von F3 wird im Vergleich zu einem unlädierten Kontrollfisch (A) 14 Tage nach der Läsion im Nukleus des medialen longitudinalen Faszikels (NMLF) hochreguliert (Pfeilköpfe in B). Die Pfeile in (A) deuten auf einige Neurone im NMLF, die F3 schwach exprimieren. Purkinje-Zellen im Cerebellum (*) exprimieren F3 konstitutiv. (C): Axotomierte Neurone des NMLF lassen sich durch retrograde Farbstofffüllung mit RDA fluoreszenzfärben (Pfeilköpfe). Das Färbemuster überlappt mit dem Färbemuster der *in situ* Hybridisierung mit einer F3-Sonde (Pfeilköpfe in B). (D-F): Axotomierte Neurone der intermediären retikularen Formation (IMRF) zeigen ebenfalls eine erhöhte F3 Expression (Pfeilköpfe in E und F) im Vergleich zu unlädierten Fischen (Pfeile in D). Die Pfeilköpfe in (B und C), bzw. (E und F), zeigen auf die selben Zellen. (G und H): F3 wird in der weißen Substanz des Rückenmarks hochreguliert. In einer unlädierten Kontrolle (G) wird F3 von einigen Motoneuronen (Pfeilköpfe) in der grauen Substanz konstitutiv exprimiert. Caudal der Läsionsstelle findet 14 Tage nach der Läsion eine Hochregulation von F3 in Gliazellen (Pfeile) der weißen Substanz und in Zellen der grauen Substanz statt. Alle Bilder sind Querschnitte, dorsal ist oben. Die Länge des Maßstabes in (F) beträgt 50 µm für (A-F); in (H) 25 µm für (G und H).



4.7 Die neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1 und L1.2

4.7.1 Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von L1.1 und L1.2

Die Aminosäuresequenzen von L1.1 war bisher aus Teilklonen bekannt. Im Verlauf dieser Arbeit wurde erstmals das vollständige L1.1 Gen kloniert. Im Zuge dieser Klonierung wurde ein ausführlicher Sequenzvergleich von L1.1 und L1.2 mit Mitgliedern der L1-Subfamilie aus anderen Spezies durchgeführt. Der Sequenzvergleich sollte dazu dienen, die beiden L1ähnlichen Moleküle als Mitglieder der L1-Subfamilie zu charakterisieren.

	zfL1.1	zfL1.2	gfL1 E587	hL1	hNr-CAM	hCALL	chNg-CAM	chNrCAM	chNeuro- fascin	mL1	mCHL1	rL1 (NILE)	rABGP/ Neurofascin	Drosophila Neuroglian
zfL1.1	-	40	58	34	32	30	32	33	30	34	30	34	28	26
zfL1.2	40	-	43	35	31	30	32	31	30	34	31	34	29	25
gfL1 E587	58	43	-	40	37	35	37	38	33	41	34	40	33	29
hL1	34	35	40	-	39	38	47	39	38	88	38	88	37	29
hNr-CAM	32	31	37	39	-	40	36	79	49	39	39	39	47	32
hCALL	30	30	35	38	40	-	34	40	39	38	83	38	38	28
chNg-CAM	32	32	37	47	36	34	-	36	34	46	35	46	34	28
chNr-CAM	33	31	38	39	79	40	36	-	49	39	41	39	47	32
chNeurofascin	30	30	33	38	49	39	34	49	-	38	37	38	74	32
mL1	34	34	41	88	39	38	46	39	38	-	38	97	36	30
mCHL1	30	31	34	38	39	83	35	41	37	38	-	38	36	28
rL1 (NILE)	34	34	40	88	39	38	46	39	38	97	38	-	36	30
rABGP/ Neurofascin	28	29	33	37	47	38	34	47	74	36	36	36	-	31
Drosophila Neuroglian	26	25	29	29	32	28	28	32	32	30	28	30	31	-

 Tab. 4.3: Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener L1-homologer Proteine aus verschiedenen

 Spezies. Die Angaben beziehen sich auf den Prozentsatz identischer Aminosäuren.

Beim Vergleich der Proteinsequenzen der L1-Subfamilie war keine herausragende Homologie von L1.1 oder L1.2 zu anderen Mitgliedern der L1-Subfamilie zu bemerken. Die Proteinsequenzen von L1.1 und L1.2 waren nur zu etwa 35% identisch zu L1 aus Säugern. Dieser Grad der Identität war aber eher die Regel innerhalb der L1-Subfamilie. Ausnahmen bildeten nur die L1-ähnlichen Moleküle sehr nah miteinander verwandter Spezies. Diese Befunde ließen den Schluss zu, dass die Domänenstruktur eines Proteins die Zugehörigkeit zur L1-Subfamilie kennzeichnete.

Keins der beiden Zebrafischhomologe war zu einem Vertreter einer anderen Spezies näher verwandt als das andere, so dass man schließen könnte es wäre das entsprechende Zebrafisch-Ortholog. Die größte Verwandtschaft von L1.1 und L1.2 bestand zum L1-Homolog des Goldfisches (E587). Darüber hinaus waren L1.1 und L1.2 zu nur 40% miteinander identisch.

4.7.2 Biochemische Charakterisierung von polyklonalen Antiseren gegen L1.1 und L1.2.

Die von der Firma Eurogentec erhaltenen Antiseren gegen L1.1 und L1.2 (Kap 3.4.4) wurden in Western Blot-Analysen mit Gesamt-Gehirnhomogenaten auf ihre Spezifität hin überprüft. Es stellte sich heraus, dass gegen die neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1 und L1.2 Antiseren generiert werden konnten. Damit war es möglich das ungefähre Molekulargewicht der Proteine zu bestimmen (Abb. 4.11).

Für L1.1 zeigte das entsprechende Antiserum auf Gehirnhomogenaten adulter Zebrafische eine starkes Signal bei ca. 200 kDa an. Daneben waren noch zwei niedermolekulare Fragmente bei ca. 150 kDa detektierbar. Für L1.2 zeigte das entsprechende Antiserum eine einziges Fragment, ebenfalls bei 200 kDa an.

Die Spezifität der erhaltenen Banden wurde überprüft, indem die Antiseren mit dem jeweiligen Peptid, das zur Immunisierung der Kaninchen verwendet wurde, präadsorbiert wurden. Während dieser Phase sollte der im Serum erzeugte Antikörper an das Peptid binden und abgesättigt werden. Ein so blockierter Antikörper sollte im anschließenden Western Blot keine Immunreaktivität mehr zeigen. Im Falle des Antiserums gegen L1.2 reichten bereits 250 ng des Peptids für eine vollständige Blockierung des Antiserums aus. Das Antikörper gegen L1.1 war dagegen schwerer zu blockieren. Auch bei einem Einsatz von 125 µg des Peptids lieferte das Serum immer noch ein schwächeres Signal bei 200 kDa, während die zwei niedermolekularen Banden kaum noch detektierbar waren. Die Spezifität des Antiserums konnte aber durch zusätzliche Experimente (Kap. 4.8.4) festgestellt werden.



Abb. 4.11: Western Blot zum Test der hergestellten Peptid-Antikörper gegen L.1 und L1.2.

Gehirnhomogenate (50 µg) adulter Zebrafische wurden aufgetragen. Der Antikörper gegen L1.1 (Bahn 1 und 2) erkennt drei Fragmente: ein Fragment bei ca. 200 kDa, und zwei weitere um 150 kDa (Pfeile). Der Antikörper lässt sich durch das Peptid teilweise blockieren. Die höhermolekulare Bande (Bahn 2) wird bei Blockierung des Antikörpers schwächer. Der Antikörper gegen L1.2 erkennt eine Bande bei 200 kDa, die sich bei Blockierung durch das entsprechende Peptid nicht mehr detektieren lässt.

4.7.3 Deglykosylierung von adulten Gehirnhomogenaten

Im weiteren Verlauf der Überprüfung der Spezifizität der Antiseren wurde überprüft, ob sich das Bandenmuster von L1.1 und L1.2 verändert, wenn das Gehirnhomogenat deglykosyliert wird. Wie bereits beschrieben (Kap 1.4) handelt es sich bei den neuralen Zelladhäsionsmolekülen um Glykoproteine. Die Glykosylierung ist unter anderem durch die Kopplung von HNK-1 an spezifischen Glykosilierungsstellen auf der Polypeptidkette gekennzeichnet (Kruse et al., 1984).





Abb. 4.12: Western Blot zur Überprüfung der Spezifizität der Peptid-Antikörper. Deglykosylierung von adulten Gehirnhomogenaten führt zu eine Verringerung der Molekulargewichte der höhermolekularen Fragmente, die durch die jeweiligen Peptid-Antikörper erkannt werden. Pro Bahn wurden 40 μg Gehirnhomogenat aufgetragen.

Mit dem Enzym N-Glycosidase F wurden die Proteine deglykosyliert. Dadurch verringerte sich das apperente Molekulargewicht der von den L1.1- und L1.2-Antikörpern angefärbten Proteinbanden (Abb. 4.12). Im Falle von L1.1 kam es gleichzeitig zu einer Abschwächung der detektierten Banden (s. auch Kap. 5.7) Eine Inkubation der Kontrollen (Kap. 3.4.5) bei 37^oC führte zu keiner Degradation des Gehirnhomogenats (nicht gezeigt). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Verringerung des Molekulargewichts ausschließlich auf die spezifische Abspaltung von Glykoepitopen zurückzuführen war und die Peptid-Antikörper Glykoproteine erkannten.

4.7.4 Zelluläre Lokalisation von L1.1 27 Stunden nach der Befruchtung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einem bereits vorhandenen polyklonalen Antiserum eine Immunfärbung gegen L1.1 durchgeführt. Das Bandenmuster, das dieses Antiserum in Western Bots lieferte, entsprach dem in der Abb. 4.11 dargestellten Bandenmuster für L1.1 (J. Feldner, pers. Mitteilung). Bisherige Expressionsanalysen von L1.1 stützten sich auf *in situ* Hybridisierungen mit einer L1.1-Sonde (Tongiorgi et al., 1995), oder auf Immunfärbungen gegen L1.1 mit einem kreuzreagierenden Antiserum gegen das Goldfischhomolog E 587 (Weiland et al., 1997). Das polyklonale Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen durch bakteriell exprimiertes L1.1 hergestellt (Labor Schachner). Die zelluläre Lokalisation des Proteins wurde hier an Kryostatschnitten von 27 hpf- (n=16), 3 dpf- (n=12) und 5 dpf-Larven (n=10) analysiert (Abb. 4.13-4.15). Die hier dargestellten immunhistologischen Färbungen dienten gleichzeitig zum Nachweis der erfolgreichen Inhibition der Translation von L1.1 mRNA bei der Funktionsanalyse des Gens (Kap. 4.8). Die Detektion erfolgte mit einem fluoreszierenden sekundären Antikörper (Cy3).



Abb. 4.13: Immunfärbung mit einem polyklonalen Antiserum gegen L1.1. Dargestellt sind der Kopf (A und D) in einer dorsalen Ansicht und der Rumpf (B, C und E) einer Std.Ctl.MO-injizierten Larve (A-C) und einer L1.1MO-injizierten Larve (D und E) in einer lateralen Ansicht bei 27 hpf. In der Kontrolllarve ist L1.1 auf den Axonen der posterioren Kommissur (Pfeil in A) und des dorso-ventralen diencephalen Traktes lokalisiert (Pfeilköpfe). Die angeschnittene anteriore Kommissur ist durch (*) gekennzeichnet. In einer lateralen Ansicht des Rumpfes einer Kontrolllarve (B) färbt das Antiserum die Axone der caudalen primären Motoneurone (Pfeile) und den medialen longitudinalen Faszikel (Pfeilköpfe). (C): Der Seitenliniennerv (Pfeil) und die Rohon-Beard-Zellen (Pfeilköpfe) sind ebenfalls L1.1-positiv. In einer L1.1MO-injizierten Larve ist das Protein weder im Gehirn (D) noch im Rumpf (E) detektierbar. Die Larven wurden mit einem konfokalen Mikroskop untersucht. Die Länge des Messbalkens in (E) beträgt 12,5 μm.

Das polyklonale Antiserum färbte im Kopf einer kontrollinjizierten Larve die Axone der posterioren Kommissur, des dorso-ventralen diencephalen Trakts und die Axone der anterioren Kommissur (Abb. 4.13 A). Im Rumpf waren dagegen das mediale longitudinale Faszikel und die Axone der primären caudalen Motoneuronen gefärbt (Abb. 4.13 B). Der Seitenliniennerv und die Rohon-Beard-Zellen im Rückenmark wurden ebenfalls mit dem Antiserum gefärbt (Abb. 4.13 C). Diese Befunde korrelierten mit dem beschriebenen Expressionsmuster von L1.1 mRNA und unterstützten deshalb die Annahme, dass der Antikörper ein spezifisches Muster erkennt. In einer L1.1MO-injizierten Larve ist dagegen keine Färbung der Axone detektierbar (Abb. 4.13 D und E). Letzteres war ein zusätzlicher Nachweis für die Spezifität des polyklonalen Antiserums.

4.7.5 Zelluläre Lokalisation von L1.1 3 Tage nach der Befruchtung

Zebrafisch-Embryonen entwckeln sich außerhalb des Muttertieres und schlüpfen bereits drei Tage nach der Befruchtung (Kap. 1.6). Zu diesem Zeitpunkt hat die Larve eine Größe von ca. 2-3 mm und das Gründgerüst des Nervensystems ist bereits angelegt. Neue Axone wachsen auf den von Pionieraxonen festgelegten Routen aus. Die Axonogenese geht mit der Expression neuraler Zelladhäsionsmoleküle einher.

Um die Lokalisation von L1.1-Protein während der Axonogenese genauer zu untersuchen, wurden mit dem polyklonalen Antiserum Immunfärbungen an Kryostatschnitten von 3 Tage alten Larven durchgeführt (Abb. 4.14). L1.1 konnte in verschiedenen Berichen im Gehirn und im Rückenmark nachgewiesen werden. Entlang der gesamten optischen Projektion war L1.1 auf Axone der Sehnerven, am Chiasma und auf Axone im optischen Trakt lokalisiert.



Abb. 4.14: Nachweis der Verringerung der Proteinexpression von L1.1 im optischen Nerven. Dargestellt sind Immunfärbungen an Kryostatschnitten von 3 dpf-Larven. (A): L1.1 ist auf Axonen im optischen Nerven und am Chiasma einer uninjizierten Larve mit einem polyklonalen Antiserum nachweisbar. In einer Morpholino-injizierten Larve (B) ist das Protein nicht mehr detektierbar. (C): Phasenkontrastbild zu (B). Rostral ist oben. Die Länge des Maßstabes in (C) beträgt 50 µm.

Bei der Injektion von L1.1-Morpholinos schwächte sich das Färbemuster ab und es konnte drei Tage nach der Injektion kaum L1.1-Protein detektiert werden (Abb. 4.14), weil die Morpholinos die Translation der L1.1 mRNA blockiert hatten. Gleichzeitig konnte dadurch gezeigt werden, dass Morpholinos über diesen gesamten Zeitraum wirksam waren.

4.7.6 Immunfärbung von 5 dpf-Larven mit einem polyklonalen Antiserum gegen L1.1

Die Lokalisation von L1.1 wurde zusätzlich auf Kryostatschnitten von 5 dpf-Larven untersucht (n=10). Insbesondere konzentrierten sich die Untersuchungen auf verschiedene Regionen des Hirns.

Prominente Expressionsdomänen ließen sich in Axonen des Hirnstamms lokalisieren (Abb. 4.15 A), wobei es sich vermutlich um kommissurale Axone handelte. Die intensive Färbung dieser Domäne entsprach der bei einer *in situ* Hybridisierung starken Färbung durch eine L1.1-Sonde. Die Axone der posterioren Kommissur wurden ebenfalls durch das Antiserum gefärbt (Abb. 4.15 B). Eine Lokalisation von L1.1 auf Axonen der posterioren Kommissur konnte bereits von Weiland et al. (1997) nachgewiesen werden.



Abb. 4.15: Immunfärbung von 5 dpf-Larven mit einem polyklonalen Antiserum gegen L1.1: (A): Im Hirnstamm ist L1.1 auf kommissuralen Axonen (Pfeile) lokalisiert. (B): Die posteriore Kommissur (Pfeil) ist ebenfalls L1.1-positiv. (C): Entlang des gesamten Sehnerven und am Chiasma (Pfeile) ist L1.1 auf den Axonen lokalisiert. Im Rückenmark (D) färbt das polyklonale Antiserum Axone von Motoneuronen, Interneuronen und periphere Axone, die aus dem Rückenmark auswachsen (Pfeile). Die Länge des Maßstabes in (A) beträgt 50 µm für (A) und 25 µm für (B-D). Rostral ist oben.

In rostraler liegenden Regionen des Gehirns färbte das polyklonale Antiserum die Axone der Retinaganglienzellen in ihrer gesamten Länge, so dass die gesamte optische Projektion von optischen Nervkopf bis zu den Zielregionen der Retinaganglienzellaxone im optischen Tektum visualisiert werden konnten (Abb. 4.15 C). Im Rückenmark dagegen war L1.1 vermutlich auf Axonen der Motoneurone und Interneurone lokalisiert. Einzelne, aus dem Rückenmark austretende, periphere Axone waren ebenfalls L1.1-positiv. Insgesamt korrelierte die durch die Immunfärbung ersichtliche Lokalisation des L1.1 Proteins mit den bisher aus *in situ* Hybridisierungen bekannten Expressionsdomänen (Tongiorgi et al., 1995), wodurch zusammen mit den Morpholino-Experimenten (Kap. 4.8) die Spezifität des polyklonalen Antiserums festgestellt werden konnte.

4.8 Funktionelle Analyse von L1.1 und L1.2

4.8.1 Funktion von L1.1 und L1.2 bei der Faszikulierung der posterioren Kommissur

Ein Teil der funktionellen Analyse von L1.1 und L1.2 war die Blockierung der L1.1 mRNA-Translation und die Untersuchung von möglichen Auswirkungen auf die Entwicklung des embryonalen Nervensystems. Als L1-Homologe sollten die zwei Gene u.a. am axonalen Wachstum, der Faszikulierung, oder der Wegfindung von Axonen beteiligt sein. Um die Funktion von L1.1 zu untersuchen, haben wir versucht die Synthese des Proteins zu inhibieren, indem wir uns der Morpholino-*knockdown*-Strategie bedient haben. In diesen Experimenten wurden 8 ng L1.1 Morpholino in frisch befruchtete Zebrafischeier injiziert und das Auswachsen der Axone anhand einer Tubulin-Färbung nach 27 hpf und 33 hpf untersucht. Diese Zeitpunkte boten sich an, weil das Grundgerüst des Nervensystems in diesem Entwicklungsstadium bereits angelegt ist. Becker *et al.* (2001) führten außerdem Analysen zur Funktion von HNK-1 als potentielles Glykoepitop von L1.1 in dieser Phase der Embryonalentwicklung durch.

Die tolerierbare Menge an injiziertem Morpholino wurde vorher anhand des Standard-Kontroll-Morpholinos (Std.Ctl.MO) ermittelt. 8 bis 10 ng Morphilino führten zu einer akzeptablen Überlebensrate der Larven, wobei unspezifische Abberationen zu einem vernachlässigbaren Anteil auftraten. Größere Mengen waren in dieser Hinsicht nicht vorteilhaft. Bei diesen unspezifischen Abberationen handelte es sich in der Regel um übermäßig gekrümmte, schwanzlose, oder kopflose Larven. Derartig abnormal entwickelte Larven wurden nicht untersucht. Darüber hinaus wurde mit einem fluoreszierenden Kontroll-Morpholino (4,5 ng pro Larve, zur Verfügung gestellt von T. Schimmang) überprüft, ob die Verteilung der Morpholinos über die gesamte Larve gewährleistet war. Dies war tatsächlich der Fall (n=52, nicht gezeigt).

Zunächst war es aber erforderlich die Wirksamkeit der Morpholinos zu verifizieren. Dies geschah durch eine Immunfärbung von L1.1MO-injizierten Larven mit einem polyklonalen Antiserum gegen L1.1 (Abb. 4.13 und 4.14).

Tatsächlich war es gelungen durch die Injektion eines L1.1-spezifischen Morpholinos (L1.1MO) die Translation der mRNA zu blockieren. Drei Tage nach der Injektion von L1.1MO war in den untersuchten Larven, wenn überhaupt, L1.1 nur auf einem sehr niedrigen Niveau nachweisbar (n=12, Abb. 4.14). Der Verringerung der Proteinexpression erstreckte sich über das gesamte ZNS der Larven. Allerdings war mit einem zweiten L1.1-spezifischen Morpholino (L1.1MO2) kein effiziente Blockierung der L1.1-Proteinsynthese zu erzielen. In nur einer Larve (1,25%) war ein Unterschied in der Intensität der Färbung zu uninjizierten Kontrollen zu sehen (n=8). Viele Larven unterschieden sich in der Intensität der Färbung nur in geringem Maße von uninjizierten Kontrollen. Der Phänotyp dieser Larven wurde nicht weiter untersucht. Für die Analyse des Phänotyps wurde daher nur mit L1.1MO gearbeitet. Eine Herabsetzung des Proteinniveaus für L1.2 konnte mit der hier beschriebenen Methode nicht durchgeführt werden, da für eine Immunfärbung kein taugliches Antiserum gegen L1.2 verfügbar war. Allerdings konnte eine Verringerung des Proteinniveaus von L1.2 in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden (J. Feldner, pers. Mitteilung).

Der Nachweis der Verringerung der Proteinexpression durch Morpholinos ermöglichte es eine mögliche Beteiligung von L1.1 und L1.2 bei Prozessen der Axonogenese zu untersuchen. Daher wurde eine Untersuchung des Phänotyps von Morpholino-injizierten Larven durch die Färbung der Axone mit einem anti-Tubulin-Antikörper durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass L1.1 Morpholinos (L1.1MO) spezifisch die posteriore Kommissur defaszikulieren (Abb. 4.16). Die Breite der posterioren Kommissur an der dorsalen Mittellinie wurde mit Hilfe einer Bildverarbeitungsanlage (Neurolucida) gemessen. Siebenundzwanzig Stunden nach der Befruchtung war die posteriore Kommissur um ca. 50% im Vergleich zu den Kontrollen verbreitert (Abb. 4.16 B und F). Darüber hinaus stellte sich heraus, dass L1.1 Morpholinos in einigen Fällen hemmend auf das Auswachsen der Axone, die die posteriore Kommissur bilden, wirken.



Abb. 4.16: Anti-Tubulin-Färbung von Morpholino-injizierten Zebrafischlarven bei 27 hpf und 33 hpf. Die Bilder A-E zeigen die posteriore Kommissur in der dorsalen Ansicht. Rostral ist oben. Die Breite der posterioren Kommissur an der dorsalen Mittellinie ist durch Pfeilspitzen angegeben. (A): posteriore Kommissur nach Injektion von Kontroll-MO bei 27 hpf. Bei 27 hpf verursacht L1.1MO (B) eine starke Defaszikulierung der posteriore Kommissur. Das Ausmaß der Defaszikulierung nimmt in späteren Entwicklungsstadien ab. Bei 33 hpf ist die Breite der posteriore Kommissur, sowohl für L1.1MO- (D) und L1.2MO-injizierte Larven (E) immer noch signifikant unterschiedlich von Kontroll-MO-injizerten Larven (C). (F): Quantifizierung der Breite der posterioren Kommissur. Die Länge des Maßstabes in (E) ist 12,5 μm für (A-E).

Einige der injizierten Larven (22%) wiesen eine nicht geschlossene posteriore Kommissur auf, die nicht dem Entwicklungsstadium entsprach. D.h. es hatten, wenn überhaupt, nur wenige Axonbündel die dorsale Mittellinie überquert. In diesen Fällen handelte es sich aber nicht um in der Entwicklung retardierte Larven, wie durch Ermittlung der Lage des Primordiums des posterioren Seitenliniennervs festgestellt werden konnte. Das Primordium lag bei diesen Fällen im fünften bis siebten Somiten, was dem Entwicklungsstadium bei 27 hpf entsprach.

Eine Aussage über die Funktion von L1.2 bei der Entwicklung der posterioren Kommissur 27 Stunden nach der Befruchtung konnte nicht gemacht werden, da die meisten Larven während die Experimente zu diesem Entwicklungsstadium durchgeführt wurden, zeitweise die Injektion nicht überlebten und die Ausbeute an Larven keine statistische Auswertung zuließ.

	wt	Std.Ctl.MO	L1.1MO
Breite der pc	14,3±0,9	29,9±2,7	50,6±6,3
Larven ohne geschl.	0	0	7 (22%)
рс			
n (Larven)	37	24	25

Tab. 4.4: Quantifizierung der Verbreiterung der posterioren Kommissur durch L1.1-Morpholinos 27 Stunden nach der Befruchtung. Die Breite der posterioren Kommissur in L1.1-Morpholino-injizierten Larven ist signifikant unterschiedlich von den Std.Ctl.MO-injizierten Larven (Mann-Whitney U, P=0,026).

Darüber hinaus wurde die Breite der posterioren Kommissur zu einem weiteren Zeitpunkt Untersucht, nämlich bei 33 hpf. Es stellte sich heraus, dass L1.1MO immer noch eine Defaszikulierung der posterioren Kommissur verursacht, allerdings nicht mehr so deutlich wie es 27 Stunden nach der Befruchtung beobachtet worden ist (vergl. Abb. 4.16 B, D und F). Die posteriore Kommissur war in den Kontrollen insgesamt schmaler. Ihre Breite hatte sich im Vergleich zu 27 hpf halbiert. Dennoch war in L1.1MO-injizierten Larven die posteriore Kommissur annähernd doppelt so breit wie in den Kontroll-injizierten Larven. Im Falle von L1.2 konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Defaszikulierung der posterioren Kommissur festgestellt werden (Abb. 4.16 E, Tab. 4.5), allerdings nur durch eins der beiden L1.2-spezifischen Morpholinos (L1.2MO). Der Effekt war hier aber nicht so stark, wie im Falle von L1.1MO. Die Breite der posterioren Kommissur nahm durch die Injektion von L1.2MO um nur 25% zu (Abb. 4.16 F).

	wt	Std.Ctl.MO	L1.1MO	L1.2MO	L1.2MO2
Breite der	18,3±0,6	15,7±0,6	24,3±2,0	18,7±0,9	16,1±1,1
рс					
n (Larven)	39	54	27	23	23

Tab. 4.5: Quantifizierung der Verbreiterung der posterioren Kommissur posterioren Kommissur durch L1.1- und L1.2-Morpholinos 33 Stunden nach der Befruchtung. Die Breite der posterioren Kommissur in L1.1-Morpholino-injizierten Larven ist signifikant unterschiedlich von den Std.Ctl.MO-injizierten Larven (Mann-Whitney U, P<0,001). L1.2MO verursacht eine signifikante Verbreiterung der pc im Vergleich zu Std.Ctl.MO (Mann-Whitney U, P=0,01), nicht aber L1.2MO2 (Mann-Whitney U, P=0,72).

4.8.2 Funktion von L1.1 und L1.2 bei der Wegfindung des Seitenliniennervs

Eine besondere Struktur im ZNS der Fische ist das Seitenlinienorgan. Mit diesem Organ nehmen Fische Druckveränderungen in der Umgebung war. Das Seitenlinienorgan besteht aus dem posterioren Seitenlinienganglion aus dessen Neuronen die Axone caudal entlang des horizontalen Myoseptums bis zur Schwanzflosse wachsen und die beiden Seitenliniennerven bilden. In den Nuklei des Seitenlinienorgans wurde die Expression von L1.1 und L1.2 durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus eine Lokalisation von L1.1 Protein auf den Axonen des Seitenliniennervs gezeigt werden (Abb. 4.13).

Es lag daher die Vermutung nahe, dass L1-Homologe im Zebrafisch am Neuritenwachstum des Seitenlinienorgans beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden die Seitenliniennerven Morpholino-injizierter Larven genauer betrachtet.

Tatsächlich stellte sich heraus, dass die Verringerung der Proteinexpression zu einem abnormalen Wachstum des Seitenliniennerven führte (Abb. 4.17). Dabei handelte es sich insbesondere um Fehler bei der Wegfindung der Axone. Die Seitenliniennerven einiger betroffener Larven wichen teilweise von ihrer Route am horizontalen Myoseptum ab (bei 39% der betroffenen Larven, Abb. 4.17 C) und wuchsen sogar in zwei Fällen (15%) wieder nach rostral (Abb. 4.17 B). Andere wiederum wuchsen nach ventral (46%). Rostral wachsende Seitenliniennerven waren an ihren caudalen Enden zwar mehr oder weniger stark defaszikuliert, jedoch war dies auch bei Kontrollen zu beobachten.



Abb. 4.17: Anti-Tubulin-Färbung von Morpholino-injizierten Zebrafischlarven bei 33 hpf. (A); Kontroll-Morpholino beeinflusst das Auswachsen des Seitenliniennervs (Pfeil) nicht. Der Pfeilkopf markiert zwei Neuromastenzellen. (B und C); L1.1MO verursacht Wegfindungsfehler des Seitenliniennerven (Pfeile in B und C) bei 33 hpf. Der Seitenliniennerv in (B) kehrt wieder um und ist an seiner Spitze defaszikuliert (Pfeilspitzen). In (C) weicht der Seitenliniennerv von seinem normalen Pfad kurzzeitig ab (Pfeilkopf). In (A-C) ist rostral links. (D): Quantifizierung der Larven mit abnormalen Seitenliniennerven. Die Länge des Maßstabes in (C) ist 12,5 μm für (A-C).

Interessanter weise war dieser Phänotyp nur 33 Stunden nach der Befruchtung zu beobachten. Bei 27 hpf trat kein vergleichbarer Phänotyp auf.

Wegfindungsfehler traten besonders häufig in Abwesenheit von L1.1 auf. In ca. 20% aller untersuchten Seitenliniennerven waren derartige Abberationen zu beobachten (0,4 Nerven/Larve, Tab. 4.6). Die Inhibition von L1.2 schien sich dagegen weniger stark auf das Auswachsen der Seitenliniennerven auszuwirken, war aber immer noch unterschiedlich von den Kontrollen. Immerhin waren hier fast 6% aller Seitenliniennerven betroffen (0,1 Nerv/Larve). In den Kontrollen (Wildtyp und Std.Ctl.MO-injizierte) waren zusammengenommen bei 27 hpf und 33 hpf nur zwei von insgesamt 314 Seitenliniennerven (0,6%, 0,02 Nerven/Larve) betroffen.

	wt 27 hpf	wt 33 hpf	Std.Ctl. MO 27 hpf	Std.Ctl.MO 33 hpf	L1.1MO 27 hpf	L1.1MO 33 hpf	L1.2MO 2 27 hpf	L1.2MO 2 33 hpf
abnormale Seitenliniennerven	1 (in 1 Larve) (1,3%)	0	0	1 (in 1 Larve) (0,9%)	0	13 (in 11 Larven) (20,3%)	0	3 (in 2 Larven) (5,8%)
n (Seitenliniennerven)	80	80	48	106	50	64	46	52
n (Larven)	40	40	24	53	25	32	23	26

Tab. 4.6: Prozentsatz von Abberationen des Seitenliniennervs nach der Blockierung von L1.1 und L1.2.

4.8.3 Funktion von L1.1 und L1.2 beim Auswachsen von Motoraxonen

Motoneurone liegen im ventralen Rückenmark und innervieren Muskelzellen des Zebrafisches. Zunächst differenzieren sich primäre Motoneurone deren periphere Axone die Routen festlegen, an denen sekundäre Axone entlang wachsen. Zu den primären Motoneuronen gehören das rostrale, das mittlere und das caudale Motoneuron, die in jedem Somiten in regelmäßiger Anordnung vorliegen. Das Axon des caudalen primären Motoneurons wächst in ventraler Richtung aus dem Rückenmark heraus, wo es in der Mitte jedes Somiten die Route für nachfolgende Axone vorgibt (Abb. 4.18 A und B) und mit ihnen zusammen den ventralen Motornerven bildet. Eine funktionelle Analyse von neuralen Zellerkennungsmolekülen lässt sich daher, aufgrund der einfachen Identifizierung, an der Entwicklung der ventralen Motornerven gut beobachten.

Die Auswertung der zentralen Axone der caudalen primären Motoneurone erfolgte, indem verkürzte oder gar fehlende und verzweigte Axone ausgezählt wurden. Bei letzteren wurden nur solche herangezogen, bei denen eine Verzweigung oberhalb des horizintalen Myoseptums auftrat. Eine Verästelung des distalen Endes von Axonen der caudalen primären Motoneuronen war nämlich nicht als Defekt anzusehen, da derartige Verästelungen durchaus auch in Wildtypen zu beobachten waren. Darüber hinaus exprimieren Motoneurone L1.1, L1.2.

Die Auswertung ergab, dass bei 27 hpf die Blockierung von L1.1 zu Defekten in den Axonen führte. Dabei handelte es sich vor allem um einen verschlechterten Auswuchs aus dem Rückenmark heraus. Viele Axone fehlten oder waren verkürzt (Abb. 4.18 C). Im Durchschnitt fehlten 0,6 Axone/Larve im Falle der L1.1MO-injizierten. Dagegen fehlten nur 0,04 Axone/Larve bei den Kontroll-injizierten (Std.Ctl.MO). Es handelte sich also um einen 10fachen Unterschied. Die Anzahl fehlender Axone zwischen L1.1MO-injizierten und Kontroll -injizierten Larven war statistisch signifikant (Tab. 4.7). Fehlende Axone traten in Wildtyp-Larven dagegen nicht auf.

	wt	Std.Ctl.MO	L1.1MO
		8-10 ng	8 ng
fehlende Axone	0	1	24
verzweigte	24	6	39
Axone			
n (Axone)	2068	953	1330
n (Larven)	40	26	43

Tab. 4.7: Quantifizierung der Axone der caudalen primären Motoneuronen bei 27 hpf. L1.MO verschlechtert das Auswachsen der Motoraxone signifikant unterschiedlich zu Kontroll-Morpholino (Std.Ctl.MO, Mann-Whitney U, P=0,0003). Verzweigungen treten an den Axonen der ventralen Motornerven in wt und Kontroll-Morpholino injizierten Larven auch auf, aber nicht so häufig wie bei L1.1MO-injizierten Larven (wt: Mann-Whitney U, P=0,0003; Std.Ctl.MO: Mann-Whitney U, P=0,0002)

Verzweigte Axone waren in L1.1MO-injizierten Larven ebenfalls zu beobachten (Abb. 4.18 D und Tab. 4.7). Der Unterschied in der Anzahl verzweigter Axone war deutlich im Vergleich zu Kontroll-injizierten Larven: während bei den L1.1MO-injizierten 0,9 Axone/Larve verzweigt waren, waren es bei den Kontroll-Morpholino-injizierten Larven ca. viermal weniger (0,2 Axone/Larve). Verzweigte Axone wurden zwar in Wildtyp-Larven ebenfalls gezählt, aber nicht so häufig (0,01 Axone/Larve), wie in L1.MO-injizierten (Tab.4.7). Die Verringerung der Proteinexpression hatte demnach ein verschlechtertes Auswachsen Motoraxone herbeigeführt.

33 Stunden nach der Befruchtung konnte dieser Befund im Falle von L1.1MO-injizierten Larven bestätigt worden. Fehlende ventrale Motornerven traten gehäuft auf (1,5 Nerven/Larve). In den Kontrollen war dieser Phänotyp nicht zu beobachten (Tab. 4.8). Hier waren höchstens Verzweigungen der ventralen Motornerven festzustellen (wt: 0,15 Nerven/Larve, Std.Ctl.MO 0,19 Nerven/Larve) sogar häufiger als in L1.1MO-injizierten Larven (0,04 Nerven/Larve). Die Unterschiede zu Wildtypen und Kontrollinjizierten waren aber nicht signifikant (Mann-Whitney U, P>0,1), so dass man von natürlichen Schwankungen in der Anzahl verzweigter ventraler Motoraxone ausgehen konnte.

	wt	Std.Ctl.MO	L1.1MO	L1.2MO1	L1.2MO2
		8ng	8ng	8ng	8ng
fehlende	0 (0%)	0 (0%)	40 (2,7%)	74 (8%)	91 (5,8%)
Nerven					
verzweigte	6 (0,2%)	10	1	14	12
Nerven		(0,4%)	(0,07%)	(1,5%)	(0,8%)
n (Nerven)	2418	2789	1499	925	1563
n (Larven)	40	53	27	18	28

Tab. 4.8: Quantifizierung der ventralen Motornerven der bei 33 hpf. Die Verringerung der Proteinsynthese von L1.1 führt nach 33 hpf zu einem verschlechterten axonalen Wachstum der ventralen Motornerven. 2,7% der gezählten Motornerven sind nicht ausgewachsen (L1.1:Mann-Whitney U, P<0,0001). Das Fehlen von L1.2-Protein verursacht einen noch schlechteren Auswuchs der ventralen Motornerven als das Fehlen von L1.1 (L1.2MO1: Mann-Whitney U, P<0,0001; L1.2MO2: Mann-Whitney U, P<0,0001).

Bei den L1.2-Morpholino-injizierten Larven waren die Effekte ausgeprägter, 33 Stunden nach der Befruchtung. Das Fehlen von L1.2 schien einen größeren Einfluß auf das axonale Wachstum zu haben, als das Fehlen von L1.1. Fehlende ventrale Motornerven traten in L1.2MO-injizierten Larven mit einer Häufigkeit von 4,1 Nerven/Larve auf. Dieser Befund konnte auch mit einem zweiten L1.2-spezifischen Morpholino (L1.2MO2) reproduziert werden, mit dem immerhin noch im Durchschnitt 3,3 Nerven/Larve fehlten (Tab. 4.8). Dieser zweite Morpholino (L1.2MO2) schien weniger wirksam zu sein. Dies zeigte sich deutlich bei der Anzahl verzweigter Motornerven, wo kein signifikanter Unterschied zu Kontrollinjizierten zu beobachten war (Mann-Whitney U, P=0,1).

Zusammenfassend ließ sich sagen, dass die Verringerung der Proteinsynthese L1-homologer Moleküle im Zebrafisch das Wachstum der ventralen Motornerven verschlechterte. Dabei schien das Fehlen von L1.2-Protein eine größere Auswirkung auf das Wachstum der Axone zu haben als L1.1, denn die Zahl der fehlenden ventralen Motornerven war sowohl in L1.2MO1- als auch in L1.2MO2-injizierten Larven signifikant unterschiedlich zu L1.1MOinjizierten Larven (L1.2MO1: Mann-Whitney U, P<0,0001; L1.2MO2: Mann-Whitney U, P<0,0001).

Die beobachteten Verzweigungen der ventralen Motornerven waren wohl als natürliche Variabilität innerhalb der hier miteinander verglichenen Gruppen anzusehen und stellten wohl keinen Morpholino-spezifischen Effekt dar. L1.1MO-injizierte unterschieden sich nicht von den Kontrollinjizierten (Mann-Whitney U, P=0,1) oder von Wildtypen (Mann-Whitney U, P=0,1) in der Anzahl verzweigter Motornerven bei 33 hpf. Die Tatsache, dass L1.2MO1 (Mann-Whitney U, P=0,0004) im Gegensatz zu L1.2MO2 (Mann-Whitney U, P=0,1) einen statistischen Unterschied in der Anzahl verzweigter Motornerven ausmachte unterstützte diese Annahme.



Abb. 4.18: Phänotyp der Axone der ventralen Motornerven bei der Verringerung der Proteinexpresion von L1.1 und L1.2. Dargestellt sind Tubulin-Färbungen an 27 hpf- und 33 hpf-Larven in einer lateralen Ansicht des Rumpfes. Rostral ist links. Std.Ctl.MO-injizierte Larven sind bei 27 hpf (A) und 33 hpf (B) dargestellt. Die Pfeile markieren die Axone der ventralen Motornerven. (C und D): In L1.1MO-injizierten Larven (27 hpf) kommt es zu einem Verlust einzelner Axone (Pfeil in C), oder zu Verzweigungen einzelner Axone (Pfeil in D). (E): In späteren Entwicklungsstadien (33 hpf) von L1.1MO-injizierten Larven treten fehlende oder verkürzte Axone gehäuft auf (Pfeil). (F): In L1.2MO-injizierten Larven (33 hpf) ist das Auswachsen der Axone stark beeinträchtigt. Die Länge des Maßstabes in (F) beträgt 25 µm für (A-F).

4.8.4 Expression und immunhistochemische Untersuchung von L1.1- bzw. L1.2-Fusionsproteinen in CHO-Zellen

L1.1 und L1.2 besitzen jeweils eine Transmembrandomäne, die hydrophob ist und das Protein in der Zellmembran verankert (Tongiorgi et al., 1995).

Für die Untersuchung der genauen Funktionen dieser beiden Proteine war ein Ansatz die Überexpression durch Injektion von L1.1- bzw. L1.2-RNA in frisch befruchtete Eier. Dafür wurden spezielle Expressionsvektoren konstruiert (s. Anhang).

Zunächst war es erforderlich die Eignung dieser Vektoren und die Lokalisation des exprimierten Proteins zu überprüfen, da L1.1 und L1.2 –wenn sie funktionelle L1-Homologe sind- ihre Funktion an der Zellmembran ausüben sollten. Dafür wurden die konstruierten Expressionsvektoren in Zellkultur getestet. Durch transiente Transfektion von CHO-Zellen und anschließender Immunfärbung der noch lebenden Zellen mit den während dieser Arbeit erhaltenen Peptid-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass sowohl L1.1 als auch L1.2 exprimiert und an die Zelloberfläche transportiert werden (Abb. 4.19). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die ektopisch exprimierten Proteine *in vivo* ebenfalls an der Oberfläche lokalisiert sein sollten.

In der Abbildung 4.19 sind L1.1- bzw. L1.2-positive Zellen zu erkennen, die durch die Detektion des kovalent an die cytoplasmatische Domäne gebundenen EGFP- bzw. Myc-Epitop grün fluoreszieren. Diese Zellen sind ebenfalls mit dem entsprechenden Antikörper zu detektieren, was aus der gleichzeitigen roten Fluoreszenz zu entnehmen ist.

Der Anteil der detektierbaren L1.1EGFP-positiven Zellen mit dem L1.1-Antiserum 7612 lag bei ca.65% (Tab. 4.9). Damit zeigte dieses Antiserum eine moderate Reaktivität, da nicht alle Zellen, die mit EGFP fluoreszierten, detektiert werden konnten.

Für L1.2 galt, dass mit dem zur Verfügung stehenden Antiserum das Protein ebenfalls detektiert werden konnte, allerdings in einem vergleichsweise geringeren Maße. Nur ca. 21% der L1.2-positiven Zellen konnten mit dem L1.2-Antiserum nachgewiesen werden (Tab. 4.9).

Die entsprechenden Präimmunseren zeigten keine signifikante Reaktivität, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die L1.1- bzw. L1.2-positiven Zellen spezifisch gefärbt waren.

Eine zusätzliche Kontrolle der spezifischen Bindung der L1.1- und L1.2-Antikörper war eine Immunfärbung von nicht transfizierten Zellen bzw. Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden (nicht gezeigt). Bei diesen Kontrollansätzen zeigte weder Anti-L1.1 noch Anti-L1.2 eine nennenswerte Hintergrundfärbung. Ebenso konnte festgestellt werden, dass weder mAb 9E10, der gegen das Myc-Epitop gerichtet ist, noch der sekundäre Antikörper (Abb. 4.19 E und K) unspezifische Signale hervorrufen.

Parallel zu den oben erwähnten Antiseren wurde noch jeweils ein zweites Antiserum gegen L1.1 und L1.2 getestet, das jeweils eine vergleichbare Reaktivität gegen das entsprechende Protein zeigte.

L1.EGFP	transfizierte Zellen	immungefärbte Zellen	n (Zellen)	% doppelt gefärbte
pAB7612	43	29	1231	65,6+/-7,1
pAB7613	28	13 (+4 unspez.)	806	49,8+/-6,1
Präimmunserum	38	3	842	6,8+/-6,8

L1.1Myc	transfizierte Zellen	Immungefärbte Zellen	n (Zellen)	% doppelt gefärbte
pAB7612	34	20 (+4 unspez.)	687	60,8+/-7,4
pAB7613	35	21 (+1 unspez.)	745	58,8+/-2,8
Präimmunserum	36	1 (+1unspez.)	743	2,8+/-2,8

L1.2Myc	transfizierte Zellen	Immungefärbte Zellen	n (Zellen)	% doppelt gefärbte
pAB7614	24	5	735	21,4+/-7,1
Preimmunserum	13	0	387	0

Tab. 4.9: Auszählung der L1.1- und L1.2-transfizierten CHO-Zellen.

Die durchschnittliche Transfektionseffizienz in diesem Experiment lag bei 4% und ist damit sehr gering. Für die Aussagekraft der erhaltenen Daten im Zusammenhang mit der Fragestellung nach der Lokalisation des ektopischen Proteins und der Eignung der hier verwendeten Antiseren war allerdings eine hohe Transfektionseffizienz nicht erforderlich. Diese Experimente zeigten, dass die Expressionsvektoren geeignet waren, um L1.1 und L1.2 überzuexprimieren, und dass die synthetisierten Proteine an die Zellmembran transportiert wurden.



Abb. 4.19: Expression von L1.1- und L1.2-Fusionsproteinen in transfizierten CHO-Zellen. Dargestellt sind Beispiele von L1.1- und L1.2-exprimierenden CHO-Zellen. Die Immunfärbung von L1.2 (G-L) erfolgte mit den während dieser Arbeit hergestellten Peptid-Antikörpern. Um zu demonstrieren, dass EGFP-Konstrukte ebenso nachweisbar sind wurde hier die Darstellung des L1.1EGFP-Fusionsproteins (A-F) bevorzugt. (D,E und J,K): Immunfärbungen mit den jeweiligen Präimmunseren ergaben kein Signal in transfizierten Zellen. Rote und grüne Fluoreszenz, sowie der Phasenkontrast wird in gleichen Bildausschnitten gezeigt.

4.9 Überexpression von neuralen Zellerkennungsmolekülen im Zebrafisch

Die Überexpression von L1.1 und L1.2, sowie des während dieser Arbeit klonierten F3 Gens, war ein alternativer Ansatz zur Funktionsanalyse dieser neuralen Zelladhäsionsmoleküle. Dafür wurden spezielle Expressionsvektoren konstruiert (s. Anhang) aus denen RNA *in vitro* transkribiert werden sollte, um in frisch befruchtete Eier injiziert zu werden. In Vorversuchen wurde zunächst die Überexpression von β -Galaktosidase durchgeführt, um die Funktionalität dieser Methode und die Verteilung des ektopischen Proteins bei erfolgreicher Expression zu untersuchen.

Die erfolgreiche Expression wurde durch eine X-Gal-Färbung (Kap. 3.7.3) nachgewiesen. Zellen, die die injizierte RNA aufgenommen hatten und das Protein exprimierten färbten sich blau (Abb. 4.20). Die Expression von β -Galaktosidase konnte in der gesamten Larve nachgewiesen werden. Vereinzelt liegende Expressionsdomänen (Abb. 4.20 C) deuteten auf eine geringfügige Verteilung der RNA hin. Dies wäre vermutlich dann der Fall, wenn die Injektion im 8-Zellstadium erfolgte und die RNA dadurch nicht mehr von allen Zellen des befruchteten Eies aufgenommen werden konnte.



Abb. 4.20: β -Galaktosidase-Expression Zebrafischlarven 24 Stunde nach der Befruchtung. Dargestellt sind Expressionsdomänen des ektopischen Proteins bei 24 hpf in einer lateralen Ansicht. Rostral ist links. (A): Im Kopf der Larve ist eine starke Färbung zu beobachten. Der Pfeilkopf markiert das Auge. (B): In dorsal liegenden Bereichen der Somiten exprimieren einige primäre Muskelzellen (Pfeile) β -Galaktosidase. Vereinzelte Expressionsdomänen im Rumpf einer Larve deuten auf eine Injektion der RNA in einem fortgeschrittenen Stadium hin. Die Länge des Messbalkens in (C) beträgt 25 μ m für (A-C).

Versuche die Moleküle L1.1, L1.2 und F3 zu exprimieren blieben jedoch erfolglos. Auch die Verwendung unterschiedlicher RNA-Präparationen und die Verwendung verschiedener Konstrukte brachte keinen Erfolg. Weder die Myc-Fusionsproteine noch das L1.1EGFP-Konstrukt konnten bei jeweils mindestens 200 Larven nachgewiesen werden, obwohl der Nachweis des Myc-Epitops mittels Immunhistochemie nach Überexpression anderer Konstrukte in unserem Labor etabliert ist. Untersuchungen wurden auch in frühen Stadien der Embryonalentwicklung (10 hpf und 16 hpf) durchgeführt, um eine eventuelle frühzeitige Degradation der injizierten RNA festzustellen. Auch diese Larven zeigten keine Färbung. Somit konnte eine funktionelle Analyse, die auf die Überexpression der Moleküle beruht, nicht durchgeführt werden.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die Rolle von neuralen Zelladhäsionsmolekülen während der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems im Zebrafisch zu charakterisieren. Dafür wurde ein neues F3-homologes Gen kloniert und sein Expressionsmuster zu verschiedenen Zeitpunkten während der Embryonalentwicklung und der Regeneration beschrieben. Darüber hinaus wurden funktionelle Analysen der neuralen Zelladhäsionsmoleküle F3, L1.1 und L1.2 des Zebrafisches durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung dieser Moleküle beim axonalen Wachstum zu untersuchen.

5.1 Das Expressionsmuster von F3 während der larvalen Entwicklung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zebrafisch-Homolog zu F3/F11/Contactin kloniert. Die Sequenz der cDNA und die aus der abgeleiteten Proteinsequenz resultierende Domänenstruktur des neuen Gens, sowie sein Expressionsmuster in der larvalen Entwicklung, korrespondierten mit den entsprechenden Befunden aus F3-ähnlichen Molekülen anderer Vertebraten. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gens war zu 55% identisch mit F3ähnlichen Molekülen in anderen Vertebraten, daher wurde das Gen F3 genannt. Das zeitliche Expressionsmuster von Zebrafisch F3 in verschiedenen Neuronenpopulationen, geht mit der Axonogenese einher. Rohon-Beard-Zellen und Neuronen des Trigeminalisganglions, die bei 16 hpf bereits F3 exprimierten, sind auch die ersten neuronalen Zellpopulationen, bei denen axonales Wachstum eintritt (Ross et al., 1992; Wilson et al., 1990). In anderen Neuronentypen, wie z.B. Motoneuronen, setzt axonales Wachstum erst zwischen 17 hpf und 19 hpf ein (Myers et al., 1986). F3 ließ sich jedoch nicht generell als Marker für axonales Wachstum ansehen, da sich 24 Stunden nach der Befruchtung viele Neuronen nicht mit einer F3-Sonde färben ließen, wie z.B. das posteriore Seitenlinienganglion (Becker and Becker, 2001). Das Expressionsmuster von F3 korrelierte außerdem mit dem des Xenopus-Orthologs Contactin (Fujita et al., 2000).

5.2 Mögliche Beteiligung von CLIM-Cofaktoren an der Regulation von F3

Die Expression einer dominant-negativen Form des CLIM-Cotranskriptionsfaktors (DN-CLIM) führte zur Runterregulation von F3. DN-CLIM enthielt zwar immer noch die LIM-Domäne, nicht aber die Dimerisierungsdomäne, die für einige Funktionen der LIM-hd-Transkriptionsfaktoren erforderlich ist (Kap. 4.3.2). Im Zebrafisch sind vier verschiedene CLIM-Proteine bekannt, ihre LIM-Bindedomänen sind denen von Vertebraten annähernd identisch (Toyama et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von DN-CLIM zu spezifischen Defekten des embryonalen Nervensystems im Zebrafisch führt (Becker et al., 2002;Segawa et al., 2001). Den behandelten Larven fehlten die Augen und die peripheren Axone der Rohon-Beard-Zellen, der Motoneuronen und der Neuronen des Trigeminalisganglions. Die Somata dieser Neuronen waren dagegen nicht betroffen, auch nicht die ihre zentralen Axone. Daher ließ sich die hier beobachtete Reduktion der F3 Expression nicht auf einen Verlust von Zellen zurückführen. Dafür sprach auch die in dieser Arbeit beobachtete Gegenwart der normalen Anzahl L1.1 positiver Rohon-Beard-Zellen in DN-CLIM-injizierten Larven. Für Expressionsanalysen von F3 in DN-CLIM-injizierten Larven wurden daher nur augenlose herangezogen, da man bei ihnen von einer erfolgreichen Injektion ausgehen konnte. Obwohl die L1.2 mRNA positiven Rohon-Beard-Zellen in DN-CLIM-injizierten Larven in ihrer Anzahl nicht reduziert waren, war ihre Anzahl geringer, als die von F3- bzw. L1.1 mRNA positiven Rohon-Beard-Zellen in kontrollinjizierten Larven. Dieser Befund bestätigte, dass nur eine Subpopulation der Rohon-Beard-Zellen L1.2 exprimierte (Tongiorgi et al., 1995). Jedenfalls fand eine starke Reduktion der F3 Expression in solchen Neuronen statt, die auch eine starke Expression von CLIM-Cofaktoren und isl-Proteinen aufwiesen, hier in den Rohon-Beard-Zellen und im Trigeminalisganglion. In anderen F3 exprimierenden Neuronen war es auf Grund der geringen Färbeintensität der Neuronen nicht festzustellen, ob eine Reduktion der F3 Expression in DN-CLIM-injizierten Larven stattgefunden hatte (vergl. Expression in den Motoneuronen zwischen 4.6 C und D).

Die hier erhaltenen Daten ließen über eine spezifische Regulation von F3 durch CLIM spekulieren, denn L1.1 und L1.2 waren im Trigeminalisganglion nur in geringem Maße und in Rohon-Beard-Zellen DN-CLIM-injizierter Larven nicht signifikant betroffen. Die Expression von L1.1 und L1.2 könnte nur teilweise von CLIM-Cofaktoren, oder anderen LIM-Domäne-bindenden Cofaktoren (Bach et al., 1999;Howard and Maurer, 2000) abhängig sein.

Diese Cofaktoren könnten die Expression von neuralen Zelladhäsionsmolekülen direkt oder indirekt über längere Signalketten regulieren. Tatsächlich interagieren CLIM-Cofaktoren auch mit einer Reihe anderer Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen (Bach et al., 1997;Bach et al., 1999;Torigoi et al., 2000), die als potentielle Regulatorgene in Frage kämen. Die hier dargestellten Befunde legten die Vermutung nahe, dass das fehlende Auswachsen peripherer Axone in DN-CLIM-injizierten Larven wenigstens z.T. mit der Inhibition von F3 zusammenhing. Um diese Vermutung zu überprüfen, wäre es sinnvoll gewesen, die Funktion von F3 direkt zu blockieren. Allerdings führten alle bisherigen Versuche noch nicht zu einem Phänotyp (s.u.). In *Xenopus*-Larven gelang es dagegen, einen Nachweis für eine Beteiligung von F3 beim Auswachsen primärer sensorischer Axone zu erbringen (Fujita et al., 2000). Dieser Befund stützte zusammen mit der Runterregulation von F3 in Neuronen ohne periphere Axone in DN-CLIM-injizierten Larven und dem zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster von F3 die Annahme, dass das Protein am axonalen Wachstum einer Subpopulation von Neuronen beteiligt sein könnte.

5.3 F3 Expression während der Regeneration

Durch *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass F3 nach einer Läsion des optischen Nerven in Retinaganglienzellen und Gliazellen des optischen Trakts und Tektums hochreguliert wird. Darüber hinaus war in einigen Hirnstammnuklei und neuronalen und glialen Zellen nach einer Läsion des Rückenmarks F3 hochreguliert.

Eine Expression von F3 in Gliazellen des optischen Trakts fand bereits während der larvalen Entwicklung statt, ging jedoch im weiteren Verlauf der Entwicklung zurück. Nach einer Läsion des optischen Nerven war bereits nach zwei Tagen eine Reexpression im optischen Trakt detektierbar, die nach einer Woche ihr Maximum erreichte und im weiteren Verlauf der Regeneration wieder abnahm. Es handelte sich hierbei also um eine transiente Hochregulation von F3. Im Rückenmark konnte eine erhöhte Expression von F3 in deszendierenden axotomierten Neuronen in Nuklei des Hirnstammes festgestellt werden. Die Identität als axotomierte Neurone konnte durch retrograde Farbstofffüllung demonstriert werden (Becker et al., 1998).

Die axonale Regeneration im ZNS geht mit einer Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen einher (Bernhardt, 1999;Stuermer et al., 1992). Deshalb war die Untersuchung der F3-Expression von besonderer Bedeutung. Die Fähigkeit der Hochregulation dieser Moleküle in neuronalen und glialen Zellen könnte eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration sein. Die Expression von F3 in neuronalen Zellen kann sich wachstumsfördernd auswirken. Homophile (Gennarini et al., 1991) und heterophile Interaktionen mit Ng-CAM (Brümmendorf et al., 1993), Nr-CAM/Bravo (Morales et al., 1993), Tenascin-C (Rigato et al., 2002), oder TAG-1 (Buttiglione et al., 1998) die dies bewirken, sind beschrieben worden. Die Reexpression von F3 in Retinaganglienzellen und in Neuronen des Rückenmarks spricht dafür, dass das Molekül an der Regeneration beteiligt ist. Andererseits könnte eine gliale Expression von F3, wie sie auch in der weißen Substanz des Rückenmarks beobachtet wurde, mit Prozessen der Wegfindung zusammenhängen. Die heterophile Interaktion mit Tenascin-R wäre ein Beispiel dafür, da sie hemmend auf das Wachstum wirkt (Pesheva et al., 1993;Xiao et al., 1996;Xiao et al., 1998).

Die Reexpression von F3 in Neuronen und Gliazellen des ZNS läßt auf eine Beteiligung des Proteins an regenerativen Prozessen schließen. Ein direkter Nachweis dafür konnte aber mit den hier verwendeten Mitteln nicht erfolgen. Eine Möglichkeit diese Annahme zu überprüfen, wäre die Pertubation von F3 während der Regeneration in adulten Fischen. Es wäre lohnenswert, die vorhandenen F3-spezifischen Morpholinos auf die Läsionsstellen zu applizieren, um eventuell eine Reexpression des Gens während der Regeneration zu inhibieren. Allerdings könnte auf diesem Wege die Reexpression besser in neuronalen Zellen blockiert werden, da hauptsächlich diese Morpholinos aufnehmen würden. Der Einfluss von glial exprimierten F3 auf den Regenerationsprozess könnte so nicht gründlich untersucht werden, obwohl auch in diesen Zellen Morpholinos nach Injektion in das Auge oder in den dritten Mittelhirnventrikel nachgwiesen werden konnten (T. Becker, pers. Mitteilung).

5.4 Die Funktionen von L1.1 und L1.2 beim axonalen Wachstum

Die aufgrund ihrer Proteinstruktur festgestellte Zugehörigkeit von L1.1 und L1.2 zur L1-Subfamilie (Tongiorgi et al., 1995) ließ bereits vermuten, dass die beiden Proteine eine Rolle beim Neuritenwachstum im Nervensystem des Zebrafisches spielen. Diese Vermutung wurde dadurch gestützt, dass beide Gene hauptsächlich von postmitotischen Neuronen exprimiert werden und ihre Expression mit der Initiation des axonalen Wachstums einhergeht (Tongiorgi et al., 1995).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mehr über die Funktion von L1.1 und L1.2 zu erfahren, so dass man die zwei Gene auch aufgrund ihrer Funktionen als L1-Homologe betrachten konnte. Des weiteren wurde eine Analyse der subzellulären Lokalisation von L1.1 durchgeführt. Die Analyse der subzellulären Lokalisation der beiden Proteine setzte den Erhalt von Antikörpern gegen L1.1 und L1.2 voraus. Die immunhistologischen Untersuchungen mit dem vorhandenen polyklonalen Antiserum gegen L1.1 (Labor Schachner) bestätigten das bereits beschriebene Expressionsmuster (Tongiorgi et al., 1995). L1.1 konnte auf Axonen des ZNS in der optischen Projektion, auf kommissuralen Axonen und auf Axonen im Rückenmark und des PNS lokalisiert werden. Interessant ist es nunmehr, die Lokalisation von L1.2 dazu vergleichen zu können. Hinweise über eine ungleiche Verteilung von L1.2, oder einen quantitativen Unterschied zu L1.1, lassen Schlüsse über die Identifizierung verschiedener Neuronenpopulationen und über eventuelle Unterschiede in der Funktion der Proteine zu. Immerhin war zu berücksichtigen, dass zwei L1-ähnliche Moleküle im Zebrafisch exprimiert wurden. In Zusammenhang mit dieser Fragestellung wäre es von außerordentlicher Bedeutung auch ein Antiserum gegen L1.2 zu erhalten, das immunhistologisch tauglich ist. Die von der Firma Eurogentec hergestellten polyklonalen Antiseren erfüllten diese Anforderungen nicht.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten aus den Morpholino-Experimenten (Kap. 4.8) machen aber den weiteren Gebrauch der Antiseren für Western Blot-Analysen unentbehrlich.

Aus diesen Experimenten lässt sich eine Funktion von L1.1 und L1.2 beim Neuritenwachstum, der axonalen Wegfindung und der Faszikulierung ableiten. Eine Funktion von L1.1 bei der Faszikulierung der posterioren Kommissur konnte bereits nachgewiesen werden (Weiland et al., 1997). Dabei handelte es sich allerdings um einen unterschiedlichen experimentellen Ansatz, bei dem durch mehrmalige Injektion von Antikörpern gegen das Goldfisch-Homolog zu L1, E587, im Zebrafisch eine Defaszikulierung der posterioren Kommissur beobachtet wurde. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Befund durch die Injektion von L1.1-spezifischen Morpholinos reproduziert werden. Der Phänotyp konnte aber aufgrund von Untersuchungen zu einem weiteren, früheren (27 hpf) Zeitpunkt genauer beschrieben werden. Es zeigte sich nämlich, dass neben einer Defaszikulierung auch ein verschlechtertes Auswachsen von Axonen der posterioren Kommissur bei der Blockierung von L1.1 einsetzt.

Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung schwächten sich die Effekte an der posterioren Kommissur ab. Während 27 Stunden nach der Befruchtung die posteriore Kommissur in L1.1MO-injizierten Larven in Vergleich zu den Kontrollen um ca. 100% verbreitert war, konnte 33 Stunden nach der Befruchtung nur ein Unterschied um höchstens 50% festgestellt werden. Bei der von Weiland *et al.* (1997) gemessenen Defaszikulierung beträgt der Unterschied zu den Kontrollen nur 25%. Allerdings wurde diese bei 36 hpf gemessen. Diese Daten zeigen eine Tendenz auf, bei der mit zunehmender Entwicklung die Defaszikulierung der posterioren Kommissur allmählich reduziert wird. Dies könnte durch später auswachsende Axonbündel geschehen, die allmählich innerhalb der von frühen Axonen vorgegebenen Routen auswachsen.

Die Verringerung der Proteinexpression von L1.2 führte ebenfalls zu einer Defaszikulierung der posterioren Kommissur, wenn auch nicht so ausgeprägt wie im Falle von L1.1. Dieser Befund lässt vermuten, dass L1.2 bei der Faszikulierung keine so große Bedeutung zukommt, wie L1.1. Vielleicht kann das Fehlen von L1.2 durch die Anwesenheit von L1.1 zu einem gewissen Grad kompensiert werden. Interessanterweise, löst nur einer von zwei L1.2-spezifischen Morpholinos einen signifikant unterschiedlichen Effekt im Vergleich zu den Kontrollen aus. Offenbar wirkt nur eine Morpholino-Sequenz optimal.

Die Blockierung von L1.1 und L1.2 verursachte noch einen weiteren, unerwarteten Effekt. In einigen Larven traten Wegfindungsfehler des Seitenliniennerven auf . Dieser Effekt war insofern unerwartet, dass er von Weiland et al. (1999) nicht beobachtet wurde. Dieser Phänotyp war in über 20% aller L1.1MO-injizierten und in fast 6% der mit L1.2MO2injizierten Larven zu beobachten und dann auch nur 33 Stunden nach der Befruchtung. Bei 27 hpf traten weder im Falle von L1.1 noch von L1.2 Abnormalitäten auf. Interessanterweise erfolgten die Wegfindungsfehler auf der Höhe des siebten bis neunten Somiten, dort also, wo sich das Primordium einer 27 hpf-Larve also gerade erst befand. Dieser Befund warf automatisch die Frage auf, warum derartige Wegfindungsfehler nicht in weiter caudalen oder rostralen Positionen auftraten. Falls derartige Wegfindungsfehler nicht zufällig in diesem Bereich des Rumpfes auftraten, mussten dort gehäuft spezielle Signalmoleküle lokalisiert sein mit denen L1-ähnliche Moleküle des Zebrafisches interagieren können, oder aber eine konkrete Region, in der zumindest der Seitenliniennerv Informationen über seine Wachstumsrichtung erhält. Derartige Hinweise sind aber bisher nicht bekannt. Allerdings wirken repulsive und attraktive Signalmoleküle auf die Wachstumskegel von Axonen und limitieren ihre Wachstumsrichtung auf bestimmte Routen (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996). Semaphorin Z1a ist ein repulsives Signalmolekül, das in dorsalen und ventralen Regionen eines jeden Myotoms exprimiert wird, nicht aber am horizontalen Myoseptum (Shoji et al., 1998). Es bleibt eine Semaphorin Z1a-freie Region entlang der longitudinalen Achse, die sich über 5-6 Muskelzellen erstreckt (20-25 µm) und in die die Wachstumskegel des posterioren Seitenlinienganglions hineinwachsen. Semaphorin Z1a wird auch von Zellen des Primordiums exprimiert. Die genauen Interaktionen zwischen dem

Primordium und den Wachstumskegeln des Seitenliniennervs sind bisher unklar, es wurde jedoch bis jetzt nicht beobachtet, dass die Wachstumskegel das Primordium überholen. Jedenfalls kann das Primordium auch ohne Seitenliniennerven wachsen (Becker et al., 2001). Das Expressionsmuster von Semaphorin Z1a scheint die Weg des Seitenliniennervs entlang des horizontalen Myoseptums zu begrenzen. In der Maus wurde L1 als Teil des Rezeptorkomplexes für das Semaphorin Z1a-Homolog Semaphorin 3A beschrieben, das eine repulsive Wirkung auf corticospinale Neurone hat. In L1-defizienten Mäusen ist diese repulsive Wirkung aufgehoben (Castellani et al., 2000). Die repulsive Wirkung von Semaphorin Z1a könnte ebenso über die L1-ähnlichen Moleküle im Zebrafisch vermittelt werden.

Wegfindungsfehler des Seitenliniennerven treten auch bei Pertubation des HNK-1-Glykoepitops auf (Becker et al., 2001). L1.1 und L1.2 sind als L1-ähnliche Moleküle wahrscheinlich durch HNK-1 glykosyliert (Abb. 4.12). Daher ließ sich annehmen, dass HNK-1 eine wesentliche Rolle bei den über L1.1 und L1.2 vermittelten Interaktionen spielte. Bei diesen Interaktionen könnte es sich um homophile Wechselwirkungen gehandelt haben, die eine Faszikulierung von später auswachsenden Faszikeln mit frühen Axonen des Seitenliniennerven vermittelten. Die Defaszikulierung des Seitenliniennerven bei einigen Morpholino-injizierten Larven könnte dadurch erklärt werden. Auf der anderen Seite könnte das HNK-1-Glykoepitop an heterophilen Wechselwirkungen, etwa mit Semaphorin Z1a oder anderen Molekülen, beteiligt sein.

Bei den an den ventralen Motornerven beobachteten Effekten handelte es sich hauptsächlich um ein verschlechtertes Auswachsen dieser Axone bei Inhibition von L1.1 und L1.2. Verästelungen traten selten auf. Allerdings war zu beachten, dass diese Axone im Vergleich zum Seitenliniennerven, oder kommissuralen Axonen relativ kurz wuchsen. L1.2 schien dabei einen größeren Einfluss auf das Auswachsen der ventralen Motornerven zu haben als L1.1. Die ventralen Motornerven wachsen ventral aus dem Rückenmark heraus, in der Mitte jedes Somiten (Myers et al., 1986). In der posterioren Hälfte jedes Somiten sind eine Anzahl von repulsiven Signalmolekülen lokalisiert (Bernhardt et al., 1998). Zu ihnen zählen Tenascin-C, Tenascin-W, Chondroitinsulfat Proteoglykane und Semaphorin Z1b. Die Überexpression von Semaphorin Z1b inhibiert in ähnlicher Weise das Wachstum der Motoraxone, wie die Pertubation von L1.1 und L1.2 (Bernhardt, 1999). In vitro Studien deuteten ebenfalls darauf hin, dass Semaphorin Z1b-Homologe in der Maus und in Vögeln das Wachstum von Motoraxonen inhibieren (Shepherd et al., 1996; Varela-Echavarria et al., 1997). L1.1 und L1.2 könnten über heterophile Wechselwirkungen mit attraktiven Signalmolekülen interagieren, wobei die oben benannten repulsiven Signale, oder auch andere, die Axone von der posterioren Hälfte der Somiten fernhalten. Das Fehlen von L1.1 oder L1.2 würde dann das Wachstum verschlechtern. Dass nur ein geringer Prozentsatz der ventralen Motornerven betroffen war, könnte mit einer Kompensation der L1.1- bzw. L1.2- Funktion durch andere Moleküle erklärt werden.

Die Blockierung von L1.1 und L1.2 offenbarte eine Rolle L1-ähnlicher Moleküle beim Neuritenwachstum. Dabei handelte es sich um eine Funktion bei der Defaszikulierung von Axonen, bei der axonalen Wegfindung und beim axonalen Wachstum. L1.1 schien dabei eine größere Rolle bei der Defaszikulierung der posterioren Kommissur und bei der Wegfindung des Seitenliniennerven zu spielen, während L1.2 einen größeren Einfluss auf das Wachstum von Motoraxonen hatte. Diese Befunde ließen den Schluss zu, dass die Funktionen von L1.1 und L1.2 in unterschiedlichen Neuronenpopulationen unterschiedlich gewichtet sind. Falls dies tatsächlich so wäre, lieferte dies eine Erklärung für funktionelle Unterschiede zwischen L1.1 und L1.2, die durch Genduplikation entstanden sind.

Der Nachweis der Blockierung der L1.2-Synthese durch genspezifische Morpholinos wäre durch Western Blot-Analysen zu erbringen. Entsprechende Versuche werden bereits von T. Becker und J. Feldner durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigen, dass tatsächlich ein Herabsinken des Proteinniveaus in L1.2-morpholinoinjizierten Larven in Western Blots nachgewiesen werden kann. Der Nachweis der Blockierung von L1.1 ist dagegen durch immunhistologische Färbungen erbracht worden.

Interessant wäre es weiterhin zu überprüfen, ob eine Coinjektion von L1.1- und L1.2-Morpholinos die in dieser Arbeit beobachteten Effekte verstärkt. Dafür sollte allerdings in vorherigen Tests die erforderliche Menge an injizierten Morpholinos austitriert werden. Die Injektion von L1.2MO führte in ersten Experimenten zu einer erhöhten Sterberate der Larven, obwohl unterschiedliche Mengen ausgetestet wurden. Aus diesem Grunde konnten zunächst keine Effekte der L1.2-Morpholinos beschrieben werden. Die hohe Sterberate musste allerdings nicht unbedingt ein Morpholino-spezifischer Effekt sein, sondern konnte auch mit Variationen in der Überlebensfähigkeit des jeweiligen Geleges zu tun haben. Eine hohe Sterberate war auch bei der Injektion von anderen Morpholinos zeitweise zu beobachten und konnte durch entsprechende Maßnahmen zur Beseitigung von Kontaminationen durch Pilze vermieden werden. Zeitweise halfen aber auch derartige Maßnahmen nicht. Es konnte zwar im Nachhinein L1.2MO erfolgreich injiziert werden, die Ausbeute an Larven reichte jedoch nicht um eine statistische Auswertung für 27 hpf-Larven durchzuführen.

5.5 Effektivität von Morpholinos

Die Funktionsanalyse von Genen mit Hilfe von Morpholinos hat sich in dieser Arbeit als nützlich erwiesen. Die Verringerung der Proteinexpression von L1.1 konnte durch immunhistologische Färbungen nachgewiesen werden und stellte sicher, dass die Beobachtungen, zumindest für L1.1, spezifisch waren. Mittlerweile kann eine erfolgreiche Verringerung der Proteinexpression dieser Gene auch in Western Blot-Analysen gezeigt werden (J. Feldner, pers. Mitteilung), so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Phänotyp in L1.2-Morpholino-injizierten Larven ebenfalls spezifisch ist. Es war allerdings zu beobachten, dass zwei verschiedene genspezifische Morpholinos unterschiedlich wirksam sind. Dies traf sowohl für L1.1-Morpholinos als auch für L1.2-Morpholinos zu. Im Falle der L1.1-Morpholinos stellte sich aufgrund von immunhistologischen Färbungen heraus, dass ein zweiter Morpholino (L1.1MO2) keine so effiziente Verringerung der Proteinexpression verursacht. Eine unterschiedliche Wirksamkeit konnte auch für die hier benutzten L1.2-Morpholinos festgestellt werden. So waren Wegfindungsfehler des Seitenliniennerven in L1.2-knockdowns nur mit einem Morpholino zu beobachten (L1.2MO2).

Die für die Funktionsanalyse des F3 Gens benutzten Morpholinos zeigten dagegen augenscheinlich keinen Phänotyp. Dies könnte aber vielleicht mit einer Kompensation der Funktion von F3 durch ein anderes Molekül, eventuell ein zweites F3-Homolog, zusammenhängen. Andererseits könnte die Verringerung der Proteinexpression nicht ausreichend genug sein, da das Proteinniveau ja nicht überprüft werden konnte. Eine erfolgreiche Verringerung der Proteinexpression könnte im letzteren Fall durch immunhistologische Färbungen, oder in Western Blots gezeigt werden. Keines der getesteten Antiseren gegen F3 aus anderen Spezies kreuzreagierte jedoch mit dem Zebrafischmolekül. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Anwendung von Morpholinos als sehr nützlich für eine funktionelle Analyse im Zebrafischsystem erwiesen hat, zumal die Überexpression der hier untersuchten Gene problematisch war. Die schnelle Embryonalentwicklung von Zebrafischen außerhalb des Muttertieres vereinfachte dabei die Analyse von Phänotypen.
5.6 Überexpression von L1.1, L1.2 und F3

Der Zebrafisch eignet sich besonders für Funktionsanalysen von Genen durch Überexpression. Die larvale Entwicklung verläuft außerhalb des Muttertieres und findet relativ zügig statt. Die Überexpression von Genen im Zebrafischsystem ist bereits anhand von mehreren Arbeiten demonstriert worden (Dornseifer et al., 1997;Kikuchi et al., 1997;Strahle et al., 1997;Yang et al., 2001). In dieser Arbeit wurde u.a. mit Hilfe dieser Methode versucht, die Rolle der Zellädhäsionsmoleküle L1.1, L1.2 und F3 an der Entwicklung des Nervensystems zu durchleuchten.

Eine Überexpression von L1.1, L1.2 und F3 im Zebrafischmodell konnte in dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Es wurden verschiedene RNA-Präparationen getestet, die zudem mit zwei unterschiedlichen Kits hergestellt wurden. Die Vermutung, dass die Qualität der, mit dem anfänglich benutzten MEGAScript TM Kit hergestellten, RNA nicht ausreichend war bestätigte sich nicht. Die in dieser Arbeit gezeigte Überexpression von β-Galaktosidase (Kap. 4.9) erfolgte schließlich unter Benutzung dieses Kits. Gegen diese Vermutung sprach auch die Tatsache, dass Überexpressionsexperimente von Roos *et al.* (1999) auch mit diesem Kit durchgeführt wurden.

Die Tauglichkeit der hergestellten Expressionsvektoren wurde auf mehrere Arten getestet. Zunächst konnte eine erfolgreiche Expression durch Transfektion der Plasmid-DNA in CHO-Zellen (Kap. 4.8.4) nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde durch dieses Experiment gezeigt, dass das exogene Protein auf der Zellmembran lokalisiert war, da die Immunfärbung an noch lebenden Zellen durchgeführt wurde. Dadurch konnte eine Permeabilisierung der Zellen umgangen werden, die das Eindringen der Antikörper in das Zytoplasma ermöglicht hätte. Dieser Befund war besonders wichtig, denn L1.1, L1.2 und F3 sollten als neurale Zelladhäsionsmoleküle, bei einer erfolgreichen Expression im Zebrafischsystem, möglichst an die Membran der Axone transportiert werden. Nur so könnte die Funktion dieser Moleküle beim Neuritenwachstum aussagekräftig analysiert werden.

Um die Tauglichkeit der Expressionsvektoren zu überprüfen, wurde weiterhin die Plasmid-DNA von L1.1 bzw. L1.2 in frisch befruchtete Eier injiziert. Interessanterweise konnte auf Anhieb eine Expression des ektopischen Proteins beobachtet werden, allerdings nur in einigen wenigen Rohon-Beard-Zellen und in einem Hirnstammneuron einer Larve, dessen gesamtes Axon auf grund des fluoreszierenden Myc Epitops im Fusionsprotein, fluoreszenzgefärbt war. Dieses Experiment bestätigte zum Einen nochmals, dass die Expressionsvektoren grundsätzlich funktionerten und lieferte zum Anderen einen interessanten Hinweis über die ausschließliche Lokalisation in neuronalen Zellen der ektopisch exprimierten Proteine. Dafür war vermutlich die Anwesenheit der RSLE-Sequenz auf der entsprechenden Polypeptidkette verantwortlich. Ihr Fehlen ermöglicht die Expression L1-ähnlicher Moleküle auch in nicht neuronalen Zellen (Miura et al., 1991). Letztendlich war aber die Injektion von Plasmid-DNA kein geeignetes Mittel, um eine funktionelle Analyse im Zebrafischsystem durchzuführen, da nur wenige Zellen das zu untersuchende Protein exprimieren.

In einem letzten Ansatz konnte aus den hergestellten Expressionsvektoren *in vitro* translatiertes Protein nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dabei war es bemerkenswert, dass ein Translationsprodukt nur dann entstand, wenn Plasmid-DNA als *template* für den Reaktionsansatz eingesetzt wurde, nicht aber mit RNA als *template*.

Der Verdacht lag nahe, dass die Qualität der injizierten RNA nicht ausreichend war. Entweder war die RNA nicht stabil genug und wurde zu schnell degradiert, so dass für einen Nachweis nicht ausreichend Protein synthetisert werden konnte, oder die Translationseffizienz war zu gering. Um eine frühzeitige Degradation der RNA zu verhindern, wurde den Präparationen RNase-Inhibitor während der RNA-Synthese zugefügt. Auch wurde auf zu grobe Aufreinigungsmethoden, wie z.B. Phenol-Chloroform-Extraktion, verzichtet. Die Aufreinigung der RNA-Präparationen erfolgte zwischenzeitlich über spezielle Säulen, mit denen auch RNA-Sonden aufgereinigt wurden. Als Letzteres ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg einbrachte, wurde dazu übergegangen auf eine Aufreinigung zu verzichten, da diese nicht für eine Expression erforderlich ist (I. Bach, per. Mitteilung).

Außerdem enthielt der pCS2-MT-Vektor das SV40 Polyadenilierungssignal, das eine erhöhte Stabilität der garantierte (Turner and Weintraub, 1994).

Eine ausreichende Translationseffizienz sollte dadurch gewährleistet werden, dass RNA-Präparationen mit dem mMessage mMachine KitTM von Ambion hergestellt wurden. Dieses Kit ist speziell für derartige Experimente konzipiert worden und wird von den meisten Experimentatoren benutzt. Sein Vorteil lag laut Hersteller bei der Synthese großer Mengen RNA, der auf effizienter Weise die Cap-Struktur an die 5'-Enden derRNA angehängt wird. *In vivo* ist jede mRNA mit dieser Struktur versehen, sie erhöht die Translationsrate der RNA. Allerdings waren bereits die mit dem MEGAScriptTM Kit hergestellten RNA-Präparationen durch Zusatz eines Cap-Analogs modifiziert, sodass hiervon keine großen Erwartungen ausgingen. Darüber hinaus wurde den zu untersuchenden Genen die Kozak-Sequenz (GCCACC) 5'-wärts des Stard-Codons kloniert, das für eine erhöhte Translation der RNA steht (Kozak and Shatkin, 1979).

Die genaue Ursache für eine erfolglose Überexpression konnte mit den hier angewendeten Methoden letztendlich nicht benannt werden. Versuche eine Expression wenigstens in frühen Stadien (4 hpf-16 hpf) der larvalen Entwicklung festzustellen, verliefen ebenfalls negativ. Da die Herstellung qualitativ hochwertiger RNA in unserem Labor bei molekularbiologischen Arbeiten mit RNA für andere Zwecke stets problemlos verlief, scheint es sich im Falle der Überexpression um ein genspezifisches Problem gehandelt zu haben, das in Kombination mit dem Zebrafischsystem zu keinem Erfolg geführt hatte.

5.7 Qualität der polyklonalen Antiseren

Während dieser Arbeit wurden polyklonale Antiseren gegen L1.1 bzw. L1.2 hergestellt. Dabei handelte es sich um Peptid-Antikörper, die durch Immunisierungen von Kaninchen mit L1.1- bzw. L1.2-spezifischen Peptiden (Kap.3.4.4) generiert wurden. Die Antiseren wurden in Western Blot-Analysen auf ihre Spezifität hin getestet.

Das Antiserum gegen L1.1 erkannte 3 Proteinbanden. Eine höhermolekulare bei ca. 200 kDa und zwei niedermolekulare um 150 kDa. Das Antiserum gegen L1.2 erkannte dagegen eine einzige Bande bei ca. 200 kDa. Da die entsprechenden Präimmunseren bei diesen Molekulargewichten keine Proteinbanden erkannten, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den detektierten Banden um spezifische Banden handelte.

Die Spezifität der erhaltenen Bandenmuster konnte durch Blockierungsexperimente mit dem jeweiligen Peptid, das zu Immunisierung der Kaninchen benutzt wurde, verdeutlicht werden. Im Falle des Antiserums gegen L1.2 reichten bereits geringe Mengen des Peptids für eine vollständige Blockierung des Antikörpers aus. Der Antikörper gegen L1.1 war dagegen auch bei Einsatz von höheren Mengen des Peptids nicht vollständig zu blockieren. Offenbar besaß Antikörper gegen L1.1 eine vergleichsweise geringere Affinität zum entsprechenden Epitop. Im Gegensatz dazu stand allerdings der Befund, dass L1.1, wenn es auf CHO-Zellen exprimiert wurde, besser detektiert werden konnte. Eine Erklärung für die unterschiedliche Reaktivität des Antiserums im Western Blot und in Zellkultur könnte sein, dass das Epitop im Gesamtprotein, begünstigt durch seine Sequenzumgebung, eine Tertiärstruktur einnimmt, die durch den Antikörper besser erkannt wird.

Die Spezifität der Antiseren konnte weiterhin untermauert werden, indem eine Veränderung der Bandenmuster entstand, wenn die elektrophoretisch aufgetrennten Gehirnhomogenate deglykosyliert wurden. Durch die Abspaltung der Glykoepitope erhöhte sich die Mobilität der höhermolekularen Fragmente. Dies sprach für die Spezifität der Antiseren, denn eine Glykosylierung von L1-ähnlichen Molekulen durch die Kopplung von HNK-1 war bereits beschrieben worden (Kruse et al., 1984). Interessanterweise war im Falle von L1.1 eine deutliche Abschwächung des Bandenmusters in deglykosylierten Gehirnhomogenaten zu beobachten. Dies könnte bedeuten, dass der Peptid-Antikörper gegen L1.1 eine höhere Affinität zum glykosylierten Protein hat.

Das Bandenmuster für L1.1 steht im Einklang mit dem von L1-ähnlichen Molekülen aus anderen Spezies (Mechtersheimer et al., 2001). Neben dem höhermolekularen Fragment, das aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsgrade im Western Blot als Schmier erscheinen kann, treten noch mindestens zwei diskrete Banden bei 140 kDa und 160 kDa auf, die durch proteolytische Spaltung des Proteins entstehen. Darüber hinaus war ein weiteres polyklonales Antiserum gegen L1.1 vorhanden (Labor Schachner), mit dem in dieser Arbeit immunhistologische Untersuchungen an Zebrafischlarven durchgeführt wurden. Letzteres unterschied sich in Western Blot-Analysen nicht in seinem Bandenmuster von dem hier charakterisierten Antiserum gegen L1.1 (J. Feldner, pers. Mitteilung).

Die Tatsache, dass im Falle von L1.2 nur eine Bande detektiert wird, könnte entweder mit nur einer Isoform des Proteins erklärt werden, oder aber mit einem Fehlen bzw. einer Maskierung des Epitops in niedermolekularen Isoformen des Proteins.

Für immunhistologische Untersuchungen an Zebrafischlarven war aber keiner der Peptid-Antikörper geeignet. Die Antiseren zeigten ein hohes Maß an unspezifischer Färbung, die sich nicht von der Färbung mit dem entsprechenden Präimmunserum unterschied.

Zusammenfassend hat sich der Zebrafisch als ein geeignetes System für eine funktionelle Analyse von Genen herausgestellt, da Funktionen mit verschiedenen Methoden zu pertubieren waren. Besonders der Gebrauch von Morpholinos hat sich dabei als sehr nützlich erwiesen. Die schnelle Entwicklung der Embryonen außerhalb des Muttertieres machten eine Untersuchung von Phänotypen einfach. Darüber hinaus liefert die EST-Datenbank (http://zfish.wustl.edu) eine Fülle von Möglichkeiten zur Klonierung neuer Gene im Zebrafisch.

6 Literaturverzeichnis

Agulnick, A.D., Taira, M., Breen, J.J., Tanaka, T., Dawid, I.B., and Westphal, H. (1996). Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. Nature *384*, 270-272.

Aparicio,S (2000). Vertebrate evolution: recent perspectives from fish. Trends Genet. 16, 54-56.

Asou,H., Miura,M., Kobayashi,M., and Uyemura,K. (1992). The cell adhesion molecule L1 has a specific role in neural cell migration. Neuroreport *3*, 481-484.

Bach,I. (2000). The LIM domain: regulation by association. Mech.Dev. 91, 5-17.

Bach,I., Carriere,C., Ostendorff,H.P., Andersen,B., and Rosenfeld,M.G. (1997). A family of LIM domain-associated cofactors confer transcriptional synergism between LIM and Otx homeodomain proteins. Genes Dev. *11*, 1370-1380.

Bach,I., Rodriguez-Esteban,C., Carriere,C., Bhushan,A., Krones,A., Rose,D.W., Glass,C.K., Andersen,B., Izpisua Belmonte,J.C., and Rosenfeld,M.G. (1999). RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. Nat.Genet. *22*, 394-399.

Barron,K.D., McGuinness,C.M., Misantone,L.J., Zanakis,M.F., Grafstein,B., and Murray,M. (1985). RNA content of normal and axotomized retinal ganglion cells of rat and goldfish. J.Comp Neurol. *236*, 265-273.

Bastmeyer, M., Schlosshauer, B., and Stuermer, C.A. (1990). The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by the monoclonal antibody D3. Development *108*, 299-311.

Becker, T. and Becker, C.G. (2001). Regenerating descending axons preferentially reroute to the gray matter in the presence of a general macrophage/microglial reaction caudal to a spinal transection in adult zebrafish. J.Comp Neurol. *433*, 131-147.

Becker, T., Becker, C.G., Schachner, M., and Bernhardt, R.R. (2001). Antibody to the HNK-1 glycoepitope affects fasciculation and axonal pathfinding in the developing posterior lateral line nerve of embryonic zebrafish. Mech. Dev. *109*, 37-49.

Becker, T., Bernhardt, R.R., Reinhard, E., Wullimann, M.F., Tongiorgi, E., and Schachner, M. (1998). Readiness of zebrafish brain neurons to regenerate a spinal axon correlates with differential expression of specific cell recognition molecules. J.Neurosci. *18*, 5789-5803.

Becker, T., Ostendorff, H., Bossenz, M., Schluter, A., Becker, C., Peirano, R., and Bach, I. (2002). Multiple functions of LIM domain-binding CLIM/NLI/Ldb cofactors during zebrafish development. Mech. Dev. *117*, 75.

Becker, T., Wullimann, M.F., Becker, C.G., Bernhardt, R.R., and Schachner, M. (1997). Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. J.Comp Neurol. *377*, 577-595.

Berglund,E.O., Murai,K.K., Fredette,B., Sekerkova,G., Marturano,B., Weber,L., Mugnaini,E., and Ranscht,B. (1999). Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. Neuron *24*, 739-750.

Bernhardt,R.R. (1999). Cellular and molecular bases of axonal regeneration in the fish central nervous system. Exp.Neurol. *157*, 223-240.

Bernhardt,R.R., Goerlinger,S., Roos,M., and Schachner,M. (1998). Anterior-posterior subdivision of the somite in embryonic zebrafish: implications for motor axon guidance. Dev.Dyn. *213*, 334-347.

Bernhardt,R.R., Tongiorgi,E., Anzini,P., and Schachner,M. (1996). Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. J.Comp Neurol. *376*, 253-264.

Bernstein, J.J. (1964). Relation of spinal cord regeneration to age in adult goldfish. Exp.Neurol. 9, 161-174.

Bernstein, J.J. (1988). Regeneration and grafting. J.Neurotrauma 5, 229-234.

Bieber, A.J., Snow, P.M., Hortsch, M., Patel, N.H., Jacobs, J.R., Traquina, Z.R., Schilling, J., and Goodman, C.S. (1989). Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. Cell *59*, 447-460.

Boyle, M.E., Berglund, E.O., Murai, K.K., Weber, L., Peles, E., and Ranscht, B. (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. Neuron *30*, 385-397.

Brent,L. and Drapeau,P. (2002). Targeted 'knockdown' of channel expression in vivo with an antisense morpholino oligonucleotide. Neuroscience *114*, 275.

Brümmendorf, T., Hubert, M., Treubert, U., Leuschner, R., Tarnok, A., and Rathjen, F.G. (1993). The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. Neuron *10*, 711-727.

Brümmendorf, T., Kenwrick, S., and Rathjen, F.G. (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. Curr.Opin.Neurobiol. *8*, 87-97.

Brümmendorf, T. and Rathjen, F.G. (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.

Brümmendorf, T., Wolff, J.M., Frank, R., and Rathjen, F.G. (1989). Neural cell recognition molecule F11: homology with fibronectin type III and immunoglobulin type C domains. Neuron 2, 1351-1361.

Bunt,S.M. and Fill-Moebs,P. (1984). Selection of pathways by regenerating spinal cord fiber tracts. Brain Res. *318*, 307-311.

Burgoon,M.P., Grumet,M., Mauro,V., Edelman,G.M., and Cunningham,B.A. (1991). Structure of the chicken neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM: origin of the polypeptides and relation to the Ig superfamily. J.Cell Biol. *112*, 1017-1029.

Buttiglione, M., Revest, J.M., Pavlou, O., Karagogeos, D., Furley, A., Rougon, G., and Faivre-Sarrailh, C. (1998). A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1

and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. J.Neurosci. *18*, 6853-6870.

Castellani,V., Chedotal,A., Schachner,M., Faivre-Sarrailh,C., and 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.

Cervello, M., Lemmon, V., Landreth, G., and Rutishauser, U. (1991). Phosphorylationdependent regulation of axon fasciculation. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *88*, 10548-10552.

Challa,A.K., Beattie,C.E., and Seeger,M.A. (2001). Identification and characterization of roundabout orthologs in zebrafish. Mech.Dev. *101*, 249-253.

Chu,F.K. (1986). Requirements of cleavage of high mannose oligosaccharides in glycoproteins by peptide N-glycosidase F. J.Biol.Chem. *261*, 172-177.

Coggeshall, R.E., Birse, S.G., and Youngblood, C.S. (1982). Recovery from spinal transection in fish. Neurosci.Lett. *32*, 259-264.

Coggeshall,R.E. and Youngblood,C.S. (1983). Recovery from spinal transection in fish: regrowth of axons past the transection. Neurosci.Lett. *38*, 227-231.

Dawid,I.B. and Chitnis,A.B. (2001). Lim homeobox genes and the CNS: a close relationship. Neuron *30*, 301-303.

De Benedictis,L., Polizzi,A., Cangiano,G., Buttiglione,M., Arbia,S., Storlazzi,C.T., Rocchi,M., and Gennarini,G. (2001). Alternative promoters drive the expression of the gene encoding the mouse axonal glycoprotein F3/contactin. Brain Res.Mol.Brain Res. *95*, 55-74.

DeBernardo, A.P. and Chang, S. (1996). Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. J.Cell Biol. *133*, 657-666.

Dornseifer, P., Takke, C., and Campos-Ortega, J.A. (1997). Overexpression of a zebrafish homologue of the Drosophila neurogenic gene Delta perturbs differentiation of primary neurons and somite development. Mech. Dev. *63*, 159-171.

Dorries, U., Taylor, J., Xiao, Z., Lochter, A., Montag, D., and Schachner, M. (1996). Distinct effects of recombinant tenascin-C domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. J.Neurosci.Res. *43*, 420-438.

Durbec, P., Gennarini, G., Goridis, C., and Rougon, G. (1992). A soluble form of the F3 neuronal cell adhesion molecule promotes neurite outgrowth. J.Cell Biol. *117*, 877-887.

Edelman,G.M., Cunningham,B.A., Gall,W.E., Gottlieb,P.D., Rutishauser,U., and Waxdal,M.J. (1969). The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *63*, 78-85.

Ekker, S.C. and Larson, J.D. (2001). Morphant technology in model developmental systems. Genesis. *30*, 89-93.

Engel, J. (1991). Domains in proteins and proteoglycans of the extracellular matrix with functions in assembly and cellular activities. Int.J.Biol.Macromol. *13*, 147-151.

Felsenfeld,D.P., Hynes,M.A., Skoler,K.M., Furley,A.J., and Jessell,T.M. (1994). TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins. Neuron *12*, 675-690.

Fischer,G., Kunemund,V., and Schachner,M. (1986). Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. J.Neurosci. *6*, 605-612.

Fujita,N., Saito,R., Watanabe,K., and Nagata,S. (2000). An essential role of the neuronal cell adhesion molecule contactin in development of the Xenopus primary sensory system. Dev.Biol. *221*, 308-320.

Gates, M.A., Kim, L., Cardozo, T., Sirotkin, H.I., Lashkari, D., Abagyan, R., Schier, A.F., and Talbot, W.S. (1999). A genetic linkage map for zebrafish: comparative analysis and localization of genes and expressed sequences. Genome Research *9*, 334-347.

Gaze, R.M. (1970). The Formation of Nerve Connections. Academic Press, London .

Gennarini,G., Cibelli,G., Rougon,G., Mattei,M.G., and Goridis,C. (1989). The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidylinositol- anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. J.Cell Biol. *109*, 775-788.

Gennarini,G., Durbec,P., Boned,A., Rougon,G., and Goridis,C. (1991). Transfected F3/F11 neuronal cell surface protein mediates intercellular adhesion and promotes neurite outgrowth. Neuron *6*, 595-606.

Giordano, S., Laessing, U., Ankerhold, R., Lottspeich, F., and Stuermer, C.A. (1997). Molecular characterization of E587 antigen: an axonal recognition molecule expressed in the goldfish central nervous system. J.Comp Neurol. *377*, 286-297.

Grumet, M. (1997). Nr-CAM: a cell adhesion molecule with ligand and receptor functions. Cell Tissue Res. *290*, 423-428.

Grumet, M., Mauro, V., Burgoon, M.P., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. (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.

Hall,H., Walsh,F.S., and Doherty,P. (1996). Review: a role for the FGF receptor in the axonal growth response stimulated by cell adhesion molecules? Cell Adhes.Commun. *3*, 441-450.

Herdegen, T., Bastmeyer, M., Bahr, M., Stuermer, C., Bravo, R., and Zimmermann, M. (1993). Expression of JUN, KROX, and CREB transcription factors in goldfish and rat retinal ganglion cells following optic nerve lesion is related to axonal sprouting. J.Neurobiol. *24*, 528-543.

Hobert, O. and Westphal, H. (2000). Functions of LIM-homeobox genes. Trends Genet. 16, 75-83.

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.

Howard, P.W. and Maurer, R.A. (2000). Identification of a conserved protein that interacts with specific LIM homeodomain transcription factors. J.Biol.Chem. 275, 13336-13342.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69, 11-25.

Jacobson, M. (1993). Developmental Neurobiology. Plenum, New York 3rd ed.

Jurata, L.W. and Gill, G.N. (1997). Functional analysis of the nuclear LIM domain interactor NLI. Mol.Cell Biol. 17, 5688-5698.

Jurata,L.W., Kenny,D.A., and Gill,G.N. (1996). Nuclear LIM interactor, a rhombotin and LIM homeodomain interacting protein, is expressed early in neuronal development. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *93*, 11693-11698.

Jurata,L.W., Thomas,J.B., and Pfaff,S.L. (2000). Transcriptional mechanisms in the development of motor control. Curr.Opin.Neurobiol. *10*, 72-79.

Kania, A., Johnson, R.L., and Jessell, T.M. (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. Cell *102*, 161-173.

Kappen,C. (2000). Analysis of a complete homeobox gene repertoire: implications for the evolution of diversity. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *97*, 4481-4486.

Keilhauer,G., Faissner,A., and Schachner,M. (1985). Differential inhibition of neuroneneurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. Nature *316*, 728-730.

Kemler, R. and Ozawa, M. (1989). Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca2+-dependent cell adhesion molecule. Bioessays *11*, 88-91.

Kikuchi,Y., Segawa,H., Tokumoto,M., Tsubokawa,T., Hotta,Y., Uyemura,K., and Okamoto,H. (1997). Ocular and cerebellar defects in zebrafish induced by overexpression of the LIM domains of the islet-3 LIM/homeodomain protein. Neuron *18*, 369-382.

Kornblihtt,A.R., Umezawa,K., Vibe-Pedersen,K., and Baralle,F.E. (1985). Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. EMBO J. *4*, 1755-1759.

Korzh,V., Edlund,T., and Thor,S. (1993). Zebrafish primary neurons initiate expression of the LIM homeodomain protein Isl-1 at the end of gastrulation. Development *118*, 417-425.

Kozak, M. and Shatkin, A.J. (1979). Characterization of translational initiation regions from eukaryotic messenger RNAs. Methods Enzymol. *60*, 360-375.

Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. (1984). Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. Nature *311*, 153-155. Laessing,U., Giordano,S., Stecher,B., Lottspeich,F., and Stuermer,C.A. (1994). Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC- 1/BEN. Differentiation *56*, 21-29.

Lee, J.S., Ray, R., and Chien, C.B. (2001). Cloning and expression of three zebrafish roundabout homologs suggest roles in axon guidance and cell migration. Dev.Dyn. 221, 216-230.

Lindner, J., Rathjen, F.G., and Schachner, M. (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. Nature *305*, 427-430.

Malhotra, J.D., Tsiotra, P., Karagogeos, D., and Hortsch, M. (1998). Cis-activation of L1mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. J.Biol.Chem. *273*, 33354-33359.

McClintock, J.M., Kheirbek, M.A., and Prince, V.E. (2002). Knockdown of duplicated zebrafish hoxb1 genes reveals distinct roles in hindbrain patterning and a novel mechanism of duplicate gene retention. Development *129*, 2339-2354.

McQuarrie, I.G. and Grafstein, B. (1982). Protein synthesis and axonal transport in goldfish retinal ganglion cells during regeneration accelerated by a conditioning lesion. Brain Res. *251*, 25-37.

Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Fogel, M., Lemmon, V., and Altevogt, P. (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. J.Cell Biol. *155*, 661-673.

Metcalfe, W.K., Myers, P.Z., Trevarrow, B., Bass, M.B., and Kimmel, C.B. (1990). Primary neurons that express the L2/HNK-1 carbohydrate during early development in the zebrafish. Development *110*, 491-504.

Meyer, R.L., Sakurai, K., and Schauwecker, E. (1985). Topography of regenerating optic fibers in goldfish traced with local wheat germ injections into retina: evidence for discontinuous microtopography in the retinotectal projection. J.Comp Neurol. *239*, 27-43.

Milan,M. and Cohen,S.M. (1999). Regulation of LIM homeodomain activity in vivo: a tetramer of dLDB and apterous confers activity and capacity for regulation by dLMO. Mol.Cell *4*, 267-273.

Miura, M., Kobayashi, M., Asou, H., and Uyemura, K. (1991). Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. FEBS Lett. *289*, 91-95.

Mochizuki, T., Karavanov, A.A., Curtiss, P.E., Ault, K.T., Sugimoto, N., Watabe, T., Shiokawa, K., Jamrich, M., Cho, K.W., Dawid, I.B., and Taira, M. (2000). Xlim-1 and LIM domain binding protein 1 cooperate with various transcription factors in the regulation of the goosecoid promoter. Dev. Biol. *224*, 470-485.

Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K., and Schachner, M. (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. Nature *334*, 701-703.

Morales,G., Hubert,M., Brummendorf,T., Treubert,U., Tarnok,A., Schwarz,U., and Rathjen,F.G. (1993). Induction of axonal growth by heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins F11 and Nr-CAM/Bravo. Neuron *11*, 1113-1122.

Morcillo, P., Rosen, C., Baylies, M.K., and Dorsett, D. (1997). Chip, a widely expressed chromosomal protein required for segmentation and activity of a remote wing margin enhancer in Drosophila. Genes Dev. *11*, 2729-2740.

Moscoso,L.M. and Sanes,J.R. (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.

Myers, P.Z., Eisen, J.S., and Westerfield, M. (1986). Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. J.Neurosci. *6*, 2278-2289.

Nasevicius, A. and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. Nat.Genet. 26, 216-220.

Nasevicius, A., Larson, J., and Ekker, S.C. (2000). Distinct requirements for zebrafish angiogenesis revealed by a VEGF-A morphant. Yeast *17*, 294-301.

Olive,S., Dubois,C., Schachner,M., and Rougon,G. (1995). The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized to glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum. J.Neurochem. *65*, 2307-2317.

Orr,H.T., Lancet,D., Robb,R.J., Lopez de Castro,J.A., and Strominger,J.L. (1979). The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B7 contains an immunoglobulin-like region. Nature *282*, 266-270.

Ostendorff,H.P., Peirano,R.I., Peters,M.A., Schluter,A., Bossenz,M., Scheffner,M., and Bach,I. (2002). Ubiquitination-dependent cofactor exchange on LIM homeodomain transcription factors. Nature *416*, 99-103.

Paschke,K.A., Lottspeich,F., and Stuermer,C.A. (1992). Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. J.Cell Biol. *117*, 863-875.

Pesheva,P., Gennarini,G., Goridis,C., and Schachner,M. (1993). The F3/11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180. Neuron *10*, 69-82.

Pfaff,S.L., Mendelsohn,M., Stewart,C.L., Edlund,T., and Jessell,T.M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. Cell *84*, 309-320.

Postlewait, J.H., Woods, I.G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y.-L., Kelly, P.D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A., and Talbot, W.S. (2000). Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. Genome Research *10*, 1890-1902.

Ranscht,B. (1988). Sequence of contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. J.Cell Biol. *107*, 1561-1573.

Reichardt, L.F. and Tomaselli, K.J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. Annu.Rev.Neurosci. 14, 531-570.

Reid,R.A. and Hemperly,J.J. (1992). Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. J.Mol.Neurosci. *3*, 127-135.

Rigato,F., Garwood,J., Calco,V., Heck,N., Faivre-Sarrailh,C., and Faissner,A. (2002). Tenascin-C promotes neurite outgrowth of embryonic hippocampal neurons through the alternatively spliced fibronectin type III BD domains via activation of the cell adhesion molecule F3/contactin. J.Neurosci. 22, 6596-6609.

Rincon-Limas, D.E., Lu, C.H., Canal, I., and Botas, J. (2000). The level of DLDB/CHIP controls the activity of the LIM homeodomain protein apterous: evidence for a functional tetramer complex in vivo. EMBO J. *19*, 2602-2614.

Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Bardet, P.L., Zelus, D., Hughes, S., and Laudet, V. (2001). Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. Genome Research *11*, 781-788.

Ross,L.S., Parrett,T., and Easter,S.S., Jr. (1992). Axonogenesis and morphogenesis in the embryonic zebrafish brain. J.Neurosci. *12*, 467-482.

Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 238, 491-497.

Sambrook, J., Fritch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor.

Sanes, J.R. (1989). Extracellular matrix molecules that influence neural development. Annu.Rev.Neurosci. *12*, 491-516.

Schachner, M., Antonicek, H., Fahrig, T., Faissner, A., Fischer, G., Künemund, V., Martini, R., Meyer, A., Persohn, E., Pollerberg, E., Probstmeier, R., Sadoul, K., Sadoul, R., Seilheimer, B., and Thor, G. Families of neural cell adhesion molecules. Edelman, G. M., Cunningham, B. A., and Thiery, J. P. Morphoregulatory Molecules. 443-468. 1990. New York, John Wiley and Sons.

Schachner, M. and Martini, R. (1995). Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. Trends Neurosci. *18*, 183-191.

Segawa,H., Miyashita,T., Hirate,Y., Higashijima,S., Chino,N., Uyemura,K., Kikuchi,Y., and Okamoto,H. (2001). Functional repression of Islet-2 by disruption of complex with Ldb impairs peripheral axonal outgrowth in embryonic zebrafish. Neuron *30*, 423-436.

Sharma,K., Sheng,H.Z., Lettieri,K., Li,H., Karavanov,A., Potter,S., Westphal,H., and Pfaff,S.L. (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. Cell *95*, 817-828.

Sharma,S.C., Jadhao,A.G., and Rao,P.D. (1993). Regeneration of supraspinal projection neurons in the adult goldfish. Brain Res. *620*, 221-228.

Shepherd, I., Luo, Y., Raper, J.A., and Chang, S. (1996). The distribution of collapsin-1 mRNA in the developing chick nervous system. Dev.Biol. *173*, 185-199.

Shoji,W., Yee,C.S., and Kuwada,J.Y. (1998). Zebrafish semaphorin Z1a collapses specific growth cones and alters their pathway in vivo. Development *125*, 1275-1283.

Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. Nature 346, 425-434.

Strahle, U., Fischer, N., and Blader, P. (1997). Expression and regulation of a netrin homologue in the zebrafish embryo. Mech. Dev. *62*, 147-160.

Stuermer, C.A. (1988). Trajectories of regenerating retinal axons in the goldfish tectum: I. A comparison of normal and regenerated axons at late regeneration stages. J.Comp Neurol. *267*, 55-68.

Stuermer, C.A., Bastmeyer, M., Bahr, M., Strobel, G., and Paschke, K. (1992). Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. J.Neurobiol. 23, 537-550.

Summerton, J. and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7, 187-195.

Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science *251*, 1451-1455.

Tarentino, A.L., Gomez, C.M., and Plummer, T.H., Jr. (1985). Deglycosylation of asparaginelinked glycans by peptide: N-glycosidase F. Biochemistry 24, 4665-4671.

Taylor, J., Van de Peer, Y., and Meyer, A. (2001). Genome duplication, divergent resolution and speciation. Trends Genet. *17*, 299-301.

Taylor, J.S., Van de Peer, Y., Braasch, I., and Meyer, A. (2001b). Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. *356*, 1661-1679.

Tessier-Lavigne, M. and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. Science *274*, 1123-1133.

Thor, S., Andersson, S.G., Tomlinson, A., and Thomas, J.B. (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. Nature *397*, 76-80.

Tongiorgi, E., Bernhardt, R.R., and Schachner, M. (1995). Zebrafish neurons express two L1-related molecules during early axonogenesis. J.Neurosci.Res. 42, 547-561.

Torigoi, E., Bennani-Baiti, I.M., Rosen, C., Gonzalez, K., Morcillo, P., Ptashne, M., and Dorsett, D. (2000). Chip interacts with diverse homeodomain proteins and potentiates bicoid activity in vivo. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *97*, 2686-2691.

Toyama, R., Kobayashi, M., Tomita, T., and Dawid, I.B. (1998). Expression of LIM-domain binding protein (ldb) genes during zebrafish embryogenesis. Mech. Dev. 71, 197-200.

Turner, D.L. and Weintraub, H. (1994). Expression of achaete-scute homolog 3 in Xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. Genes Dev. *8*, 1434-1447.

van der Sar, A.M., Zivkovic, D., and den Hertog, J. (2002). Eye defects in receptor proteintyrosine phosphatase alpha knock-down zebrafish. Dev. Dyn. 223, 292-297. van Meyel,D.J., O'Keefe,D.D., Jurata,L.W., Thor,S., Gill,G.N., and Thomas,J.B. (1999). Chip and apterous physically interact to form a functional complex during Drosophila development. Mol.Cell *4*, 259-265.

van Meyel,D.J., O'Keefe,D.D., Thor,S., Jurata,L.W., Gill,G.N., and Thomas,J.B. (2000). Chip is an essential cofactor for apterous in the regulation of axon guidance in Drosophila. Development *127*, 1823-1831.

Varela-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A.W., and Guthrie, S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. Neuron *18*, 193-207.

Vielmetter, J., Lottspeich, F., and Stuermer, C.A. (1991). The monoclonal antibody E587 recognizes growing (new and regenerating) retinal axons in the goldfish retinotectal pathway. J.Neurosci. *11*, 3581-3593.

Volkmer,H., Hassel,B., Wolff,J.M., Frank,R., and Rathjen,F.G. (1992). Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and its relationship to a neural subgroup of the immunoglobulin superfamily. J.Cell Biol. *118*, 149-161.

Walsh,F.S. and Doherty,P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. Annu.Rev.Cell Dev.Biol. *13*, 425-456.

Weiland, U.M., Ott, H., Bastmeyer, M., Schaden, H., Giordano, S., and Stuermer, C.A. (1997). Expression of an L1-related cell adhesion molecule on developing CNS fiber tracts in zebrafish and its functional contribution to axon fasciculation. Mol.Cell Neurosci. *9*, 77-89.

Westerfield, M. (1989). The Zebrafish Book. Oregon Press.

Williams, A.F. and Barclay, A.N. (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. Annu.Rev.Immunol. *6*, 381-405.

Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S., and Doherty, P. (1994). Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. Neuron 13, 583-594.

Wilson,S.W., Ross,L.S., Parrett,T., and Easter,S.S., Jr. (1990). The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, Brachydanio rerio. Development *108*, 121-145.

Wittbrodt, J., Meyer, A., and Schartl, M. (1998). More genes in fish? Bioessays 20, 511-512.

Wolff,J.M., Brummendorf,T., and Rathjen,F.G. (1989). Neural cell recognition molecule F11: membrane interaction by covalently attached phosphatidylinositol. Biochem.Biophys.Res.Commun. *161*, 931-938.

Woods,I.G., Kelly,P.D., Chu,F., Ngo-Hazelett,P., Yan,Y.-L., Huang,H., Postlewait,J.H., and Talbot,W.S. (2000). A comparative map of the zebrafish genome. Genome Research *10*, 1903-1914.

Xiao,Z.C., Revest,J.M., Laeng,P., Rougon,G., Schachner,M., and Montag,D. (1998). Defasciculation of neurites is mediated by tenascin-R and its neuronal receptor F3/11. J.Neurosci.Res. *52*, 390-404.

Xiao,Z.C., Taylor,J., Montag,D., Rougon,G., and Schachner,M. (1996). Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11. Eur.J.Neurosci. *8*, 766-782.

Yang,Z., Liu,N., and Lin,S. (2001). A zebrafish forebrain-specific zinc finger gene can induce ectopic dlx2 and dlx6 expression. Dev.Biol. 231, 138-148.

Zottoli,S.J., Bentley,A.P., Feiner,D.G., Hering,J.R., Prendergast,B.J., and Rieff,H.I. (1994). Spinal cord regeneration in adult goldfish: implications for functional recovery in vertebrates. Prog.Brain Res. *103*, 219-228.

7 Anhang

Zusammenfassung

Zebrafische sind ein Modellsystem für axonales Wachstum. Während der Entwicklung des Nervensystems, aber auch während der Regeneration des adulten Nervensystems werden Moleküle exprimiert, die den Zell-Zell-Kontakt, oder auch den Kontakt einer Zelle mit ihrer Umgebung vermitteln. Zu diesen Molekülen zählen die neuralen Zelladhäsionsmoleküle. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1.1 und L1.2, zweier L1-verwandter Moleküle, bei der Entwicklung des Nervensystems des Zebrafisches untersucht. Die Expression der entsprechenden Gene findet während der Axonogenese in postmitotischen Neuronen statt und nimmt in der weiteren Entwicklung ab (Tongiorgi *et al.*, 1995).

Die zelluläre Lokalisation von L1.1 wurde durch immunhistochemische Färbungen an Kryostatschnitten von Zebrafischlarven mit einem polyklonalen Antiserum gegen L1.1 genauer untersucht. Dabei konnte das Protein auf den Axonen der optischen Projektion, in kommissuralen Axonen des Gehirns und auf Axonen im Rückenmark lokalisiert werden. Um die Funktion von L1.1 und L1.2 während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, wurde durch die Injektion von speziellen *antisense*-Oligonukleotiden (Morpholinos) die Translation der L1.1- bzw. L1.2-mRNA blockiert. Der Phänotyp der injizierten Larven konnte 27 und 33 Stunden nach der Befruchtung durch immunhistochemische Färbung der Axone analysiert werden. Dabei konnten Abberationen im axonalen Wachstum, in der Faszikulierung und in der axonalen Wegfindung festgestellt werden. Die erfolgreiche Blockierung der L1.1-Proteinsynthese wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Des weiteren wurden kommerziell hergestellte Antikörper gegen L1.1 und L1.2 biochemisch charakterisiert.

Eine funktionelle Analyse von L1.1 und L1.2 sollte in einem alternativen Experiment erfolgen, indem *in vitro* transkribierte RNA synthetisiert und in frisch befruchtete Zebrafischeier injiziert wurde. Dafür wurden Expressionsvektoren für L1.1 und L1.2 konstruiert, durch die das kovalent gebundene Myc-Epitop, oder das EGFP-Epitop zum Nachweis des ektopischen Proteins nachgewiesen werden sollte. Eine *in vivo*-Expression der Proteine konnte auf diesem Wege allerdings nicht erzielt werden.

Auf der Suche nach weiteren neuralen Zelladhäsionsmolekülen und potentiellen Interaktionspartnern von L1.1 und L1.2 wurde ein neues Gen identifiziert, das bereits in anderen Spezies beschrieben wurde und an der Interaktion neuronaler Zellen mit der Umgebung beteiligt ist.

Die Durchsuchung einer EST-(*expressed sequence tag*)-Datenbank führte zur Identifizierung eines F3/F11/Contactin-homologen Gens im Zebrafisch, einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie der neuralen Zelladhäsionsmoleküle. Das Gen wurde mittels der 5'-RACE-Amplifikationstechnik vollständig kloniert. Eine Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz ergab, dass das klonierte Gen zu 55% identisch mit F3/F11/Contactin aus anderen Wirbeltieren ist. Deswegen wurde das neue Gen F3 genannt. Untersuchungen des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters des neuen Gens während der Embryonalentwicklung offenbarten eine Beschränkung der Expression von F3 auf eine Subpopulation von Neuronen, die mit der Expression des *Xenopus*-Homologs korrelierte. Das neue Gen wurde F3 genannt. Es konnte gezeigt werden, dass F3 im adulten Zebrafisch nach einer Läsion des optischen Nerven in Retinaganglienzellen und Gliazellen der optischen Projektion transient hochreguliert wird, ebenso wie in Gliazellen der weißen Substanz und in Hirnnuklei mit spinalen Axonen nach einer Läsion des Rückenmarks. Eine Funktion von F3 beim axonalen Wachstum konnte, durch Überexpression des Proteins bzw. Blockierung der Proteinsynthese mit Hilfe von Morpholinos, nicht nachgewiesen werden. Allerdings ließ die Herabsetzung der F3 mRNA-Expression in den Rohon-Beard-Zellen und im Trigeminalisganglion, nach Injektion einer dominant-negativen (DN) Form des Cotranskriptionsfaktors CLIM, über eine Rolle des Gens bei der Entwicklung des Nervensystems im Zebrafisch spekulieren. Becker et al. (2002) stellten fest, dass die Überexpression von DN-CLIM das Auswachsen peripherer Axone von Rohon-Beard-Zellen und Neuronen des Trigeminalisganglions inhibiert. Diese Befunde liefern einen Ansatz über eine mögliche direkte oder indirekte Regulation von F3.

Abkürzungen

A _{xxx}	Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm		
AK	Antikörper		
AP	alkalische Phosphatase		
APS	Ammoniumpersulfat		
Aqua _{demin}	demineralisiertes Wasser		
Aqua _{bidest}	zweifach destiliertes Wasser		
BCIP	5–Bromo–4–Chloro–3–Indolyl-Phosphat		
bp	Basenpaare		
cDNA	complementary DNA		
СНО	chinese hamster ovary		
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)		
DAB	Diaminobenzidin		
DGPI-Datenbank	detection/prediction of GPI cleavage site		
DIG	Digoxigenin		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DN	dominant-negativ		
DNA	desoxyribonucleic acid		
Dnase	Desoxyribonuklease		
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat		
dpl	days post-lesion		
ECM	extracelluar matrix		
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
EGFP	enhanced green fluorescent protein		
Endkonz.	Endkonzentration		
EST	expressed sequence tag		
FCS	fetal calf serum (fötales Kalbsserum)		
FGRB	formaldehyde gel running buffer		
FN-Typ-(III)	Fibronektin-Typ-(III)		
G+A	Glutamat + Aspartat		
GFAP	glial filament acidic protein		
GMEM	Glasgow's Modified Eagle's Medium		
GPI	Glykosylphophatidylinositol		
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution		
hpf	hours post-fertilization		
HNK-1	human natural killer cell Kohlenhydratepitop (3'-sulfatierte		
	Glucuronsäure an einem Lactosaminylrest)		
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)		
Ig	Immunglobulin		
IRF	intermediate reticular formation		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
LB	Luria Bertani		
MAb	monoclonal antibody		
MaON	magnocellular octaval nucleus		
min	Minuten		
MO	Morpholino		
MOPS	morpholinopropane sulfonic acid		
M_w	relative Molekülmasse		
MSS22	methane sulfonate salt (3-Aminobenzoesäureethylesther)		

NEAA	non essential amino acids		
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium		
NMLF	nucleus of the medial longitudinal fascicle		
ORF	open reading frame		
PA	Paraformaldehyd		
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese		
PBS	phosphate buffered saline		
pc	posterior commissure		
PCR	polymerase chain reaction		
Pen/Strep	Penicilin/Streptomycin		
Pfam HMM-	Datenbank für multiple Sequenzvergleiche von Proteindomänen und		
Datenbank	konservierten Proteinabschnitten nach dem hidden Markov model		
PNS	peripheres Nervensystem		
RACE	rapid amplification of cDNA ends		
RGC	Retinaganglienzellen		
RNA	ribonucleic acid		
RNase	Ribonuklease		
rpm	rounds per minute		
RT	Raumtemperatur		
sek	Sekunden		
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)		
Std	Stunde		
Std.Ctl.MO	Standard-Kontroll-Morpholino		
U	units		
ü.N.	über Nacht		
(v/v)	volume per volume		
wt	Wildtyp		
(w/v)	weight per volume		
ZNS	zentrales Nervensystem		

cDNA des F3 Gens (Danio rerio)

1	atgattccag	aggccttcca	gcccagagcc	atgaagcaca	ccaccaccgt	cctgatgctc
61	gcgctgtcct	cccgcttttg	gtcggtgtgt	gctgatttcc	cagaagtcta	tgggggtgag
121	tctgcaggct	tcgggccggt	gttcgaggag	cagccgctcg	acaccatcta	ccctgaggag
181	agtccagagg	agaagatcac	actgacctgc	aggaccagag	ccaacccacc	tgcctcatac
241	aggtggaggc	tgaataacgc	agagctggtg	ttagcggagg	gcagtgatcc	tcactacagc
301	gtgtcggagg	gaaacctgct	gatcagctca	cctgacaaga	gcaaacatgc	gggaaactac
361	acctgtgtgg	ccagcaacca	gtacggcagc	gtcaccagcc	ggagagccag	agtacagttc
421	ggctatctgg	acatgttctc	cacggacgag	cgggaggcgg	tctacgtcaa	ggagggccag
481	ggggcggttc	ttctgtgtgc	cccgcctcca	cacttcccag	aggatttgtc	gttccgctgg
541	atgctgaacg	agttcccgga	gttcatccct	ctggaccagc	ggcgcttcgt	ctctcagagc
601	accggcaacc	tctacatctc	cacggtgcgc	tccaccgaca	gtggaaacta	ctcctgcttc
661	gtctccagcc	ctgccatcgc	caagagcgtc	ttcagcaagt	tcatcccgct	ggtgcccatc
721	gccgagcgtt	ctcttcgtaa	atatcctgct	gatattaaag	tcaagtcccc	ggacagctgg
781	gctctgctgg	gtcagaacgt	cacgctcgag	tgtttcgcgc	tgggaaaccc	gatcccgcag
841	atccgctgga	ggaagctgga	cggtgttctc	ccgccgctcc	gccatgatgt	cagcatgtcc
901	ggcgctctgc	tgcacctcta	cagtctgcag	tatgaggacg	aggggctgta	cgagtgtgag
961	gccgacaact	ccaagggcaa	agactggcac	aaaacacacc	tctacgtgga	gggagctcct
1021	gattggctgg	agcagatcag	cagttcagag	gtggacatcg	ggggcgatta	catcatgtcc
1081	tgtcaggcca	gtgggaaacc	caaaccacac	gtgcacttcc	tgaagaacgg	ccacatgtac
1141	atgaagggtc	atgaggtccg	cttctccagg	ctggggttcg	aggactctgg	gatgtatcag
1201	tgtgtggctg	agaaccgtca	cggtgtgatt	cacgctaacg	ctgagctgcg	ggtgttcgcc
1261	agcgctcctt	cattccagta	taacccagtt	aaacccaaac	tcctgggggc	cagaaacggc
1321	cgggtggtgt	tcgaatgcag	acctcgagct	gcaccgcgac	ccaacatcac	ctggagcaaa
1381	ggaacagaac	tcctgcacaa	ctccagcagg	atctccatct	ggctggacgg	cagtttagag
1441	ctgctgaaca	tctccaagtc	tgatgagggg	aagtacacct	gcttcgcaga	gaacgaccgc
1501	ggccgagcca	acagcactgg	atcactgtca	atcacagacg	ccactaagat	cactctggct
1561	ccgtcgaatg	cggatgtgag	tgtgggcgag	gacgctcgta	tggagtgtgt	ggcgtcccat
1621	gaccccggcc	tcgacctcac	cttcatctgg	agcctggacg	gacacaccat	caacctgcag
1681	cgggacgcac	agcactacca	gcgcaagatg	gacagtgcga	gcgggacgtc	cagctcagag
1741	ctgctgatca	cacacacaca	gctgagacac	gccggacgct	acagctgcac	cgcacagaca
1801	cctgtggaca	acaccactgc	atctgcagag	ctggtggtca	gaggtccccc	agggccccct
1861	ggtggtgtgc	gtgtggatga	ggtgacgtct	gacagtgtga	gggtgctgtg	gagtcacggc
1921	actgacaatc	tgagccccat	ctccagatac	accgtccagc	tcagagaatc	tgcagcgcag
1981	caggactgga	gagacgccgc	tacctcccca	gtgaatgtgg	agggaaatgc	agaaatggcc
2041	accgtggtaa	acctgctgcc	ctggacggag	tatgagttcc	gggtcatcgc	caccaacaca
2101	ctgggcaccg	ggccgcccag	cgaaccctca	cccaaaacca	ccactagaga	agcacggccg
2161	atcgtggctc	cgtcagacat	aggtggcggg	ggagggacca	gccgagagct	caccatcacc
2221	tggacgccgg	tgcagtctca	gtattactac	ggcagtaact	tcggctacat	catcgccttc
2281	aagccccata	atgacccaga	gtggctgcgg	gtcaccgtca	ctgacccaga	ggcgcagaaa
2341	tacgtccaca	aagaccccaa	aatccccccg	tccacacgct	tcgaggtcaa	gatgaaggcc
2401	ttcaacagcc	agggggaggg	accetteage	aacagcgctt	tcatatactc	tgcacaggac
2461	gtgccggccg	aggcccccat	catcacagaa	gcgagggctc	tgtctgccac	tgaagcgatc
2521	gtcatctggg	tgcctgtgca	gctgccgacg	gtggagagat	atcaggtgcg	gtactggcgt
2581	gagtctgtag	agaacgaagc	gtctgcgcag	cgggttctgg	tgtccagtcg	agagaatcac
2641	acacgtctgg	acaacatgaa	gcccgactca	cactacctgg	tggaggtgcg	cgcgtgtaac
2701	ggagccggat	acggacccgc	cagccagcgc	aacaggatat	acaccaagaa	gtcccctccc
2761	agtcgtcctc	ctaagatcat	cagcactaag	atgcactaca	gcggcacctc	catcaacatc
2821	gcctgggaga	aggtggagtc	gctgaacaac	gagtcaacgg	tggcgggata	taaggtcctg
2881	taccggcagc	acggccagcc	cagcggcacg	ctctacacca	ccgagaagca	gtccatcgac
2941	ctgcccatga	ggagggggga	gtacctggtg	gaggtgcggg	cacacagcga	gggtggagac
3001	ggggccgtcg	cacaagtgcg	catcacaggt	tcggctccgg	ctccggctct	ggcctcggct
3061	ctgctgctgc	tgccacttct	ctggactctg	atgctctga		

Expressionsvektoren

L1.1Myc

Der Expressionsvektor kodiert für das vollständige L1.1 Gen, das an das 5'-Ende des Myc-Epitops kloniert wurde. Es liegt ein offener Leserahmen vor, aus dem eine mRNA von 4,4 kb transkribiert wird. Das synthetisierte Protein ist ein Fusionsprotein aus L1.1 und dem Cterminal kovalent gebundenem Myc-Epitop.

Die Stopp-Codon des L1.1 Gens wurde durch eine *EcoR* I-Schnittstelle ersetzt. Die modifizerte Sequenz wurde durch *Sal* I- und *EcoR* I- Verdau isoliert und *blunt end* an die *BamH* I-Schnittstelle von pCS2-MT ligiert. Der gesamte Vektor hat eine Länge von 8,7 kbp.



L1.2Myc

Der offene Leserahmen des L1.2Myc-Konstrukts hat eine Länge von 4,4 kbp. Das Myc-Epitop ist im daraus kodierten Fusionsprotein C-terminal kovalent gebunden. Um das Protein aus einen einzigen offenen Leserahmen zu translatieren wurde das Stopp-Codon des L1.2 Gens durch eine *Kpn* I-Schnittstelle ersetzt. Die Klonierung in pCS2-MT erfolgte über *Spe* I und *Kpn* I durch *blunt end*-Ligation an die *BamH* I-Schnittstelle von pCS2-MT. Der gesamte Vektor hat eine Länge von 8,7 kbp.



L1.1EGFP

Das EGFP-Epitop wurde C-Terminal an das L1.1 Gen kloniert. Daraus entsteht ein offener Leserahmen von 4,8 kbp. Die Klonierung in pCS2-MT erfolgte durch *blunt end*-Ligation über *EcoR* I und *Not* I an die *BamH* I-Schnittstelle des Expressionsvektors. Die Transkription endet am Stopp-Codon der EGFP-Sequenz. Der gesamte Vektor hat eine Länge von 9,1 kbp.



F3Myc

Das Konstrukt enthält das vollständige F3 Gen, das für ein Fusionsprotein aus F3 und Nterminal kovalent gebundenem Myc-Epitop kodiert. Unmittelbar vor dem Start-Codon wurde eine Kozak-Sequenz eingefügt. Die Ligation in pCS2-MT erfolgte über *Eco*R I (*blunt*) und *Xba* I.Der offene Leserahmen hat eine Länge von 3,4 kbp. Der gesamte Expressionsvektor enthält 7,7 kb.



Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. M. Schachner am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg und Herrn Prof. Dr. L. Renwrantz am Zoologischen Institut der Universität Hamburg für die Begutachtung meiner Dissertation.

Frau Prof. Dr. M. Schachner danke ich für die Überlassung des Themas und die hervorragenden Bedingungen, die ich in Ihrem Institut vorgefunden habe. Ich bedanke mich für die vielfältigen Möglichkeiten zur Weiterbildung und ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. C.G. Becker und Herrn Dr. T. Becker für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihre wertvollen Anregungen bedanken, die einen großen Beitrag für den erfolgreichen Abschluss meines Projekts geleistet haben.

Mein Dank gilt auch meinen Laborkollegen Bettina Lieberoth, Julia Feldner und Jörn Schweitzer für ihre wertvollen Anregungen und der erfolgreichen Zusammenarbeit.

Herrn Dr. R.R. Bernhardt danke ich für die gründliche Einarbeitung in morphologische Arbeitsmethoden und für seine Unterstützung.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern. Ihnen gilt mein besonderer Dank für ihre ständige Unterstützung und ihre unermessliche Geduld.

Lebenslauf

Persönliche Daten					
Name	Dimitrios Gimnopoulos				
Geburtsdatum	28.06.1970				
Geburtsort	Hamburg				
Familienstand	ledig				
Ausbildung					
1976-1980	Grundschule Arnkielstraße, Hamburg				
1980-1982	Beobachtungsstufe Heinrich-Heine-Gymnasium, Hamburg				
1982-1989	Heinrich-Heine-Gymnasium, Hamburg				
03.1991-09.1991	Wehrdienst, Griechenland				
Akademischer Werdegang	5				
10.1991-10.1996	Biologiestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main				
10.1996-06.1997	Diplomarbeit am mikrobiologischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main <i>Thema</i> : Untersuchungen zur Mu-Transposition in den gemeinsamen Genmodul der Prophagen ψ und y von <i>Serratia</i> <i>marcescens</i> HY				
02.1999-10.2002-09-23	Promotion am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen im Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg				
Abschlüsse					
06.1989	Allgemeine Hochschulreife				
09.1993	Diplomvorprüfung am Fachbereich Biologie Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main				
05.1996	Diplomprüfung am Fachbereich Biologie Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main Note "sehr gut"				
06.1997	Abgabe der Diplomarbeit, Note "sehr gut"				