



Universität Hamburg

**Funktionelle Charakterisierung des Lewis^x-Glykans
auf dem Zelladhäsionsmolekül CD24
im Nervensystem der Maus
(*Mus musculus* Linné, 1758)**

Dissertation

von

Annika Lieberoth

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.
am Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Hamburg, September 2008



Universität Hamburg

**Funktionelle Charakterisierung des Lewis^x-Glykans
auf dem Zelladhäsionsmolekül CD24
im Nervensystem der Maus
(*Mus musculus* Linné, 1758)**

Dissertation

von

Annika Lieberoth

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.
am Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg**

Diese Arbeit wurde am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen
des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Melitta Schachner
Prof. Dr. Konrad Wiese

Betreuer: Dr. habil. Ralf Kleene

Hamburg, September 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. M. SCHACHNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 07. November 2008

Hamburg, den 24. Oktober 2008



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	2
2.1	Glykane und Glykosylierung	2
2.1.1	Biosynthese von Glykanen und Glykoproteinen	3
2.1.2	N- und O-Glykosylierung	3
2.1.3	Allgemeine Funktionen von Glykanen	4
2.1.4	Die Rolle von Glykosylierungen im Nervensystem	6
2.2	Das Lewis ^x -Glykan	7
2.3	Lewis ^x -ähnliche Glykomimetika in Forschung und Therapie	9
2.4	Das glykosylierte Zelladhäsionsmolekül CD24	11
2.4.1	Expression und Struktur von CD24	11
2.4.2	CD24-Gene und CD24-defiziente Mäuse	12
2.4.3	Funktionen und Bindungspartner von CD24	13
2.4.4	Die Rolle von CD24 im Neuritenwachstum	15
2.5	Neurale Zelladhäsionsmoleküle	16
2.5.1	L1	17
2.5.2	TAG-1 und F3	21
2.5.3	Caspr und Caspr2	22
2.5.4	Heterophile Interaktionen zwischen neuronalen Zelladhäsionsmolekülen	23
3	Zielsetzung der Arbeit	26
4	Material	27
4.1	Lösungen und Puffer	27
4.2	Chemikalien, Medien und sonstiges Material	33
4.3	Antikörper	35
4.3.1	Primäre Antikörper	35
4.3.2	Kontrollantikörper	36
4.3.3	Sekundäre Antikörper	36
4.4	Enzyme	37
4.5	Mäuse	37
4.6	Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	38
4.7	Geräte und Ausstattung	39
5	Methoden	43
5.1	Biochemische Methoden	43
5.1.1	SDS-PAGE	43
5.1.1.1	Silberfärbung	43
5.1.1.2	Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen	44
5.1.1.3	<i>Stripping</i>	44

5.1.2	Abschätzung von Proteinkonzentrationen	44
5.1.3	Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers 79	45
5.1.4	Aufreinigung von CD24 aus Maushirn	46
5.1.5	Immunaффinitätschromatographie	47
5.1.5.1	Kopplung der Antikörper an Sepharosematrix	47
5.1.5.2	Chromatographie	47
5.1.6	Anionenaustauschchromatographie	48
5.1.7	Gelelution	49
5.1.8	Tryptischer Verdau	49
5.1.9	N-Deglykosylierung	50
5.1.10	Phospholipase C-Verdau	50
5.1.11	Immunpräzipitation	50
5.1.12	<i>Pulldown</i>	51
5.1.13	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	52
5.1.13.1	CD24-ELISA	52
5.1.13.2	Lewis ^x -ELISA	52
5.1.14	<i>High Throughput Screening</i> einer Bibliothek von organischen Substanzen	53
5.2	Zellkultur	54
5.2.1	Primärzellkultur	54
5.2.1.1	Beschichtung von Deckgläsern	54
5.2.1.2	Einzelzellkultur von Kleinhirnneuronen	54
5.2.1.3	Einzelzellkultur von Hinterwurzelganglienneuronen	55
5.2.1.4	Einzelzellkultur von Motoneuronen	55
5.2.1.5	Einzelzellkultur von Hippocampusneuronen	56
5.2.1.6	Neuritenwachstumsexperimente	56
5.2.1.7	Immunzytochemie	57
5.2.2	Präparation und Kultivierung von Makrophagen	58
5.2.3	Kultivierung von Hybridomazellen	59
5.3	Sonstige Methoden	59
5.3.1	Genotypisierung von Mäusen	59
5.3.1.1	Proteinaseverdau von Schwanzbiopsien	60
5.3.1.2	Genotypisierungs-PCR für Axonin-Mäuse	60
5.3.1.3	Genotypisierungs-PCR für Caspr-Mäuse	60
5.3.1.4	Genotypisierungs-PCR für CD24-Mäuse	61
5.3.1.5	Genotypisierungs-PCR für Contactin-Mäuse	62
5.3.1.6	Agarosegel-Elektrophorese	62
5.3.2	Verhaltensexperimente mit Mäusen	63
5.3.2.1	<i>Open field</i> -Test	63
5.3.2.2	<i>Pole</i> -Test	63
5.3.2.3	<i>Beam walking</i> -Test	63
5.3.2.4	<i>Rotarod</i> -Test	64
5.3.2.5	<i>Fear conditioning</i> -Test	64
6	Ergebnisse	65
6.1	Optimierung der Aufreinigung von CD24 aus Maushirn	65
6.2	Trennung der CD24-Glykoformen	68
6.3	CD24-vermitteltes Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen	73

6.4	Identifikation von TAG-1 und F3 als funktionelle Rezeptoren für CD24	73
6.4.1	Funktionelle Relevanz von TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum	73
6.4.2	Assoziation von TAG-1 und F3 mit CD24 im Kleinhirn	78
6.4.3	Bindung von TAG-1 und F3 an CD24	79
6.4.4	Bindung von CD24 an TAG-1/L1- und F3/L1-Komplexe auf Hinterwurzelganglienneuronen in Kultur	80
6.4.5	Synergistische Wirkung von TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen	81
6.4.6	Lewis ^x -Abhängigkeit des TAG-1- und F3-vermittelten Neuritenwachstums von Hinterwurzelganglienneuronen auf CD24	83
6.4.7	Caspr bzw. Caspr2 als mögliche Korezeptoren von F3 bzw. TAG-1 bei CD24-vermitteltem Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen	84
6.4.8	Caspr- und Caspr2-Unabhängigkeit des CD24-vermittelten Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen	89
6.5	Effekt von CD24 auf das Neuritenwachstum verschiedener Neuronen	90
6.6	Verhalten von CD24-defizienten Mäusen	93
6.7	Lewis ^x -mimikrierende organische Substanzen	99
6.7.1	<i>High Throughput Screening</i> einer Bibliothek von organischen Substanzen	100
6.7.2	Validierung der Ergebnisse des Screenings	103
6.7.3	Untersuchung des Lewis ^x -mimikrierenden Effekts der organischen Substanzen auf Neuritenwachstum	107
6.7.4	Untersuchung der organischen Substanzen auf Dimerisierung	107
7	Diskussion	110
8	Zusammenfassung	117
9	Summary	118
	Literaturverzeichnis	119
	Abbildungsverzeichnis	132
	Abkürzungsverzeichnis	135
	Veröffentlichungen	140
	Danksagung	141

1 Einleitung

Seit etwa 50 Jahren wird das Genom mit großem Interesse der Wissenschaft erforscht. Etwas jünger ist die Proteomforschung, die sich der Untersuchung der entsprechend des genetischen Codes hergestellten Proteine widmet. Erst seit etwa 2 Jahrzehnten wird nun auch die Wichtigkeit von Glykanen, d. h. von Kohlenhydratketten auf vielen Proteinen und Lipiden, erkannt. Die Untersuchung des Glykoms, also der Gesamtheit der Glykane eines Organismus, entwickelt sich zu einem sehr wichtigen Forschungsgebiet.

Die Oberfläche jeder Zelle ist mit einer Vielzahl von Glykanen besetzt. Da die Glykane für gewöhnlich am weitesten aus der Oberfläche hervorragen, sind sie die Initiatoren der meisten Prozesse, die auf Adhäsion beruhen. Sie bilden damit die Grundlage für festere Kontakte, die durch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt werden. Glykane sind ein interessantes Forschungsfeld, weil sie von der Embryogenese bis zur Pathogenese an sehr vielen biologischen Prozessen beteiligt sind.

Glykosylierungen spielen deshalb nicht nur für die Stabilität und Struktur von Proteinen eine wichtige Rolle, sondern auch in der Vermittlung von Immunität, Proteininteraktionen, der Regulation von Enzymaktivitäten sowie bei Entzündungsreaktionen, Allergien, Asthma und einer Vielzahl von Infektionen und Krebserkrankungen. Auch für die Entwicklung des Nervensystems sind Glykane essenziell. Dort üben sie Funktionen aus, die von Zellerkennung und Adhäsion abhängig sind, wie z. B. Zellmigration, Neuritenwachstum, Axonbündelung, Synapsenbildung sowie synaptische Plastizität und damit Prozesse wie Lernen und Gedächtnis.

Das glykosylierte Zelladhäsionsmolekül CD24 ist ein außerordentlich interessantes Protein, da sein Peptidrückgrat nur einen geringen Anteil an der Gesamtmasse stellt, während ein Großteil von Glykanen gebildet wird. Da zudem zwischen Spezies nur geringe Ähnlichkeiten im Peptidanteil auftreten, wird vermutet, dass CD24 viele, wenn nicht sogar alle Funktionen durch seine Glykane vermittelt. CD24 ist an vielen Prozessen wie der Bildung von Blutzellen, der Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes in der Lymphozyten-Zellzahl, der Metastasierung vieler Tumorarten, bei Demyelinisierungskrankheiten wie der Multiplen Sklerose sowie bei der Entwicklung des Nervensystems beteiligt.

Für ein besseres Verständnis der Prozesse, die für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Nervensystems verantwortlich sind, ist es erforderlich, die Glykosylierung von Proteinen sowie deren zuckerabhängige funktionelle Interaktionen mit Liganden und Rezeptoren näher zu untersuchen. Aufgrund seiner Eigenschaften stellt CD24 ein ideales Molekül für die beispielhafte Untersuchung der Rolle von Glykanen an solchen biologischen Prozessen dar.

2 Grundlagen

2.1 Glykane und Glykosylierung

Die vier Säulen, auf die sich die Biosynthese von Zellen stützt, sind Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Glykane. Das menschliche Proteom, also die Gesamtheit der exprimierten proteinkodierenden Gene des Genoms, beinhaltet etwa 30000 Proteine. Diese Zahl ist erstaunlich gering, vergleicht man sie mit der Zahl von beispielsweise 20000 Genen, die der Wurm *Caenorhabditis elegans* besitzt [Wopereis *et al.*, 2006]. Die Komplexität von Proteinen bei Säugetieren beruht auf prätranslationalen Modifikationen wie z. B. alternativem Spleißen und posttranslationalen Variationen (z. B. Phosphorylierung und Glykosylierung). Bis vor wenigen Jahren wurde den Glykanen, d. h. Kohlenhydratketten auf vielen Proteinen und Lipiden, nur wenig Aufmerksamkeit in der Wissenschaft geschenkt, da sie so vielfältig und deshalb viel schwieriger zu untersuchen sind als beispielsweise Proteine, die direkt von Genen kodiert werden [Oppenheimer *et al.*, 2008]. Bis in die 1980er herrschte sogar die Meinung vor, dass die Glykosylierung nur sekretierte Proteine betreffe [Varki, 2006]. Doch seit einiger Zeit wächst das Interesse an den Zuckern und deren Funktionen, da immer deutlicher wird, dass sie an sehr vielen biologischen Prozessen beteiligt sind. Das überrascht nicht, da die Oberfläche des kompletten zellulären Netzwerkes, von bakteriellen und viralen Pathogenen sowie die meisten Proteine und Lipide mit einer Vielfalt von Glykanen besetzt sind [Alavi und Axford, 2008].

Die Glykosylierung ist die komplexeste Form der posttranslationalen Modifikationen. Die Biosynthese von Glykanen ist nicht matrizenabhängig, sondern wird durch viele fließbandartig aufeinanderfolgende Schritte vermittelt, die von hunderten Enzymen durchgeführt werden: den Glykosyltransferasen und Glykosidasen. Etwa 1%, und damit ungewöhnlich viele der menschlichen Gene, kodieren für diese Enzyme. Das Zusammenspiel dieser Glykoenzyme erlaubt das Erstellen eines exakten reproduzierbaren Glykanprofils (Glykom). Da die Glykosyltransferasen wiederum zell-, gewebe- und entwicklungsspezifisch exprimiert und reguliert werden, ergibt sich eine Vielfalt von Glykanprofilen in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand. Da Glykane mehrfach verzweigt und vielfältig verknüpft sind, können sie pro Masse deutlich mehr Information tragen, als lineare Proteine oder Nukleinsäuren. Dadurch erhöhen sie nicht nur die Diversität von Proteinen, z. B. durch die Bildung verschiedener Glykoformen, sondern haben auch eine enorme Kapazität zur Informationsübertragung [Alavi und Axford, 2008]. Dass es eine solche Vielfalt an komplexen Glykanen gibt, liegt wahrscheinlich daran, dass die meisten Pathogene über Zucker an ihre Wirte binden. Als Versuch, den Infektionen durch Pathogene zu entgehen, müssen die Wirte ihre Glykosylierung im Laufe der Evolution häufig ändern, da die Pathogene ihr Glykanexpressionsmuster meist schneller variieren können. Auf diese Weise könnten die vielen strukturellen Varianten von Glykanen in der Natur zustande kommen [Varki, 2006].

Da Glykane meistens am weitesten aus der Oberfläche von Zellen oder Proteinen hervorragen, sind sie an beinahe allen immunologischen und zellulären Kommunikationsprozessen, Entzündungsreaktionen, an Proliferation, Adhäsion, Apoptose, sowie Onkogenese und Metastasierung beteiligt [Alavi und Axford, 2008, Oppenheimer *et al.*, 2008]. Ihre Rolle üben sie meist durch Interaktion mit speziellen Kohlenhydratrezeptoren aus. Zu diesen Rezeptoren zählen verschiedene Proteine, wie beispielsweise Lektine, Adhäsionsmoleküle und Glykanantikörper. Die Bindung zwischen Zuckern und

deren Rezeptoren verursacht ein Netzwerk aus Interaktionen, das molekulare und zelluläre Funktionen koordiniert [Alavi und Axford, 2008].

In Säugetieren gibt es neun verschiedene Monosaccharide, die durch glykosidische Bindungen verknüpft sind und alle Glykane aufbauen: Glukose (Glc), Galaktose (Gal), N-Acetylglukosamin (GlcNAc), Fukose (Fuc), Sialinsäure (Neuraminsäure, NeuAc), Mannose (Man), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Glukuronsäure (GlcA) und Xylose (Xyl). Es gibt zwei verschiedene Arten von Glykosylierungen, die sich in der Art der Verknüpfung mit dem Proteinrückgrat unterscheiden: N- und O-Glykane (siehe 2.1.2). Proteine, die an ihrer Peptidkette verschiedene N- oder O-glykosidisch verknüpfte Zucker tragen, werden Glykoproteine genannt. Proteoglykane sind Proteine, die Glykosaminoglykane (GAGs) enthalten. Diese langen, unverzweigten Polysaccharidketten bestehen aus Disaccharid-Wiederholungen von N-Acetylgalaktosamin oder N-Acetylglukosamin kombiniert mit Glukuronsäure oder Galaktose. Schließlich gibt es noch sogenannte Mucine, die reich an O-Glykanen sind, da sie einen hohen Anteil an Serin und Threonin besitzen [Kleene und Schachner, 2004].

2.1.1 Biosynthese von Glykanen und Glykoproteinen

Glykane bestehen aus Monosacchariden, die mit der Nahrung aufgenommen und verstoffwechselt werden. So können durch Phosphorylierung, Epimerisierung und Acetylierung alle benötigten Saccharide als energiereiche Nukleotidzucker synthetisiert werden. Diese Biosynthese findet meist im Zytosol statt. Zur Glykosylierung müssen die so gebildeten Nukleotidzucker vom Zytosol ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) bzw. des Golgi gelangen. Da Nukleotidzucker die Doppelmembranen dieser Organelle nicht passieren können, existierten spezielle Transportmechanismen: einerseits können Nukleotidzucker an einen Lipidträger binden und anschließend mittels einer hypothetischen „Flippase“ durch die Membran ins ER gelangen. Andererseits gibt es spezifische Nukleotidzuckertransporter, die als Antiporter Nukleotidzucker ins Lumen und stattdessen Nucleosidmonophosphat aus dem Lumen in das Zytoplasma transportieren. Dadurch dass die Transporter den Glykananteil des zu transportierenden Nukleotidzuckers erkennen, transportieren sie nur die im entsprechenden Organell benötigten Moleküle [Wopereis *et al.*, 2006].

Nach dem Eintritt ins Lumen von ER oder Golgi werden die Nukleotideile von den Nukleotidzuckern durch Glykosyltransferasen abgespalten und die Monosaccharide auf Glykane übertragen. Die Aktivität von Glykosyltransferasen wird zum Teil durch Kationen, Chaperone und die Struktur des Proteinsubstrates bestimmt [Wopereis *et al.*, 2006].

Nach der Translation im ER und der ersten Beladung der Proteine mit Glykanen werden die Glykoproteine anschließend zum Golgi transportiert. Dabei dienen Exportsignale zur Steuerung des Transports. Im Golgi sind Glykosyltransferasen wahrscheinlich wie am Fließband angeordnet, d. h. zu Beginn aktive Transferasen sind im *cis*-Golgi zu finden, dann folgen Transferasen in der Mitte und die Transferasen, die die letzten Glykane anhängen, sitzen im *trans*-Golgi [Wopereis *et al.*, 2006].

2.1.2 N- und O-Glykosylierung

Je nachdem, wie Glykane mit dem Proteinrückgrat verknüpft sind, unterscheidet man zwei Arten von Glykosylierungen: die N- und die O-Glykane.

N-Glykane resultieren aus der Übertragung eines Oligosaccharidvorläufers vom Donormolekül Dolichol auf Asparagin im Protein. Das Asparagin muss sich dafür innerhalb einer Konsensussequenz für N-Glykosylierungen (Asparagin-X-Serin/Threonin) befinden, wobei X für eine beliebige Aminosäure außer Prolin steht. Dieser Transfer findet im ER statt. Während das glykosylierte Protein anschließend durch das ER und den Golgi-Apparat transportiert wird, werden vom Oligosaccharidkern einzelne Monosaccharide abgespalten oder angefügt. So entstehen verschiedene Typen von

N-Glykanen: Oligomannosidische Glykane, die terminal noch unsubstituierte Mannosereste tragen, hybride Glykane mit teilweise unsubstituierten, teilweise aber bereits durch N-Acetylglukosamin substituierten Enden und komplexe Glykane. Letztere tragen weitere N-Acetylglukosamin-, Fukose-, Galaktose- und Sialinsäurereste. Alle diese Glykane können unterschiedlich verknüpft sein, so dass verschiedene Antennenstrukturen entstehen können. N-Glykane des Nervensystems enthalten häufig doppelt verzweigte Antennen aus N-Acetylglukosamin oder Fukoseresten. Allen N-Glykanen ist jedoch eine Kernstruktur aus zwei N-Acetylglukosamin- und drei Mannoseresten gemeinsam [Kleene und Schachner, 2004, Lowe und Marth, 2003].

O-Glykane bestehen meistens aus weniger Monosacchariden als N-Glykane. O-glykosidisch verknüpfte Zucker sind mit Serin oder Threonin des Proteins verknüpft, ihre Synthese verläuft allerdings anders als bei den N-Glykanen. Im ER oder Golgi werden die Monosaccharide von O-Glykanen nacheinander durch spezifische Glykosyltransferasen an das Peptid angefügt, so dass es hierbei keine gemeinsame Kernstruktur gibt. O-Glykane können über Fukose, Mannose oder N-Acetylgalaktosamin mit den Aminosäuren verknüpft sein. Nach diesen Sacchariden können durch weitere Glykosyltransferasen N-Acetylglukosamin, Galaktose, Sialinsäure und Fukose angefügt werden. Auch hier entstehen durch verschiedene Verknüpfungen viele unterschiedliche Epitope [Wopereis *et al.*, 2006, Kleene und Schachner, 2004, Lowe und Marth, 2003].

2.1.3 Allgemeine Funktionen von Glykanen

Die Funktionen von Glykanen reichen von der Regulation der Proteinexpression und deren Prozessierung, der Beeinflussung der Proteinstruktur und deren Stabilität, über die Vermittlung von Immunität, rezeptorvermittelter Signaltransduktion, Proteininteraktionen, Enzymaktivitäten, Zellerkennung, bis hin zu Entzündungsreaktionen, Infektionen, neuropathologischen Erkrankungen (wie z. B. die Creutzfeld-Jakob Krankheit), Asthma, Arteriosklerose, Onkogenese und Metastasierung [Alavi und Axford, 2008, Wopereis *et al.*, 2006].

Die Struktur von Proteinen kann durch Glykosylierung stark beeinflusst werden, da Glykane beispielsweise α -Helices brechen und damit die Sekundärstruktur verändern. Auch auf die Tertiär- und Quartärstruktur können sie Einfluss haben, da manche filamentöse Proteine durch Glykosylierung kugelförmig werden bzw. Oligomere aus mehreren Proteinen sich erst mit Hilfe bestimmter Glykane bilden. Dadurch beeinflussen Glykane die Stabilität, Hitzeresistenz, Hydrophilität und Resistenz der Proteine gegenüber Proteasen. Stark sialylierte Proteine wie viele Mucine auf Oberflächen des Verdauungs- und Genitaltraktes sowie im respiratorischen System und Proteoglykane mit zahlreichen Glykosaminoglykanketten sind durch ihre negative Ladung zudem für die Bindung großer Mengen Wasser verantwortlich. Die sich auf diese Weise bildende Sekretschicht reduziert Reibungskräfte und bildet eine schützende Fläche, die oftmals antibakterielle Eigenschaften aufweist. Ein Beispiel hierfür ist die Nasenschleimhaut [Wopereis *et al.*, 2006].

Es gibt weiterhin viele Hinweise darauf, dass Glykane auch in die Reproduktionsbiologie involviert sind. Keimzellen sind beispielsweise dicht mit Glykanen beschichtet. Zucker sind zudem an der Wanderung von Spermien, bei der Reifung von Spermien, bei der Anheftung von Spermien an Zelloberflächen sowie bei der Befruchtung und Einnistung des Embryo beteiligt [Varki, 2006].

Die zuckerabhängige Erkennung zwischen Proteinen und die darauffolgende Signaltransduktion beinhaltet eine Beteiligung von Lektinen, d. h. zuckerbindenden Proteinen. Zu den Lektinen gehören beispielsweise die Adhäsionsmoleküle der Selektin- und Galektinfamilien, die im Blutgefäßsystem Kohlenhydrat epitope binden und zelluläre Signaltransduktionen hervorrufen. Damit werden Prozesse wie Zellwachstum, Apoptose, Endozytose, Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen gesteuert [Wopereis *et al.*, 2006]. Auch Integrine und Cadherine spielen dabei eine Rolle. Bei Zelladhäsionen führt die Aktivierung von Integrinen beispielsweise zur Phosphorylierung von FAK (*Focal*

Adhesion Kinase), die wiederum Genexpression, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose reguliert. E-Cadherin ist an Zell-Zell-Kontakten von Epithelzellen beteiligt, N-Cadherin dagegen vorwiegend im Nervensystem und in Fibroblasten. Alle diese Adhäsionsmoleküle beeinflussen zuckerabhängige Prozesse, die gewebe- und entwicklungsspezifisch reguliert werden und damit wichtig für die Embryogenese und das Wachstum, aber auch Metastasierungen sind [Zhao *et al.*, 2008].

Eine Vielzahl von Pathogenen vermittelt den Beginn einer Infektion durch die zuckerabhängige Bindung an die Zelloberfläche von Wirtszellen. Häufig sind daran Sialinsäurereste beteiligt. Beispiele sind hierbei Infektionen durch das Influenzavirus in der Lunge, die Invasion des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum* in Erythrozyten, die Infektion des Magens oder des Darms durch *Helicobacter pylori* sowie Durchfallerkrankungen, die durch das Toxin von *Vibrio cholerae* verursacht werden [Varki, 2006].

Die Wichtigkeit von Glykanen wird außerdem dadurch unterstrichen, dass es diverse Krankheiten gibt, die auf Defekten in der Biosynthese von Glykanen oder Glykoproteinen beruhen. Die angeborenen Funktionsstörungen von Glykosylierungen (*Congenital Disorders of Glycosylation*, CDG) sind multisystemische Erkrankungen, die meist auf Fehlern in der Zusammensetzung oder Prozessierung von Glykanen beruhen. Die Entwicklung im Säuglingsalter ist dadurch meist eingeschränkt und führt zu Schwächung und verzögerter neuromotorischer Entwicklung. In der Kindheit kommen meist schlaganfallähnliche Episoden, Epilepsie, Aufmerksamkeitsdefizite, zeitweise Erblindung sowie halbseitige Lähmungen hinzu. Später verlieren Patienten häufig ganz die Fähigkeiten zu Laufen und Sprechen [Leroy, 2006]. Erbkrankheiten wie die angeborene Muskeldystrophie, das Wiskott-Aldrich Syndrom (Insuffizienzen in Blutgerinnung und Immunität) und Sialuria (Erkrankung des Sialinsäurestoffwechsels) sind weitere Beispiele. Hinzu kommen erworbene Krankheiten wie rheumatische Autoimmunerkrankungen, die Creutzfeldt-Jacob Krankheit sowie Allergien, die alle durch fehlerhafte Glykosylierungen zustande kommen [Alavi und Axford, 2008].

Glykoproteine von Tumorzellen unterscheiden sich häufig sowohl in ihrer Struktur als auch in der vorhandenen Menge von Glykoproteinen gesunder Zellen. Tumorzellen exprimieren verstärkt einige O-Glykan tragende Mucine, wie z. B. MUC1, sowie diverse Kohlenhydratepitope. Tumorassoziierte O-Glykane sind häufig stark sialyliert und weniger sulphatiert, sie sind oft verkürzt und enthalten üblicherweise Tn- (GalNAc), T- (Gal β 1,3GalNAc) und Lewis-Antigene (siehe 2.2) sowie deren sialylierte Formen. Durch Unterschiede in der Glykosylierung von Proteinen auf Krebszellen verändern sich Interaktionen mit deren Liganden und führen so zu abnormem Wachstum sowie Überleben von Tumorzellen und damit auch zu Metastasierung [Brockhausen, 2006].

Einige kohlenhydratbasierte Therapeutika gegen diverse Krankheiten sind bereits im Einsatz: Tamiflu beispielsweise ist ein Arzneimittel auf der Basis eines Monosaccharids und wird zur Behandlung der Grippe eingesetzt, indem es die Neuraminidase des Influenzavirus inhibiert. Heparin ist eine Mischung aus verschiedenen Polysacchariden und wird seit Jahrzehnten als blutgerinnendes Mittel verwendet. Bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 findet Acarbose, ein Glykosidaseinhibitor, Verwendung. Diverse bereits eingesetzte Impfstoffe, beispielsweise gegen *Salmonella typhi* (Typhus), *Streptococcus pneumoniae* (Lungenentzündung), *Neisseria meningitidis* (bakterielle Hirnhautentzündung) und *Haemophilus influenza* (Typ b Grippe), basieren ebenfalls auf Kohlenhydraten. Weitere glykanbasierte Impfstoffe gegen *Bacillus anthracis* (Anthrax), *Plasmodium falciparum* (Malaria) und *Leishmania* (Leishmaniose) werden derzeit entwickelt [Oppenheimer *et al.*, 2008].

2.1.4 Die Rolle von Glykosylierungen im Nervensystem

Mittlerweile konnten einige Studien belegen, dass Glykane wichtige Aufgaben während der Entwicklung des Nervensystems spielen. Bei Prozessen, die auf Zellerkennung beruhen, wie z. B. Zellmigration, Axonbündelung, Neuritenwachstum und der Bildung von Synapsen, sind zuckerabhängige Interaktionen beteiligt [Kleene und Schachner, 2004, Köttgen *et al.*, 2003, Jessell *et al.*, 1990].

Bei den bereits unter 2.1.3 beschriebenen angeborenen Funktionsstörungen von Glykosylierungen (CDG) lassen sich viele der Symptome auf Entwicklungsstörungen des Nervensystems zurückführen. Die neuromotorischen Defizite, Epilepsien und Ataxien hängen mit einer Minderentwicklung des Kleinhirns (Kleinhirnhypoplasie) zusammen. Außerdem sind eine verzögerte Myelinisierung, eine reduzierte Reizleitungsgeschwindigkeit, Läsionen in der weißen Substanz sowie in machen Fällen Mikrozephalie zu beobachten [Leroy, 2006, Marquardt und Denecke, 2003].

In der Alzheimerschen Krankheit spielen ebenfalls glykosylierte Proteine eine Rolle: in Gehirnen von Alzheimerpatienten lassen sich O-glykosylierte Proteine in den bei dieser Krankheit entstehenden Plaques nachweisen, die in Hirnen von gesunden Menschen weniger vorkommen [Espinosa *et al.*, 2001]. Beispielsweise konnte bereits ein 90 kD Glykoprotein im Nervensystem von Alzheimerpatienten gefunden werden, das in Plaques auftritt und an der Neurodegeneration beteiligt sein könnte [Espinosa *et al.*, 2003].

Wie bei der Alzheimerschen Krankheit ist auch die Creutzfeldt-Jacob Krankheit durch Neurodegeneration gekennzeichnet. Dabei treten Proteine auf, die eine veränderte Glykosylierung zeigen. Nicht nur beim Prionprotein (PrP) zeigen sich Unterschiede in der Glykosylierung zwischen der zellulären (PrP^c) und der pathologischen Form (PrP^{sc}). Auch andere Proteine, wie beispielsweise die Acetylcholinesterase, sind bei Creutzfeldt-Jacob-Patienten und gesunden Menschen unterschiedlich glykosyliert. Dies entspricht den Erkenntnissen, dass einige Glykosyltransferasen bei der Creutzfeldt-Jacob Krankheit dysreguliert sind [Silveyra *et al.*, 2006].

Polysialinsäure (PSA), ein Homopolymer aus bis zu 200 α 2,8-verknüpften Sialinsäuremolekülen, wurde bislang nur auf dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) gefunden und wird dort vorwiegend während der Embryogenese exprimiert. Durch die negative Ladung der PSA-Ketten hemmt es die homophile Interaktion von NCAM und beeinflusst dadurch Wachstum und Bündelung von Axonen [Rutishauser und Landmesser, 1996]. Da PSA auch die neue Bildung von Neuriten vermittelt, ist es nicht verwunderlich, dass seine Expression nach Läsionen verstärkt wird [Muller *et al.*, 1994]. Die Wanderung von Neuronen im rostralen migratorischen Strom von der subventrikulären Zone zum Riechkolben ist ebenfalls abhängig von PSA-NCAM [Hu, 2000]. Oligomannosidische Glykane scheinen zudem für eine *cis*-Interaktion zwischen NCAM und dem ebenfalls neuronalen Zelladhäsionsmolekül L1 verantwortlich zu sein, die funktionell für Neuritenwachstum wichtig ist [Heiland *et al.*, 1998].

Auch für die synaptische Plastizität, und damit für Prozesse wie Lernen und Gedächtnis, sind Glykane äußerst wichtig. Mäuse nach Training in Verhaltensversuchen zu räumlichem Erinnerungsvermögen zeigen beispielsweise eine erhöhte Expression von PSA-NCAM [Kempermann *et al.*, 2002]. Antikörper gegen das Glykan HNK-1 (*Human Natural Killer cell glykan-1*), die im Hippocampus appliziert werden, beeinträchtigen Lernprozesse bei Verhaltenstests mit Mäusen [Strekalova *et al.*, 2001]. Und auch oligomannosidische Glykane können Langzeitpotenzierung (*Long Term Potentiation*, LTP) im Hippocampus beeinträchtigen, weil sie vermutlich die Interaktion zwischen NCAM und L1 stören [Lüthi *et al.*, 1994].

Ein weiteres neuronales Adhäsionsmolekül, MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*), gehört der Gruppe der Siglecs (*Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins*) an, da es das erste Molekül ist, für das die Bindung an α 2,3-Sialinsäure gezeigt werden konnte. MAG ist in die Bildung und Aufrechterhaltung von Myelin involviert und bindet α 2,3-sialinsäureabhängig an Ganglioside. Mäuse, die defizient für die Glykosyltransferase sind, die α 2,3-Sialinsäure synthetisiert, zeigen eine veränderte

Expression von MAG, gestörte Myelinisierung und dadurch Neurodegeneration [Vyas und Schnaar, 2001].

Bemerkenswert ist auch die Entdeckung, dass HNK-1 in Mäusen von myelinisierenden Schwannzellen exprimiert wird, die mit Axonen von Motoneuronen assoziiert sind. Mit sensorischen Axonen assoziierte Schwannzellen hingegen weisen kein HNK-1 auf. Dadurch scheint HNK-1 wichtig für die richtige Wegfindung von Motoneuronen bei der Innervierung ihrer Ziele zu sein [Martini *et al.*, 1994]. Dies kann auch bei der funktionellen Genesung nach Verletzungen der peripheren Nerven beobachtet werden: kurze elektrische Stimulation der verletzten Nerven kann die Präzision der Innervierung von neugebildeten Axonen erhöhen und wird von einer verstärkten HNK-1-Expression begleitet [Eberhardt *et al.*, 2006]. Schließlich konnte der Einsatz von glykomimetischen Peptiden für HNK-1 eine fördernde Wirkung bei der Regeneration nach Femoralnervläsionen zeigen [Simova *et al.*, 2006].

Für die vorliegende Dissertation ist die Rolle von Glykanen im Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen (DRG-Neuronen) besonders wichtig. Das glykosylierte Zelladhäsionsmolekül CD24 (siehe auch 2.4) fördert bzw. hemmt das Neuritenwachstum in Abhängigkeit der beiden Glykane α 2,3-Sialinsäure und Lewis^x, die auf CD24 zu finden sind. Über neuronale Rezeptoren, wie beispielsweise L1 für α 2,3-Sialinsäure vermittelt CD24 die beschriebenen Effekte. Einen detaillierteren Überblick über diese Rolle von CD24 und seinen Glykanen gibt Abschnitt 2.4.4. Das Lewis^x-Glykan ist genauer in Abschnitt 2.2 beschrieben.

2.2 Das Lewis^x-Glykan

Das Lewis^x-Epitop ist ein Trisaccharid aus Fukose in α 1,3- und Galaktose in β 1,4-Verknüpfung zu N-Acetylglukosamin (Fuc α 1,3-Gal β 1,4-GlcNAc). Lewis^x kann sowohl auf O-Glykanen des Galactosamin- oder Mannosetyps als auch auf N-Glykanen vorkommen. Außerdem gibt es eine sialylierte Form von Lewis^x: sialyl-Lewis^x.

Positionsisomere von Lewis^x, wie beispielsweise Lewis^a (Fuc α 1,4-Gal β 1,3-GlcNAc), Lewis^y ((Fuc α 1,2-Gal β 1,4)-Fuc α 1,3-GlcNAc) oder Lewis^b ((Fuc α 1,2-Gal β 1,3)-Fuc α 1,4-GlcNAc), wurden bereits in den 1950ern in Milch entdeckt und als Blutgruppenderminanten identifiziert [Annison und Morgan, 1951]. In den folgenden zwanzig Jahren wurde auch Lewis^x auf Blutzellen, Tumorzellen und in Embryos identifiziert [Fox *et al.*, 1983, Hounsell *et al.*, 1981, Fox *et al.*, 1981, Solter und Knowles, 1978]. Alternative Bezeichnungen für Lewis^x sind daher auch CD15 oder SSEA-1 (*Stage-Specific Embryonic Antigen-1*). Gründe für letztere Bezeichnung sind die starke Expression von Lewis^x während der Präimplantationsphase der Embryogenese sowie in der Blastozyste und dass Lewis^x für die Kompaktierung der Morula verantwortlich ist [Hakomori, 2004, 1992, Fenderson *et al.*, 1984]. Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht der Lewis-Epitope.

Mittlerweile ist außerdem bekannt, dass Lewis^x auch im Nervensystem exprimiert wird. Diese Expression ist räumlich und zeitlich strikt reguliert: In der Maus ist Lewis^x ab dem embryonalen Tag 10 (E10) detektierbar und wird stark im embryonalen Rückenmark und Hirnstamm, dem auditorischen und motorischen Cortex, sowie im Telencephalon (Endhirn), Hippocampus und Kleinhirn exprimiert [Capela und Temple, 2006, Ashwell und Mai, 1997a,b,c,d]. Nach der Geburt wird die Expression verringert und ist in der adulten Maus nur noch auf Astrozyten und Zonen mit verlängerter Neurogenese beschränkt, wie Hippocampus, Kleinhirn, Neocortex, Striatum, Hypothalamus, basales Vorderhirn und Riechepithel [Capela und Temple, 2006, Bartsch und Mai, 1991]. Zudem wird Lewis^x als Marker für neurale Stammzellen verwendet, da es nur auf neuronalen Progenitorzellen (CNS-Stammzellen, Neuroblasten und Glioblasten), jedoch nicht auf ausdifferenzierten Zellen exprimiert wird [Capela und Temple, 2002]. Neuronale Stammzellen, die sowohl GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) als auch Lewis^x exprimieren, sind multipotent, während Lewis^x-negative Zellen kein neurogenes Potenzial besitzen [Imura *et al.*, 2006].

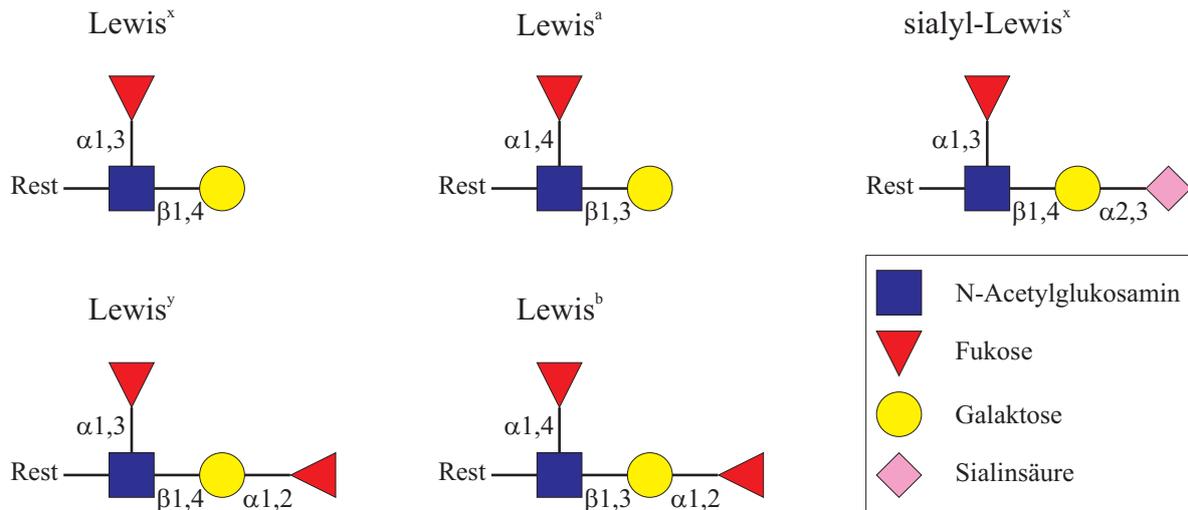


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Lewis-Epitope

Obwohl das Lewis^x-Epitop mittlerweile in vielen Strukturen und Zellen gefunden wurde, ist über seine Funktionen noch nicht viel bekannt. Ein wichtiger bekannter Bindungspartner von Lewis^x ist Lewis^x selbst. Während der Entwicklung des Nervensystems spielt Lewis^x eine Rolle bei Zellmigration, Zellerkennung, Axonwegfindung und Neuritenwachstum [Brito *et al.*, 2007, Sajdel-Sulkowska, 1998, Streit *et al.*, 1996, Gocht *et al.*, 1992] und zumindest für einen Teil dieser Funktionen ist diese homophile Interaktion wichtig. Lewis^x ist dabei auch an Interaktionen zwischen Gliazellen und Neuronen beteiligt [Sajdel-Sulkowska, 1998]. Im Endhirn bindet Lewis^x an Selektin und könnte durch diese Adhäsion vermitteln, dass sich Zelltypen während der Entwicklung nicht vermischen [Gotz *et al.*, 1996].

Auch für die Rolle von Lewis^x in der Kompaktierung von Embryos [Hakomori, 1992], in der Autoaggregation von Teratokarzinomzellen [Hakomori, 2004] sowie bei einigen Infektionen ist eine kalziumabhängige Lewis^x-Lewis^x-Interaktion wichtig. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass das Bakterium *Helicobacter pylori*, das unter anderem dafür bekannt ist, Gastritis und Darmkrebs auslösen zu können, Lewis^x auf seinen Lipopolysacchariden trägt und sich damit an Lewis^x auf Darmepithelzellen anheftet [Sheu *et al.*, 2007]. Zudem produziert *H. pylori* Lewis^x und Lewis^y, um die Kohlenhydrate der Epithelzellen zu mimikrieren und damit eine Immunantwort zu vermeiden bzw. zu verringern [Lin *et al.*, 2006]. Trotzdem ist bekannt, dass eine Infektion mit *H. pylori* auch zur Produktion von Autoimmunantikörpern führen kann, da Lewis^x sowohl vom Wirt als auch vom Bakterium exprimiert wird [Guruge *et al.*, 1998].

Auch im Fall von *Schistosoma mansoni* ist Lewis^x das hauptsächlich immunogene Element. Lewis^x kommt auf Schistosoma-Eiern, d. h. auf sogenannten SEAs (*S. mansoni Soluble Egg Antigens*) [van Die *et al.*, 2003] und einem sekretorischen Antigen von schistosomalen Eiern, IPSE/alpha-1 (*Interleukin-1 inducing Principle from Schistosome Eggs*), vor [Wuhrer *et al.*, 2006]. Zudem wird Lewis^x auf weiteren schistosomalen Proteinen, wie CCA (*gut-associated Circulating Cathodic Antigen*) sekretiert [Van Roon *et al.*, 2004]. Dadurch verursacht *S. mansoni* starke Immunantworten. Lewis^x wird hierbei u. a. von DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin*) gebunden [van Die *et al.*, 2003].

Ein weiteres Beispiel ist das humane Cytomegalievirus (HCMV), das bewirkt, dass die Expression von Lewis^x auf Wirtszellen erhöht wird und dadurch eine Immunantwort verursacht [Andrews *et al.*, 1989]. Das humane Immundefizienzvirus (HIV) trägt das Hüllprotein gp120, das wiederum durch seine Interaktion mit DC-SIGN für den viralen Transfer in T-Zellen verantwortlich ist. Auch diese

Interaktion scheint Lewis^x-abhängig zu sein, da Lewis^x aus humaner Milch einen inhibitorischen Effekt auf den DC-SIGN-vermittelten Transfer von HIV in Lymphozyten hat [Naarding *et al.*, 2006]. Außerdem konnte BSSL (*Bile Salt-Stimulated Lipase*) als die Lewis^x-tragende Komponente in humaner Milch identifiziert werden, die für die Bindung an DC-SIGN und damit am inhibitorischen Effekt auf den HIV-Transfer beteiligt ist [Naarding *et al.*, 2006]. Die Bindung von DC-SIGN an gp120, wie hier für HIV beschrieben, ist gut untersucht. Auch bei Hepatitis C, Ebola, HCMV, Dengue-Virus, *Mycobacterium*, *Leishmania*, *Candida albicans* und *H. pylori* spielt diese Interaktion eine Rolle während der Infektion. Allerdings ist nicht bekannt, ob Lewis^x in allen Fällen an der Bindung der beiden Proteine beteiligt und damit in alle diese Infektionen involviert ist [Naarding *et al.*, 2006].

SIGNR1 (*DC-SIGN Related molecule*) und SIGNR3 sind zwei murine Homologe von DC-SIGN, und auch für diese beiden C-Typ Lektine wurde bereits gezeigt, dass sie Lewis^x binden können [Powlesland *et al.*, 2006, Galustian *et al.*, 2004]. ICAM-3 (*Intercellular Adhesion Molecule-3*) ist hingegen ein Lewis^x-tragendes Glykoprotein, das den Kontakt zwischen Granulozyten und dendritischen Zellen durch Bindung an DC-SIGN über Lewis^x vermittelt [Bogoevska *et al.*, 2007]. Ein weiterer Lewis^x-Rezeptor ist SRCL (*Scavenger Receptor C-type Lectin*). Dieses Protein befindet sich im Epithel des Blutgefäßsystems, der Plazenta, der Leber und einigen anderen Organen. SRCL spielt eine Rolle bei der Immunität, indem es Bakterien und Pilze erkennt und bindet. Möglicherweise fischt SRCL selektiv Lewis^x-tragende Glykoproteine aus dem Blutkreislauf oder interagiert selektiv mit Zellen, die Lewis^x tragen und vermittelt auf diese Weise Immunreaktionen [Coombs *et al.*, 2005]. Lewis^x wird außerdem von vielen Tumorzellen exprimiert. Da Brustkrebszellen über Lewis^x an das Blutgefäßepithel binden, wäre SRCL ein möglicher Lewis^x-Rezeptor auch für diese Adhäsion [Elola *et al.*, 2007]. Außerdem wurde gezeigt, dass SRCL mit Lewis^x auf Tumorzellen und Leukozyten über eine primäre Galaktosebindungsstelle interagiert und damit einen bislang unbekanntem Mechanismus verwendet [Feinberg *et al.*, 2007].

Neben Lewis^x selbst und den oben genannten Selektinen und C-Typ Lektinen sind auch Wachstumsfaktoren dafür bekannt, dass sie Lewis^x-Bindungspartner darstellen. So sind beispielsweise die neuronalen Wachstumsfaktoren Wnt-1 und FGF2 in der Lage, an freies Lewis^x zu binden, das in die extrazelluläre Matrix freigesetzt wird [Capela und Temple, 2006]. Zudem ist Wnt-1, wie Lewis^x, an der Embryogenese und der Tumorgenese von Brustkrebs beteiligt, so dass es auch hier eine Verbindung zu Lewis^x geben könnte.

Die Biosynthese des Lewis^x-Epitops wird durch die α 1,3-Fukosyltransferase IX (Fut9) kontrolliert [Nishihara *et al.*, 2003], die wiederum durch den Transkriptionsfaktor Pax6 reguliert wird [Shimoda *et al.*, 2002]. Fut9-defiziente Mäuse zeigen keine offensichtliche physiologische Beeinträchtigung oder pathologische Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen. Trotz der Beteiligung von Lewis^x an der Embryogenese sind Fut9-defiziente Mäuse fertil und zeigen eine normale embryonale und Keimzellentwicklung [Kudo *et al.*, 2004]. Allerdings zeigen sie in Verhaltensstudien Eigenschaften, die mit erhöhter Angst assoziiert sind sowie immunhistochemisch eine reduzierte Anzahl von Calbindin-positiven Neuronen in der Amygdala. Daraus lässt sich ableiten, dass von Fut9 synthetisierte Glykane, wie beispielsweise Lewis^x, möglicherweise eine Rolle in der Regulation von Interneuronen in der Amygdala und dadurch im emotionalen Verhalten der Mäuse spielen [Kudo *et al.*, 2007].

2.3 Lewis^x-ähnliche Glykomimetika in Forschung und Therapie

Wie unter 2.2 beschrieben, spielt Lewis^x eine entscheidende Rolle in verschiedensten Infektionen, bei Entzündungsreaktionen und bei der Tumorgenese mehrerer Krebsarten. Aufgrund dieser Funktionen stellt Lewis^x einen guten Ansatzpunkt für therapeutische Zwecke dar.

In der klinischen Immuntherapie gegen bösartige hämatologische und solide Tumoren werden bereits α Lewis^x-Antikörper eingesetzt [Elola *et al.*, 2007]. Diese Antikörper lysieren Brustkrebszellen

und verringern die Adhäsion von Krebszellen an das Blutgefäßepithel, so dass sie Metastasierungen verringern und Tumorzellen beseitigen.

Aufgrund seiner Beteiligung an Entzündungsreaktionen und dem Vorkommen von Lewis^x auf vielen Glykoproteinen ist es außerdem denkbar, Lewis^x in der Entwicklung neuer Impfstoffe und bei der Bestimmung der Allergenität von Proteinen einzusetzen. Wird Lewis^x an Antigene gekoppelt, kann es eine Immunantwort beeinflussen, indem die Produktion von Interleukinen verringert wird [Hsu *et al.*, 2007]. Auch Wang *et al.* [2007] beschreiben einen möglichen Einsatz von Lewis^x in Impfstrategien, da es benutzt werden kann, um Ovalbumin über DC-SIGN an dendritische Zellen zu leiten und dadurch eine T-Zell-Antwort auszulösen.

Neurale Stammzellen, die Lewis^x-positiv sind und einen bestimmten Chemokinrezeptor tragen, haben therapeutisches Potenzial in Motoneuronkrankheiten wie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), da sie neuroprotektiv sind und Wachstumsfaktoren freisetzen können. Dadurch führen sie zu einem späteren Ausbruch und langsamere Fortschreiten von ALS [Corti *et al.*, 2007].

Da die Anheftung von *H. pylori* an Darmepithelzellen durch Lewis^x vermittelt wird [Sheu *et al.*, 2007], könnte dieses Glykan auch eingesetzt werden, um diese Adhäsion zu hemmen und damit den möglichen gastritischen Effekt von *H. pylori* zu reduzieren. Analog kann der Lewis^x-abhängige, DC-SIGN-vermittelte Transfer von HIV in T-Zellen durch Lewis^x inhibiert werden [Naarding *et al.*, 2006].

Für sialyl-Lewis^x werden bereits einige synthetische Analoga, d. h. mimikrierende Substanzen, in Tiermodellen auf ihre Fähigkeit getestet, die Auswirkungen von Herzinfarkten zu reduzieren und chronische Erkrankungen wie Asthma und Psoriasis zu lindern, indem selektinvermittelte Interaktionen von Neutrophilen mit Epithelzellen gehemmt werden [Kaneider *et al.*, 2006]. Beispielsweise werden die Analoga CY1503 gegen Verletzungen nach Ischämie, OC229648 gegen Bauchfellentzündung und Etomyrin gegen Psoriasis in präklinischen Studien getestet, während sich das Analog Bimosiamose gegen Asthma und Psoriasis bereits in Phase II der klinischen Studien befindet [Kaneider *et al.*, 2006].

Anstatt das Glykan direkt für den therapeutischen Einsatz zu verwenden, werden also häufig mimikrierende Substanzen eingesetzt. Glykomimetische Peptide, wie beispielsweise für HNK-1 bekannt, können so zur Anwendung kommen: HNK-1-Peptide haben eine fördernde Wirkung bei der Regeneration nach Femoralnervläsionen [Simova *et al.*, 2006]. Auch sialyl-Lewis^x-Analoga als Selektininhibitoren werden auf der Basis organischer Moleküle, die keine Kohlenhydrate darstellen, weiterentwickelt. Kaila *et al.* [2005] arbeiten daran, das Fukose-Epitop durch Chinasäure zu mimikrieren. Glykomimetika ohne Zuckeranteile sollen stabiler als Kohlenhydrate sein und sich dadurch besser für den therapeutischen Einsatz eignen.

Alle organischen Glykomimetika sollen die Zuckerepitope nachahmen, jedoch aufgrund veränderter Eigenschaften gut für therapeutische Zwecke geeignet sein. So sind sie meist kleiner als die originalen Epitope, dadurch stabiler und weniger immunogen. Außerdem besteht für kleinere Moleküle die Möglichkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, und dadurch auch im Nervensystem Einsatz zu finden. Da viele Glykane auch in der Forschung eine große Rolle spielen, können Glykomimetika hier ebenso eingesetzt werden.

Da es in Forschung oder Medizin für das Lewis^x-Epitop bislang keine organischen Mimetika gibt, wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation kleine organische Moleküle mit Lewis^x-mimikrierender Eigenschaft gesucht (siehe 6.7).

2.4 Das glykosylierte Zelladhäsionsmolekül CD24

2.4.1 Expression und Struktur von CD24

Das Zelladhäsionsmolekül CD24 wurde 1987 in blutbildenden Zellen entdeckt und aufgrund seiner Resistenz gegen Hitzedenaturierung zunächst *Heat Stable Antigen* (HSA) genannt [Springer *et al.*, 1978]. Da dieses Molekül zudem glykosyliert ist, wurde es auch als Nectradrin bezeichnet [Kadmon *et al.*, 1992]. Zunächst wurde CD24 intensiv während der Differenzierung von Blutzellen erforscht, da es auf unreifen B- und T-Zellen exprimiert wird und als Marker für diese Entwicklungsstufe verwendet werden kann [Nielsen *et al.*, 1997]. Außerdem wird es auf Granulozyten, Makrophagen, Erythrozyten und dendritischen Zellen exprimiert [Liu und Zheng, 2007, Kadmon *et al.*, 1992]. Im Lauf der Zeit stellte sich allerdings heraus, dass die Expression von CD24 nicht nur auf das Blutssystem beschränkt ist. Beispielsweise findet man es auch in Muskeln [Belvindrah *et al.*, 2002], Haarfollikeln, Epithelzellen, in der Haut, in Speicheldrüsen und in der Lunge [Nieoullon *et al.*, 2007]. In den vergangenen Jahren stellte sich CD24 zudem als Marker für verschiedenste Tumorarten heraus, wie z. B. Brustkrebs, kolorektales Karzinom, Prostatakrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Lungenkrebs [Baumann *et al.*, 2005]. Auch in Tumoren des Nervensystems, wie den beiden embryonalen Krebsarten Neuroblastom und Medulloblastom (Tumor des Kleinhirns), sowie im Neurozytom (gemischt neuronaler und glialer Tumor) wird CD24 exprimiert [Poncet *et al.*, 1996].

Auch im gesunden Nervensystem ist CD24 vorhanden, wo seine Expression räumlich und zeitlich streng reguliert wird. Während der Embryonalentwicklung wird CD24 stark von differenzierenden und wandernden Neuronen sowie von Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert [Calaora *et al.*, 1996, Kadmon *et al.*, 1992]. Eine Woche nach der Geburt sinkt das Expressionsniveau und CD24 ist vorwiegend noch in Zonen mit sekundärer Neurogenese, wie dem Gyrus dentatus des Hippocampus und der subventrikulären Zone, im rostralen migratorischen Strom sowie im Riechkolben zu finden [Nieoullon *et al.*, 2007, Belvindrah *et al.*, 2002, Calaora *et al.*, 1996].

Murines CD24 besteht aus nur 27 Aminosäuren und ist mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) mit der Zellmembran verknüpft (siehe Abbildung 2.2). Eine außergewöhnliche Eigenschaft von CD24 ist, dass nur ein geringer Anteil seines Molekulargewichts durch das Peptidrückgrat verursacht wird, während verschiedenste Zuckerepitope den erheblich größeren Teil davon ausmachen. Denn obwohl CD24 nur 27 Aminosäuren besitzt, was einem Molekulargewicht von knapp 3 kD entspricht, beläuft sich die apparente Masse dieses Moleküls auf etwa 25 bis 70 kD. Sie ist abhängig von Zelltyp und Entwicklungsstadium, in denen CD24 exprimiert wird. Im Nervensystem kommt CD24 hauptsächlich als drei Glykoformen mit 27, 30 und 33 kD vor. Diese Formen unterscheiden sich durch die Zusammensetzung der vorhandenen Glykane und höchstwahrscheinlich auch im Zelltyp und in den vermittelten Funktionen [Kleene *et al.*, 2001].

Über die Glykosylierung von CD24 ist bislang nicht viel bekannt. Etwa 30 % der Aminosäuren sind potenzielle Glykosylierungsstellen und wahrscheinlich wird mindestens die Hälfte davon tatsächlich genutzt. Auf CD24 aus einer murinen Lymphomzelllinie konnten mittels Lektinen folgende Glykanstrukturen detektiert werden: Gal β 1,4-GlcNAc, Man-Man, α 2,3-Sialinsäure und α 2,6-Sialinsäure [Kadmon *et al.*, 1992]. Eine Analyse von N-Glykanen auf CD24 verschiedener Zelllinien (Lymphoblastom-, Neuroblastom- und Astrozytomzellen) zeigte oligomannosidische Strukturen sowie Fukose auf neutralen N-Glykanen und di-, tri- und tetraantennäre komplexe N-Glykane mit bis zu vier Fukoseresten [Ohl *et al.*, 2003]. Mittels Lektinen und Antikörpern konnten zudem Lewis^x, α 2,3-Sialinsäure und HNK-1 auf O-Glykanen nachgewiesen werden [Brendel, 2005].



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung von CD24

Das Peptidrückgrat von murinem CD24 besteht aus 27 Aminosäuren (Swiss-Prot: P24807 (CD24_MOUSE)) [Kay *et al.*, 1990] und ist über das letzte Glycin mit einem GPI-Anker verknüpft, mit dem es in der Plasmamembran verankert ist. Die starke Glykosylierung von CD24 ist auf die große Anzahl potenzieller N- und O-Glykosylierungsstellen zurückzuführen. Entsprechende Aminosäuren sind gelb (N-Glykosylierung) bzw. rot (O-Glykosylierung) markiert.

2.4.2 CD24-Gene und CD24-defiziente Mäuse

Aufgrund der Expression von CD24 in vielen Geweben und Organen ist es unmöglich, CD24 eine bestimmte Funktion zuzuschreiben. Viel wahrscheinlicher ist es deshalb, dass CD24 abhängig vom Zelltyp und der dabei vorliegenden Glykosylierung unterschiedliche Funktionen ausübt. Um mehr Informationen über die Funktionen von CD24 herauszufinden, wurden in den 90er Jahren das *cd24*-Gen kloniert und erforscht sowie transgene Mäuse geschaffen, die defizient für das CD24-Protein sind [Wenger *et al.*, 1995].

In der Maus gibt es drei *cd24*-Gene (*cd24a*, *cd24b* und *cd24c*) [Wenger *et al.*, 1991], jedoch wird nur *cd24a* tatsächlich exprimiert [Wenger *et al.*, 1993]. Der Promotor des *cd24a*-Genes enthält sowohl Elemente von sogenannten Haushaltsgenen (*housekeeping genes*), die konstitutiv exprimiert werden, als auch von gewebespezifisch regulierten Genen. Die distal vom Promotor liegenden regulatorischen Elemente sind deshalb wahrscheinlich für die gewebespezifische Expression verantwortlich [Wenger *et al.*, 1993]. Ungewöhnlich ist, dass das *cd24*-Gen einen sehr langen nicht translatierten Bereich am 3'-Ende aufweist. Nur etwa 10 % des Gens kodieren das Peptid, während 90 % auf die untranslatierte Region fallen, die für die Regulation der mRNA-Stabilität verantwortlich ist [Liu und Zheng, 2007]. Erstaunlicherweise sind die Homologien zwischen den Spezies auf Nukleinsäurebasis nicht sonderlich hoch. Das menschliche und das murine *cd24*-Gen weisen z. B. nur 57 % Homologie der Nukleinsäuresequenz auf [Calaora *et al.*, 1996]. Auf Proteinebene ergeben sich immerhin eine 90 %-ige Identität von Aminosäuren zwischen Maus- und Ratten-CD24 sowie von 68 % zwischen Ratten- und humanem CD24 [Shirasawa *et al.*, 1993]. Da wie erwähnt der Proteinanteil von CD24 wahrscheinlich eher eine untergeordnete funktionelle Rolle spielt, und die Glykane wichtiger für die Funktionen dieses Glykoproteins sein könnten, wird eine exakte Analyse der Glykosylierung von CD24 verschiedener Spezies mehr Aufschluss über Homologien geben.

In CD24-defizienten Mäusen wurden der Promotor und das erste Exon des *cd24a*-Genes durch eine Neomycinresistenz-Kassette ersetzt, so dass kein CD24-Protein mehr produziert wird [Wenger *et al.*, 1995]. Die ersten Analysen dieser Mäuse konnten jedoch keinen auffälligen Phänotyp im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen feststellen. Obwohl in CD24-defizienten Mäusen eine reduzierte Zahl von Knochenmarkslymphozyten vorhanden ist, sind die Mengen von T-Lymphozyten in der Milz und den Lymphknoten sowie von Thymozyten unverändert. Auch B-Zellen werden weiterhin gebildet und können sich noch zu antikörperproduzierenden Zellen differenzieren, da die Immunglobulintiter der transgenen Mäuse vergleichbar mit denen von Wildtyp-Mäusen sind [Wenger *et al.*, 1995]. Auch die Immunantwort der CD24-defizienten Mäuse ist völlig normal [Nielsen *et al.*, 1997]. Erythrozyten

von CD24-defizienten Mäusen aggregieren stärker, sedimentieren schneller und haben eine höhere Tendenz zu lysieren, so dass sie insgesamt eine kürzere Halbwertszeit aufweisen. Trotzdem ist kein Unterschied zwischen Wildtyp- und CD24-defizienten Mäusen bezüglich Blutwerten wie Hämatokrit oder Hämoglobin messbar [Nielsen *et al.*, 1997]. Andererseits beeinflusst CD24 allerdings doch die Proliferation von T-Zellen, da sich diese in CD24-defizienten Mäusen früher und schneller teilen als in Wildtyp-Mäusen [Li *et al.*, 2006]. Untersuchungen des Nervensystems von CD24-defizienten Mäusen zeigen einerseits, dass sich die Pyramidenbahn (Corticospinaltrakt) völlig normal entwickelt und CD24 hierbei nicht benötigt wird [Sibbe *et al.*, 2007]. Andererseits konnte in der subventrikulären Zone von CD24-defizienten Mäusen eine erhöhte Zellzahl festgestellt werden, die jedoch wahrscheinlich aufgrund von ebenfalls vermehrt auftretenden programmierten Zelltodes nicht zu einer Veränderung des Volumens führt [Belvindrah *et al.*, 2002]. CD24-defiziente Mäuse weisen außerdem erhöhte Zellzahlen im Hautepithel, in der Kornea (Hornhaut) sowie im embryonalen zentralen Nervensystem auf [Nieoullon *et al.*, 2007]. Außerdem konnten weitere Studien zeigen, dass CD24-defiziente Mäuse resistent gegen das experimentelle Mausmodell für Multiple Sklerose sind [Bai *et al.*, 2000] (siehe 2.4.3). Bislang gab es keine veröffentlichten Studien über das Verhalten von CD24-defizienten Mäusen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden CD24-defiziente Mäuse deshalb in verschiedenen Verhaltenstests untersucht, mit denen motorische und koordinatorische Fähigkeiten sowie das Furchtverhalten bestimmt werden können (siehe 6.6).

2.4.3 Funktionen und Bindungspartner von CD24

Da CD24 beinahe ausschließlich aus Glykanen besteht, liegt die Vermutung nahe, dass die meisten, wenn nicht alle Funktionen, die dieses Molekül besitzt, durch die vorhandenen Zucker vermittelt werden.

Da CD24 in B-Zellen und Neuronen dafür bekannt ist, die Adhäsion zu vermitteln, wird es zu den Zelladhäsionsmolekülen gerechnet [Kadmon *et al.*, 1992]. Außerdem ist CD24 an der Entwicklung von T-Zellen beteiligt, da es auf B-Zellen, Makrophagen, Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert wird und so die Differenzierung von T-Zellen reguliert [Bai *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 1992].

Eine weitere Funktion von CD24, die in den letzten Jahren immer mehr Aufmerksamkeit gewonnen hat, ist seine Fähigkeit, die homeostatische Proliferation zu regulieren. Dieser Begriff bezeichnet die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes beispielsweise in der Lymphozyten-Zellzahl. Nach der klonalen Vermehrung von Lymphozyten nach Antigen-Stimulation werden große Mengen von T-Zellen durch programmierten Zelltod wieder entfernt. Um eine in etwa konstante Zahl an Lymphozyten zu erhalten, werden naive T-Zellen durch den Einfluss von Interleukinen stark vermehrt und T-Gedächtniszellen generiert. Interessanterweise zeigen Experimente mit CD24-defizienten Mäusen, dass CD24 diesen Mechanismus regulieren kann. Für die Förderung der homeostatischen Proliferation ist CD24 auf T-Zellen erforderlich, wohingegen CD24 auf dendritischen Zellen die Proliferation hemmt [Li *et al.*, 2006, Belvindrah *et al.*, 2002]. CD24 kontrolliert jedoch nicht nur die Homeostase von Blutzellen, sondern auch in der subventrikulären Zone [Belvindrah *et al.*, 2002]. CD24-defiziente Mäuse weisen nämlich erhöhte Zellzahlen im Hautepithel, in der Kornea sowie im embryonalen zentralen Nervensystem auf [Nieoullon *et al.*, 2007]. Ist CD24 nicht vorhanden, scheint also die Proliferation sehr vieler Zelltypen erhöht zu sein. Zudem führt eine dauerhafte Expression von CD24 zu Apoptose: eine ektopische Expression in Neuroblasten führt dazu, dass die Zellzahl und die Größe der Zellhaufen verringert werden [Nieoullon *et al.*, 2007]. CD24 scheint demnach generell ein regulatorisches Element für die Homeostase zu sein.

CD24 ist weiterhin für klinische Zwecke interessant, da es an der Metastasierung und dem Wachstum vieler Krebsarten beteiligt ist. Die Expression von CD24 auf Tumorzellen ist ein prognostischer Indikator für schlechtere Überlebenschancen bei Brustkrebs, Prostatakrebs sowie beim Ovarialkarzi-

nom [Baumann *et al.*, 2005]. Verstärkte CD24-Expression wurde auch bei anderen Tumorarten festgestellt, wie z. B. beim B-Zelllymphom, Nierenzellkarzinom, kleinzelligen Bronchialkarzinom, Nasopharynxkarzinom, Hepatozellulären Karzinom, Merkelzellkarzinom, Pankreaskarzinom und bei neuronalen Tumoren [Baumann *et al.*, 2005, Poncet *et al.*, 1996]. Zudem konnte gezeigt werden, dass mit CD24 transfizierte, normalerweise kaum metastatische Karzinomzelllinien durch die CD24-Expression verstärkt Metastasen auslösen, die Tumoren dann schneller wachsen und die Tumorzellen sich schneller teilen. In CD24-exprimierenden Tumorzellen werden außerdem über eine erhöhte Phosphorylierung von FAK Integrine aktiviert, die wiederum für eine verstärkte Bindung dieser Zellen an Fibronectin, Laminin und Kollagen verantwortlich sind. Diese Moleküle sind Bestandteil der extrazellulären Matrix und spielen eine Rolle bei der Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen, die wiederum Grundlage für die Formation von Metastasen darstellt. CD24-exprimierende Tumorzellen verteilen sich außerdem schneller und fördern die Wundheilung in einschichtig kultivierten Brustkrebszellen. CD24 scheint so auch die Invasivität von Tumorzellen zu erhöhen und damit zur metastasierenden Wirkung beizutragen [Baumann *et al.*, 2005]. Die induzierbare Expression von CD24 in Glioblastomzellen, die in Mäuse transplantiert wurden, führt ebenfalls zu erhöhter Migration und damit Invasion der Tumorzellen [Senner *et al.*, 1999]. Diese Beobachtungen werden auch durch Studien von Smith *et al.* [2006] bestätigt, die durch Verringerung der CD24-Expression in humanen Tumorzelllinien deren Wachstum und Migration hemmen konnten. Hinsichtlich einer Behandlung des kolorektalen Karzinoms wird CD24 deshalb als therapeutisches Ziel verfolgt, da durch *in vivo*-Applikation von α CD24-Antikörper und *in vitro*-Einsatz von siRNA (*small interfering RNA*) gegen das *cd24a*-Gen die Tumorigenität von Krebszellen herabgesetzt werden kann [Sagiv *et al.*, 2008].

Eine weitere äußerst interessante Eigenschaft von CD24 ist seine Rolle bei Multipler Sklerose. CD24-defiziente Mäuse scheinen resistent gegen das experimentelle Mausmodell für diese Krankheit, EAE (Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis), zu sein [Bai *et al.*, 2000]. Zudem sind beim Menschen Mutationen im *cd24*-Gen bekannt, die zu sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) und damit in diesen Fällen auch zum Austausch bestimmter Aminosäuren führen. Das wiederum bewirkt, dass die Expression von CD24 auf der Zelloberfläche steigt. Menschen mit diesen SNPs haben ein erhöhtes Risiko, an Multipler Sklerose zu erkranken und der Krankheitsverlauf ist in diesen Fällen beschleunigt [Zhou *et al.*, 2003]. Dieses Phänomen wird auch durch Arbeiten von Liu *et al.* [2007] bestätigt, die CD24 in transgenen Mäusen unter dem GFAP-Promotor exprimieren, so dass CD24 in Astrozyten überexprimiert wird. Wird in diesen Mäusen EAE induziert, zeigen sie einen schwereren Krankheitsverlauf mit größeren Läsionen, d. h. größeren demyelinisierten Bereichen und mehr Schäden an Axonen. Außerdem werden proinflammatorische Cytokine vermehrt exprimiert und es sind mehr T-Lymphozyten zu finden. CD24 auf Astrozyten verstärkt also die Auswirkungen von EAE, indem es T-Zellen stimuliert und aggressiver macht und damit die autoimmunen Entzündungsreaktionen erhöht [Liu *et al.*, 2007]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CD24 die Anfälligkeit für Multiple Sklerose beeinflusst und am Krankheitsverlauf beteiligt ist. Möglicherweise ist CD24 auch an anderen Autoimmunerkrankungen wie z. B. dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) beteiligt [Liu und Zheng, 2007]. CD24 spielt also sowohl eine Rolle in Autoimmunerkrankungen als auch bei der homeostatische Proliferation. Aufgrund der Tatsache, dass bei vielen Autoimmunerkrankungen die homeostatische Proliferation beeinträchtigt ist, könnte CD24 das verbindende Element darstellen [Liu und Zheng, 2007].

Neben der Rolle von CD24 bei Multipler Sklerose hat es im Nervensystem weitere Funktionen. Beispielsweise ist bekannt, dass CD24 eine Rolle bei der Adhäsion [Kadmon *et al.*, 1992] und der Migration von Neuronen [Calaora *et al.*, 1996] spielt. Außerdem beeinflusst es das Auswachsen von Neuriten. In retinalen Ganglienzellen (RGCs) und Hinterwurzelganglienneuronen (DRG-Neuronen)

inhibiert CD24 das Neuritenwachstum, während es das von Kleinhirnneuronen fördert [Kleene *et al.*, 2001, Shewan *et al.*, 1996] (siehe auch 2.4.4).

Für einige seiner Funktionen sind die Bindungspartner von CD24 bereits bekannt. Bei Adhäsionen spielt eine homophile Interaktion von CD24 eine Rolle [Kadmon *et al.*, 1992].

In seiner Funktion bei Tumorwachstum und Metastasierung ist die Interaktion von CD24 mit P-Selektin relevant [Aigner *et al.*, 1997, Sammar *et al.*, 1997a]. Selektine werden auf Epithelzellen der Blutgefäße und aktivierten Blutplättchen exprimiert. CD24 auf Tumorzellen verstärkt deren Adhäsion und die Invasion in das Epithel (sogenanntes *Rolling*), die Voraussetzung für Metastasierung sind.

Außerdem ist eine Verbindung von CD24 zu Kinasen der Src-Familie bekannt, denn Immunpräzipitationen aus verschiedenen Tumor- und Blutzelllinien zeigen eine Assoziation von CD24 mit p54^{Lyn}, p56^{Lck}, p56^{Hck} und p55^{Fgr} [Sammar *et al.*, 1997b, Zarn *et al.*, 1996] und Tyrosinkinaseinhibitoren können die CD24-abhängige Aggregation von monozytischen Zellen inhibieren [Sammar *et al.*, 1997a]. Diese Assoziation hängt zudem mit der Aktivierung von Integrinen zusammen, da FAK durch CD24-Expression vermehrt phosphoryliert wird [Baumann *et al.*, 2005], CD24 die Bindung von VLA-4 an VCAM-1 reguliert [Hahne *et al.*, 1994] und die Lokalisierung von β 1 Integrin in *Lipid raft*-Domänen (Lipidflöschchen) induzieren kann [Runz *et al.*, 2008].

Die am besten untersuchte Interaktion von CD24 mit einem Rezeptor ist die mit dem Zelladhäsionsmolekül L1 (siehe auch 2.4.4 und 2.5.1). Da sowohl L1 als auch CD24 Zelladhäsionen vermitteln und Kalziumsignale auslösen können, gingen Kadmon *et al.* [1995b] einer möglichen Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen in Körnerzellen des Kleinhirns und der Neuroblastomzelllinie N2A nach. Die direkte Bindung von CD24 an L1 sowie die Kolokalisation in den Zellen konnten gezeigt werden. Außerdem führt die gleichzeitige Stimulation von Zellen mit Antikörpern gegen CD24 und L1 zu einer zehnfachen Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels im Vergleich zu einer Stimulation mit jeweils nur einem der Antikörper. CD24 scheint also die Signaltransduktion, in die L1 involviert ist, zu verstärken [Kadmon *et al.*, 1995b]. Außerdem konnte in Aggregationsstudien mit N2A-Zellen gezeigt werden, dass es eine gewisse Hierarchie in der Signaltransduktion von CD24 und L1 gibt, da L1 an der frühen und schwächeren Erkennung von schnell wachsenden Zellen beteiligt ist, während CD24 in sekundären Adhäsionsmechanismen wichtig ist, die langsamer wachsende Zellen stärker aggregieren lassen [Kadmon *et al.*, 1995a]. Diese Adhäsionskaskade könnte eine Strategie von Zellen sein, stabile Kontakte sicher zu etablieren. Erste Hinweise, dass die direkte Interaktion von CD24 mit L1 zuckerabhängig ist, stammen von Sammar *et al.* [1997a], da die Bindung von mit OSGE (O-Sialoglykoendopeptidase) verdautem CD24 deutlich schwächer ist als die von unverdautem CD24. Spätere Studien [Brendel, 2005, Kleene *et al.*, 2001] konnten schließlich beweisen, dass diese Interaktion über α 2,3-Sialinsäure auf CD24 stattfindet. Die Sialinsäurebindungsstelle konnte zudem in der ersten Fibronektindomäne von L1 lokalisiert werden. L1 wird aufgrund dieser Fähigkeit zur Bindung von Sialinsäuren zur Gruppe der Siglecs gezählt. Diese Bindung von CD24 an L1 spielt funktionell eine entscheidende Rolle in der Förderung bzw. Inhibition des Neuritenwachstums verschiedener Neuronentypen durch CD24 (siehe 2.4.4).

2.4.4 Die Rolle von CD24 im Neuritenwachstum

CD24 ist bekannt dafür, dass es das Neuritenwachstum von perinatalen retinalen Ganglienzellen und DRG-Neuronen inhibiert, im embryonalen Alter (E17) jedoch keinen Einfluss auf die Neuritenlängen dieser Zelltypen hat [Shewan *et al.*, 1996]. Im Gegensatz dazu fördert CD24 das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen [Kleene *et al.*, 2001]. Diese Effekte von CD24 sind unabhängig von neuronalem CD24, da sie auch in CD24-defizienten Neuronen nachweisbar sind. CD24 vermittelt die Förderung bzw. Inhibition des Neuritenwachstums also in einer *trans*-Interaktion mit neuronalen

Rezeptoren. Da L1 bekanntermaßen mit CD24 interagiert (siehe 2.4.3), war dieses neuronale Zelladhäsionsmolekül ein guter Kandidat dafür. Dies konnte von Kleene *et al.* [2001] bestätigt werden, da das Auswachsen von L1-defizienten Kleinhirn- bzw. DRG-Neuronen nicht mehr durch CD24 gefördert bzw. gehemmt werden kann.

Die Zuckerabhängigkeit der Funktionen von CD24 im Neuritenwachstum konnte gezeigt werden, da desialyliertes CD24 die beschriebenen Effekte nicht aufweist. Wie unter 2.4.1 beschrieben, tragen die CD24-Glykoformen unterschiedliche Zucker: die beiden großen 30 und 33 kD Glykoformen enthalten auf O-Glykanen α 2,3-Sialinsäure und Lewis^x, die 33 kD Form zusätzlich noch HNK-1. Auf der kleinen 27 kD Form sind diese Glykane nicht nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Expression der unterschiedlichen CD24-Glykoformen in neuronalen und glialen Zelltypen unterscheidet, da in Kleinhirnneuronen vorwiegend die 27 kD Glykoform auftritt, während Astrozyten die beiden größeren 30 und 33 kD Formen enthalten [Brendel, 2005]. Außerdem scheinen die Effekte von CD24 auf Neuritenwachstum nicht von N-Glykanen, sondern nur von O-Glykanen verursacht zu werden, da N-deglykosyliertes CD24 ebenfalls an L1 bindet und das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert bzw. das von DRG-Neuronen hemmt [Brendel, 2005]. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass CD24 zuckerabhängig in *trans* mit neuronalen Rezeptoren interagiert um die Neuritenwachstumseffekte zu vermitteln.

Des Weiteren konnte für L1 die α 2,3-sialinsäureabhängige Bindung an CD24 mittels ELISA-Experimenten gezeigt sowie die Sialinsäurebindungsstelle charakterisiert und in der ersten Fibronektindomäne von L1 lokalisiert werden [Brendel, 2005]. L1 wird aufgrund dieser Fähigkeit zur Bindung von Sialinsäuren zur Gruppe der Siglecs gezählt.

Zusätzlich zu α 2,3-Sialinsäure konnte auch Lewis^x als funktionelles Glykan auf CD24 charakterisiert werden, da die Zugabe eines dieser Glykane in Neuritenwachstumsexperimenten die Förderung bzw. Inhibition von Kleinhirn- bzw. DRG-Neuronen durch CD24 aufhebt [Brendel, 2005]. Auf der Suche nach neuronalen Rezeptoren für Lewis^x auf CD24, die möglicherweise in *cis* mit L1 interagieren, wurden Sequenzvergleiche zwischen fukosespezifischen Lektinen und L1-bindenden Adhäsionsmolekülen der Immunglobulinsuperfamilie durchgeführt. Dabei wurden die beiden GPI-verankerten Proteine TAG-1 (*Transient Axonal Glycoprotein-1*) und F3 als potenzielle Lewis^x-Rezeptoren identifiziert [Brendel, 2005].

Die in den vorgestellten Arbeiten erhaltenen Erkenntnisse über die Rolle von CD24 im Neuritenwachstum sind in Abbildung 2.3 zusammengefasst. Eine genauere Untersuchung von TAG-1 und F3 im Hinblick auf ihre mögliche Rolle im CD24-abhängigen Neuritenwachstum sowie die Suche nach Unterschieden in der Signaltransduktion von Kleinhirn- und DRG-Neuronen, die zu gefördertem bzw. inhibiertem Neuritenwachstum führen, ist deshalb notwendig und wird im Rahmen dieser Dissertation beschrieben (siehe 6.4).

2.5 Neurale Zelladhäsionsmoleküle

Außer CD24 sind auch die meisten anderen Zelladhäsionsmoleküle glykosylierte Proteine. Zu den Zelladhäsionsmolekülen (*Cell Adhesion Molecules*, CAMs) gehören Glykoproteine der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF), Integrine, Cadherine und Selektine sowie Rezeptor Tyrosinkinase, Neuroligine, Neurexine, Neuropiline und Plexine [Maness und Schachner, 2007].

Die IgSF umfasst verschiedene Moleküle, die in ihrer extrazellulären Domäne mindestens eine immunglobulinartige (Ig-artige) Domäne enthalten. Diese Domänen sind auch für Antikörper charakteristisch und bestehen aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die über eine Disulfidbrücke verknüpft sind [Vaughn und Bjorkman, 1996]. Mitglieder der IgSF gehören abhängig von den Anzahlen der Ig-Domänen und Fibronektin Typ III (FNIII)-*Repeats* sowie davon, wie sie mit der Membran verankert sind, wiederum Unterfamilien an (siehe Abbildung 2.4). Die L1-Unterfamilie beispiels-

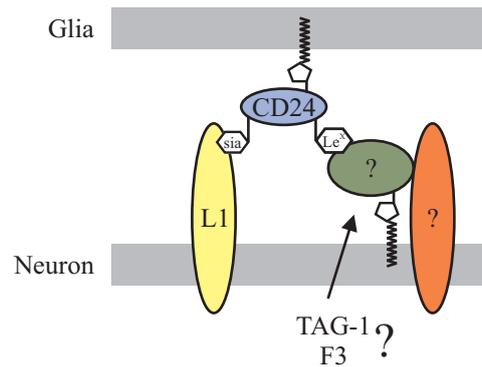


Abbildung 2.3: Ursprüngliches Modell für die Rolle von CD24 im Neuritenwachstum

CD24-Glykoformen auf Gliazellen vermitteln eine Förderung bzw. Inhibition des Neuritenwachstums über zuckerabhängige Interaktionen mit neuronalen Rezeptoren. L1 ist für die α 2,3-sialinsäureabhängige Bindung verantwortlich. TAG-1 und F3 sind potenzielle Lewis^x-Rezeptoren, die möglicherweise mit transmembranären Korezeptoren interagieren.

weise besteht aus L1 (siehe auch 2.5.1), CHL1 (*Close Homolog of L1*), Neurofascin und NrCAM (*NgCAM related Cell Adhesion Molecule*). Die beiden GPI-verankerten Proteine TAG-1 und F3 (siehe auch 2.5.2) bilden zusammen mit BIG-1 (*Brain-derived Ig molecule*), BIG-2, NB-2 und NB-3 die TAG-1/F3-Unterfamilie. Die NCAM-Unterfamilie umfasst alle drei Isoformen von NCAM sowie ApCAM (*Aplysia Cell Adhesion Molecule*), die DCC-Unterfamilie wiederum DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*), Neogenin und Frazzled. Alle IgSF-Mitglieder ohne FNIII-*Repeats* bilden ebenfalls eine Gruppe. Zu ihr gehören beispielsweise MAG, P0, und CD90 (Thy1, Thymozytenantigen 1) [Crossin und Krushel, 2000].

Während der Entwicklung des Nervensystems laufen komplexe Mechanismen ab, die Proliferation, Migration und letztendlich auch Apoptose von Neuronen steuern. Wandernde Neurone und wachsende Axone werden durch ihr Umfeld gezielt koordiniert, indem das Auswachsen von Neuriten, die Bildung von Wachstumskegeln, Axonbündelung und -entbündelung, die Bildung von Verzweigungen, die Zielfindung, Synapsenbildung und Aufrechterhaltung von Synapsen vermittelt wird. Dies geschieht mittels chemoattraktiver bzw. -repulsiver Signale (sogenannter *guidance cues* in der extrazellulären Matrix) oder direkter Kontakte zwischen bereits existierenden Neuronen, Axonen und Gliazellen. Für diese direkten Interaktionen sind Zelladhäsionsmoleküle verantwortlich. Neurale Erkennungsmoleküle spielen nicht nur während der Entwicklung eine wichtige Rolle, sondern auch im adulten Nervensystem [Maness und Schachner, 2007, Wiencken-Barger *et al.*, 2004].

2.5.1 L1

L1 ist eines der am besten untersuchten IgSF-Mitglieder und besteht wie die anderen Proteine seiner Unterfamilie aus sechs Ig-ähnlichen Domänen und fünf FNIII-*Repeats* im extrazellulären Teil, sowie einer Transmembrandomäne und einem hochkonservierten zytoplasmatischen Ende. Murines L1 ist ein 200 kD großes, sowohl glykantragendes als auch -bindendes Protein [Brümmendorf und Rathjen, 1995].

L1 spielt eine entscheidende Rolle während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems und ist vorwiegend auf Axonen von postmitotischen wachsenden Neuronen sowie deren Wachstumskegeln zu finden. Dabei ist es in die Migration von Neuronen, Neuritenwachstum, Axonwegführung und -bündelung, das Überleben von Neuronen, synaptische Plastizität, Myelinisierung sowie Remyelinisierung nach Verletzungen involviert [Maness und Schachner, 2007]. Im peripheren Nervensystem

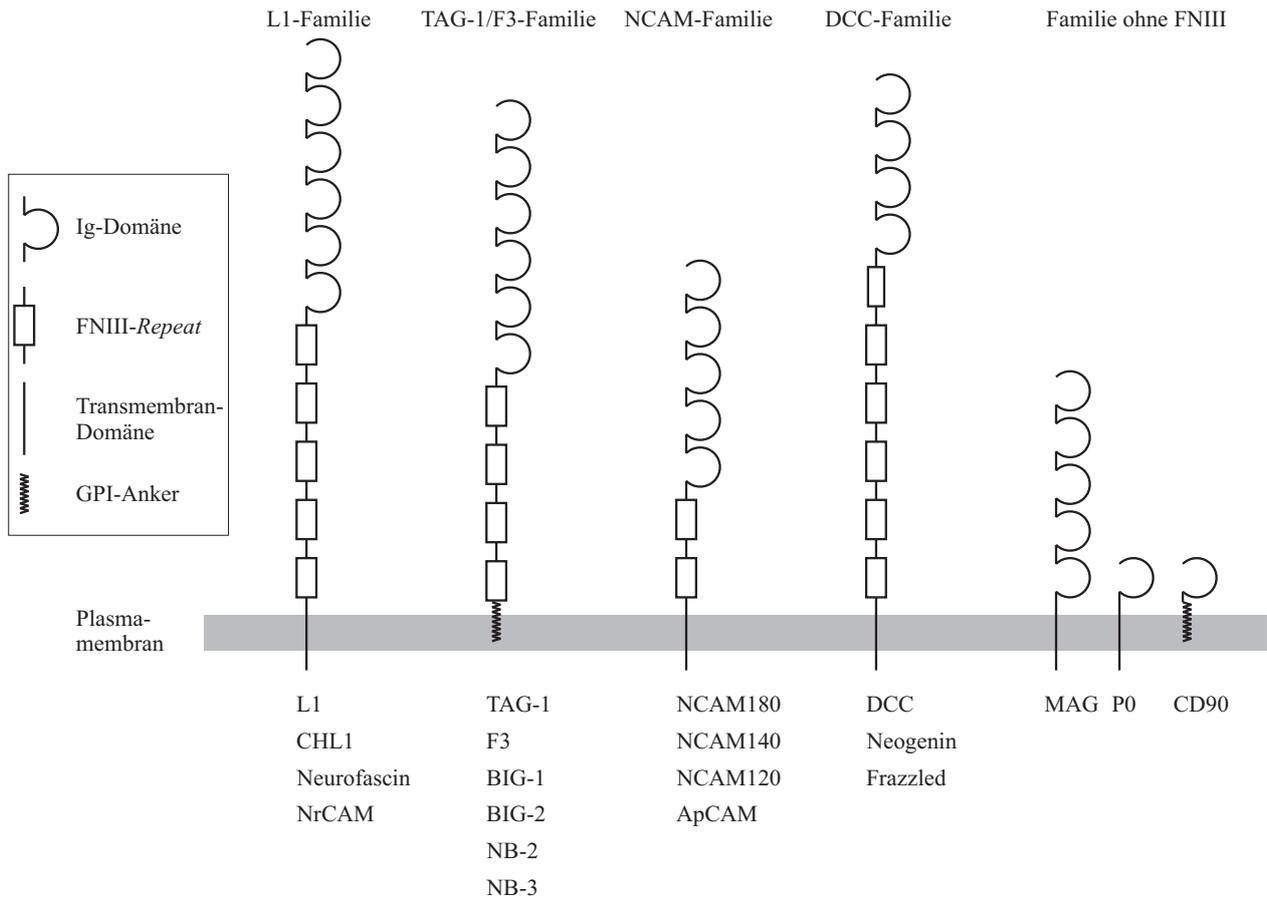


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Immunglobulinsuperfamilie

Dieses Schema zeigt einige beispielhafte Moleküle der IgSF. Die meisten Mitglieder lassen sich strukturell in Unterfamilien einordnen, je nach Anzahl der vorhandenen Ig-artigen Domänen und FNIII-*Repeats* und nach der Art der Verknüpfung mit der Membran [Crossin und Krushel, 2000].

Protein	Referenz
NCAM	Horstkorte <i>et al.</i> [1993]
Laminin	Berardi <i>et al.</i> [1999], Grumet <i>et al.</i> [1993]
Phosphacan, Neurocan	Margolis <i>et al.</i> [1996]
Integrine	Kamiguchi und Lemmon [1997]
FGFR (<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>)	Kamiguchi und Lemmon [1997]
Neuropilin-1, Semaphorin 3A	Castellani <i>et al.</i> [2000]
Ankyrin	Needham <i>et al.</i> [2001]
TAG-1	Kuhn <i>et al.</i> [1991]
F3	Brümmendorf <i>et al.</i> [1993]
CD24	Brendel [2005], Sammar <i>et al.</i> [1997a] Kadmon <i>et al.</i> [1995b]

Tabelle 2.1: Beispiele für Bindungspartner von L1

konnte L1 außerdem auf nicht-myelinisierenden Schwannzellen nachgewiesen werden [Martini *et al.*, 1994]. Die Expression von L1 ist jedoch nicht ausschließlich auf das Nervensystem beschränkt, da es auch auf Melanom- und Tumorzellen des Blutsystems zu finden ist [Brümmendorf *et al.*, 1998].

Die Wichtigkeit von L1 für das Nervensystem wird durch Defekte unterstrichen, die in L1-defizienten Mäusen oder Menschen mit Mutationen im *L1*-Gen auftreten. L1-defiziente Mäuse weisen Defekte in der Wegführung von Axonen im corticospinalen Trakt, eine fehlerhafte Entwicklung des Corpus callosum, Verkleinerungen von Hippocampus und Kleinhirn sowie eine veränderte Positionierung von dopaminergen Neuronen auf [Kamiguchi *et al.*, 1998]. Im Menschen lösen Mutationen im *L1*-Gen das sogenannte L1-Syndrom aus, das ein X-chromosomal gekoppeltes Krankheitsbild mit verschiedenen Syndromen darstellt. Alle Syndrome sind im sogenannten CRASH-Syndrom (*Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spastic paraparesis, Hydrocephylus*) zusammengefasst [Fransen *et al.*, 1995]. Mindestens 85 verschiedene Mutationen im *L1*-Gen sind bekannt. Je stärker sie die Struktur von L1 beeinflussen, desto schwerwiegender sind die Beeinträchtigungen [Kamiguchi *et al.*, 1998].

Seine vielen Funktionen vermittelt L1 durch homo- und heterophile Interaktionen mit einer Vielzahl von Oberflächenmolekülen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Einige der bekanntesten Interaktionspartner sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die Interaktionen von L1 mit TAG-1 und F3 sind unter 2.5.4 näher beschrieben, die mit CD24 unter 2.4.3.

Die Signaltransduktionen, die durch L1 hervorgerufen werden, sind mittlerweile relativ gut untersucht. Über Integrine aktiviert L1 beispielsweise diverse Kinasen, wie p60^{Src}, die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3-Kinase) und PAK1 (p21-aktivierte Kinase 1) und führt über Aktivierung von MEK (MAPK/ERK Kinase) und ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) zu Zellmigration und Neuritenwachstum. Dafür ist ebenfalls der Kontakt der intrazellulären Domäne von L1 zu Ankyrin, einem Spektrinadapter, und damit zum Zytoskelett wichtig (siehe Abbildung 2.5) [Maness und Schachner, 2007].

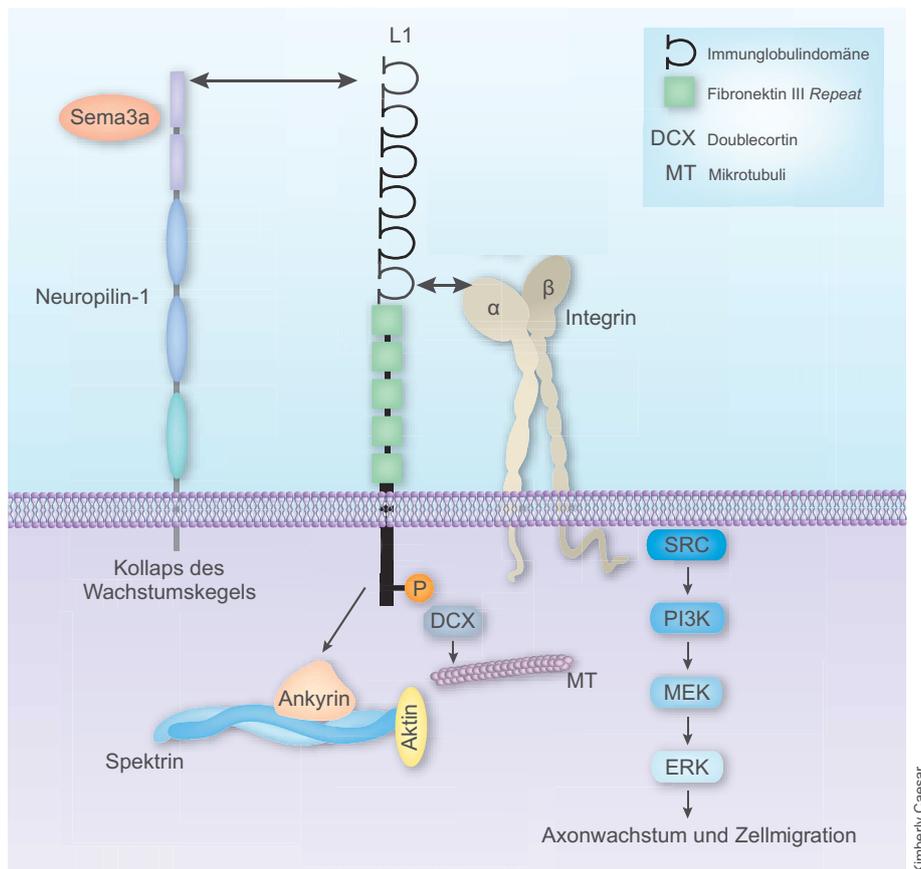


Abbildung 2.5: Von L1 induzierte Signalkaskaden (nach Maness und Schachner [2007])

Signaltransduktionen, die durch L1 induziert werden, beinhalten die Aktivierung von $p60^{\text{Src}}$ (SRC), der PI3-Kinase (PI3K), MEK und ERK und führen zu Axonwachstum und Zellmigration. In einigen Fällen wird diese Aktivierung durch Interaktion von L1 mit Integrinen vermittelt. In der zytoplasmatischen Domäne von L1 gibt es ein Sequenzmotiv, das Ankyrin rekrutiert und so über Spektrin für eine Assoziation von L1 mit dem Aktin-Zytoskelett sorgt. Wenn das Motiv phosphoryliert ist, wird hingegen Doublecortin rekrutiert, das L1 an Mikrotubuli koppelt. Um einen Kollaps des Wachstumskegels hervorzurufen, kann L1 auch mit Neuropilin-1, einem Semaphorin 3A-Rezeptor (Sema3a-Rezeptor), interagieren. Die Verknüpfung von L1 mit dem Zytoskelett bzw. Mikrotubuli ist wichtig für die Funktionen von L1 in Axonwachstum, Zellmigration und Kollaps des Wachstumskegels.

2.5.2 TAG-1 und F3

TAG-1 (*Transient Axonal Glycoprotein-1*) und F3 sind zwei nah verwandte, 135 kD große Proteine der IgSF, die aus jeweils sechs Ig-ähnlichen Domänen und vier FNIII-*Repeats* bestehen. Beide Moleküle sind mittels GPI-Anker mit der Zellmembran verknüpft, können aber auch als lösliche Proteine sekretiert werden [Soares *et al.*, 2005, Gollan *et al.*, 2003].

Homologe Proteine von F3 aus Maus werden im Huhn als Contactin/F11 und im Menschen als Contactin bezeichnet. F3 wird von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, vor allem im Kleinhirn und afferenten Fasern im Rückenmark sowie von Oligodendrozyten exprimiert [Gollan *et al.*, 2003]. Im Huhn findet man F11 auch auf Moto- und DRG-Neuronen. Die höchste Expression tritt eine und zwei Wochen nach der Geburt auf [Karagogeos, 2003]. Außerdem ist F3 im adulten Kleinhirn und der Retina zu finden. F3 ist an Neuritenwachstum, Axonbündelung, Synapsenbildung [Gollan *et al.*, 2003], der Proliferation von Körnerzellen des Kleinhirns [Karagogeos, 2003], der Migration von Schwannzellen [Thomaidou *et al.*, 2001] und der Myelinisierung beteiligt [Hu *et al.*, 2006]. Erwähnenswert ist zudem, dass F3 im peripheren Nervensystem das Auswachsen von Neuriten fördert, während es darauf im zentralen Nervensystem hemmend wirkt [Hu *et al.*, 2006]. Bekannte Interaktionspartner von F3 sind Caspr [Faivre-Sarrailh *et al.*, 2000] und L1 [Brümmendorf *et al.*, 1993] (siehe auch 2.5.4), NrCAM, Neurofascin, Tenascin-R und -C sowie RPTP β (*Receptor Protein Tyrosin Phosphatase*) [Brümmendorf und Rathjen, 1996]. Im Gegensatz zu TAG-1 ist von F3 bislang keine homophile Interaktion bekannt [Karagogeos, 2003]. Zusammen mit Caspr tritt F3 im *Paranode* des Ranvierschen Schnürrings auf (siehe 2.5.4). F3-defiziente Mäuse exprimieren statt des Exons 3 des *contactin*-Genes eine Neomycinresistenz-Kassette, so dass kein F3-Protein mehr produziert wird. Bis zum Alter von etwa 10 Tagen nach der Geburt (P10) sind F3-defiziente Mäuse von ihren Wildtyp-Geschwistern kaum zu unterscheiden. Dann jedoch entwickeln sie einen ataxischen Phänotyp, d. h. sie verlieren die Kontrolle über ihre Muskeln. Außerdem können sie kaum noch an Körpergewicht zunehmen. Dies führt zur völligen Schwächung, defiziente Mäuse bleiben kleiner und etwa im Alter von 18 Tagen (P18) sterben sie. Im Nervensystem lässt sich beobachten, dass das Kleinhirn von F3-defizienten Mäusen kleiner ist als das von Wildtyp-Geschwistern. Außerdem ist die Orientierung der Parallelfasern gestört und Neuriten von Körnerzellen werden nicht gebündelt. F3 scheint also für die Entwicklung des Kleinhirns und Interaktionen zwischen Neuriten wichtig zu sein [Berglund *et al.*, 1999]. Zudem lassen sich Defekte im Myelin feststellen, die ebenfalls zum Kontrollverlust über Bewegungen beitragen. Auch im Hypothalamus beeinträchtigt die F3-Defizienz die Entwicklung von Neuronen des Nucleus infundibularis [Fetissov *et al.*, 2005]. Im Hippocampus von F3-defizienten Mäusen ist die Langzeit-Depression beeinträchtigt [Karagogeos, 2003].

Homologe Proteine von TAG-1 aus Maus werden im Huhn als Axonin und im Menschen als Contactin-2 oder TAX-1 bezeichnet. Die Regulation seiner Expression ist entwicklungsabhängig: TAG-1 wird vorwiegend während der Entwicklung des Nervensystems von einer Vielzahl von Regionen, wie beispielsweise Cortex, Hypothalamus, Mesencephalon, Kleinhirn, Kommissuralfasern, Motoneuronen des Rückenmarks und DRGs exprimiert. Anschließend beschränkt sie sich nur noch auf Riechkolben, Hippocampus, Körnerzellen des Kleinhirns und retinale Ganglienzellen. Die Expression von TAG-1 liegt zeitlich vor der von F3. Prinzipiell ist TAG-1 sowohl auf Neuronen als auch auf myelinisierenden Schwannzellen und Oligodendrozyten zu finden [Denaxa *et al.*, 2003]. Nach Läsionen des Rückenmarks wird die Expression auf Schwannzellen und Mikroglia des Rückenmarks verstärkt [Soares *et al.*, 2005]. TAG-1 fördert als Rezeptor für Neurofascin das Neuritenwachstum, vermittelt die Wegführung von Axonen sowie Zellmigration [Pruss *et al.*, 2006]. In DRG-Neuronen von Hühnern sind TAG-1 und L1 zusammen an der Wegfindung von nocizeptiven Neuronen (von Schmerzrezeptoren) beteiligt, während F3 mit NrCAM die Wegfindung von propriozeptiven Neuronen (von Muskeln, Sehnen und Gelenken) steuert [Perrin *et al.*, 2001]. Außerdem ist TAG-1 an der Repulsion von DRG-Neuronen durch die Chorda dorsalis (Notochord) [Law *et al.*, 2008, Masuda

et al., 2004] sowie der Führung von Kommissuralneuronen durch die Grundplatte des Neuralrohres [Masuda *et al.*, 2000] beteiligt. Auch für die Entwicklung des optischen Nerven ist TAG-1 essenziell, da es in retinalen Ganglienzellen und myelinisierenden Zellen exprimiert wird und damit an der Organisation der Struktur von retinalen Axonen beteiligt ist [Chatzopoulou *et al.*, 2008]. In adulten Mäusen steuert es zudem die Reorganisation nach Verletzungen, Axon-Glia-Interaktionen, die Migration von Gliazellen in die Läsion und die Demyelinisierung [Soares *et al.*, 2005]. TAG-1 kann über seine FNIII-*Repeats* homophil mit einem anderen TAG-1-Molekül interagieren [Pavlou *et al.*, 2002, Perrin *et al.*, 2001]. Heterophil bindet TAG-1 an L1 [Kunz *et al.*, 1998] und Caspr2 [Poliak *et al.*, 2003] (siehe auch 2.5.4) sowie NrCAM [Fitzli *et al.*, 2000] und Neurofascin [Pruss *et al.*, 2006]. Zusammen mit Caspr2 tritt TAG-1 im *Juxtaparanode* des Ranvierschen Schnürrings auf (siehe 2.5.4). TAG-1-defiziente Mäuse sind bezüglich der Exons II bis IV des *TAG-1*-Genes deletiert, was der Aminosäuresequenz vom Translationsstart bis zur ersten Ig-Domäne entspricht. Dies führt dazu, dass das TAG-1-Protein nicht mehr produziert wird [Fukamauchi *et al.*, 2001]. Im Gegensatz zu F3-defizienten Mäusen, die einen deutlichen Phänotyp aufweisen und nicht länger als etwa 18 Tage lebensfähig sind, sind TAG-1-defiziente Mäuse relativ unauffällig. Die Mäuse sind auch adult lebensfähig und die Morphologie von Kleinhirn, Rückenmark und Hippocampus ist normal. Es konnten jedoch eine erhöhte Expression von Adenosinrezeptoren im Hippocampus sowie eine größere Sensitivität für Stimuli, die Krämpfe auslösen, und damit für Epilepsien, festgestellt werden [Fukamauchi *et al.*, 2001]. Für die molekulare Organisation von juxtaparanodalen Regionen ist TAG-1 jedoch essenziell, denn in TAG-1-defizienten Mäusen ist die Lokalisierung von Proteinen dieser Region stark gestört [Traka *et al.*, 2003]. In Zebrafischen führt ein *Knockdown* von TAG-1 dazu, dass zentrale Wachstumskegel von sensorischen Neuronen kaum wandern, da ihnen TAG-1 als Stimulanz fehlt [Liu und Halloran, 2005]. Im optischen Nerv führt TAG-1-Defizienz zudem zu veränderten Anzahlen von retinalen Ganglienzellen sowie einer anormalen Organisation des astroglialen Netzwerks. Adulte TAG-1-defiziente Mäuse weisen keine retinalen Ganglienzellen mehr auf [Chatzopoulou *et al.*, 2008].

Obwohl GPI-verankerte Moleküle keine intrazelluläre Domäne aufweisen, können auch sie Signaltransduktionen auslösen. In den meisten Fällen geschieht dies durch Lokalisierung dieser Proteine in *Lipid rafts* und der Interaktion mit Gangliosiden und intrazellulären Signalmolekülen wie Tyrosinproteinkinasen p60^{Src} und p59^{Fyn}. Signaltransduktionsmechanismen beinhalten möglicherweise die *cis*-Interaktion von GPI-verankerten Proteinen mit Mitgliedern der L1-Unterfamilie der IgSF oder Neurexinen [Karagogeos, 2003] (siehe auch 2.5.4).

2.5.3 Caspr und Caspr2

Caspr (*Contactin-associated protein*) und Caspr2 sind ebenfalls zwei nah miteinander verwandte Proteine, die zu den Neurexinen gehören. Sie sind transmembranäre Moleküle und haben eine molekulare Masse von 190 bzw. 180 kD [Poliak *et al.*, 1999, Peles *et al.*, 1997].

Caspr wird auch Paranodin und in *Drosophila* Neurexin IV genannt und deshalb zudem mit NCP1 (Neurexin IV/Caspr/Paranodin) abgekürzt [Bhat *et al.*, 2001]. Ursprünglich wurde Caspr in einem Komplex mit F3 (Contactin) und RPTP β identifiziert [Peles *et al.*, 1997]. Caspr wird hauptsächlich postnatal und maximal im adulten Stadium exprimiert. Caspr befindet sich vorwiegend im *Paranode* des Ranvierschen Schnürrings (siehe Abbildung 2.6) in den Verbindungen zwischen Axonen und Endschleifen von myelinisierenden Oligodendrozyten und Schwannzellen, wo es nötig für die Entwicklung dieser Strukturen ist [Einheber *et al.*, 1997]. Wie F3-defiziente Mäuse sind auch Caspr-defiziente Mäuse bis zu einem Alter von etwa 10 Tagen (P10) nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern zu unterscheiden. Von diesem Zeitpunkt an bleiben sie jedoch kleiner und entwickeln Muskelzittern, Ataxie und Lähmungserscheinungen. Gründe hierfür sind, dass die normale Organisation von Ranvierschen Schnürringen fehlschlägt, da sich keine paranodalen Kontakte bilden können. Außerdem

wird F3 ohne Caspr nicht mehr in die *Paranodes* transportiert und Kaliumkanäle sind nicht mehr nur auf die juxtapanodale Region beschränkt, sondern finden sich nun auch im *Paranode* wieder. Durch Veränderungen in den Ranvierschen Schnürringen ist die Reizleitungsgeschwindigkeit von peripheren Nerven stark herabgesetzt. Etwa drei Wochen nach der Geburt sterben Caspr-defiziente Mäuse [Bhat *et al.*, 2001].

Zwei Jahre nach der Entdeckung von Caspr wurde ein sehr ähnliches Protein gefunden und Caspr2 genannt [Poliak *et al.*, 1999], obwohl Caspr2 nicht mit F3 assoziiert ist. Die beiden Proteine unterscheiden sich in einigen extrazellulären Domänen sowie dem intrazellulären Teil. Zwar besitzen beide Moleküle eine Bindungsstelle für das Protein 4.1B, aber nur in Caspr2 ist auch eine Sequenz für die Bindung von PDZ-Domänen (*Post synaptic density*, *Discs large*, *Zonula occludens-1*) zu finden. Caspr2 wird ab dem embryonalen Tag 15 (E15) im Nervensystem exprimiert und hat sein Expressionsmaximum im adulten Stadium. In vielen Regionen des Nervensystems ähnelt sich die Expression von Caspr und Caspr2. Im Corpus callosum und im Rückenmark wird jedoch nur Caspr2 auf Gliazellen und Neuronen exprimiert, während Caspr nur auf Neuronen auftritt. Wie Caspr wird auch Caspr2 gehäuft auf myelinisierten Neuronen gefunden, jedoch ist Caspr2 in der juxtapanodalen Region des Ranvierschen Schnürrings lokalisiert [Poliak *et al.*, 1999] (siehe Abbildung 2.6). Dort ist es mit Kaliumkanälen und TAG-1 assoziiert [Poliak *et al.*, 2003, Traka *et al.*, 2003]. Caspr2-defiziente Mäuse weisen ähnlich wie TAG-1-defiziente Mäuse keinen auffälligen Phänotyp auf, alle untersuchten Gewebe des Gehirns sind vergleichbar mit Wildtyp-Geschwistern, die Myelinisierung ist normal und im Gegensatz zu Caspr-defizienten Mäusen zeigen Caspr2-defiziente Mäuse keine neurologischen oder motorischen Störungen. Auch die grobe Struktur von Ranvierschen Schnürringen entspricht der von Wildtyp-Mäusen. Allerdings ist die Lokalisierung von Kaliumkanälen und TAG-1 stark beeinträchtigt, da diese Proteine nicht mehr wie normalerweise in juxtapanodalen Regionen angereichert sind [Poliak *et al.*, 2003]. Beim Menschen gibt es jedoch Mutationen im *CNTNAP2*-Gen, das für humanes Caspr2 kodiert, die zum CDFE-Syndrom (*Cortical Dysplasie-Focal Epilepsy*) führen. Patienten haben in der Kindheit leichte motorische Störungen und soziale Defizite sowie eine dickere Cortexschicht und eine erhöhte Astrozytendichte [Strauss *et al.*, 2006]. In einigen, aber nicht allen Fällen tritt beim Menschen durch Mutationen im *CNTNAP2*-Gen auch das Gilles de la Tourette Syndrom auf, das eine chronische neuropsychiatrische Erkrankung darstellt, die durch ungewollte Bewegungen und stimmliche Ticks gekennzeichnet ist [Belloso *et al.*, 2007, Verkerk *et al.*, 2003].

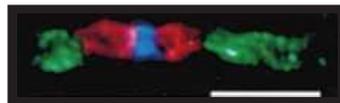


Abbildung 2.6: Immunhistochemische Färbung des Ranvierschen Schnürrings [Poliak *et al.*, 1999]

Schnitte von optischen Nerven von Ratten wurden mit Antikörpern gegen Natriumkanäle (blau), Caspr (rot) und Caspr2 (grün) gefärbt. Natriumkanäle markieren den Ranvierschen Schnürring, Caspr die paranodalen und Caspr2 die juxtapanodalen Regionen. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 5 µm.

2.5.4 Heterophile Interaktionen zwischen neuronalen Zelladhäsionsmolekülen

Wie bereits unter 2.5.1, 2.5.2 und 2.5.3 beschrieben wurde, führen neurale Zelladhäsionsmoleküle unzählige homo- und heterophile Interaktionen aus. Für die in der vorliegenden Dissertation relevanten Proteine L1, TAG-1, F3, Caspr und Caspr2 sind bereits einige Erkenntnisse über Interaktionen bekannt. Die funktionelle Bindung von CD24 an L1 wurde bereits unter 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben.

Eine funktionelle heterophile Interaktion von L1 mit TAG-1 wurde durch Kolo-kalisation der beiden Proteine in DRG-Neuronen [Kuhn *et al.*, 1991] und Koimmunpräzipitation von transfizierten Zellen

[Kunz *et al.*, 1998, Malhotra *et al.*, 1998] oder von DRG-Neuronen [Buchstaller *et al.*, 1996] gezeigt. Dabei interagieren die beiden Moleküle direkt in einem Tetramer aus zwei TAG-1- und zwei L1-Proteinen, wobei die extrazelluläre Domäne von TAG-1 hufeisenartig geformt ist und mittels seiner vier Ig-ähnlichen Domänen an L1 bindet [Kunz *et al.*, 1998]. Diese Interaktion ist beispielsweise für die Wegfindung von nocizeptiven Neuronen wichtig [Perrin *et al.*, 2001], indem es die Sensitivität gegenüber Semaphorin 3A beeinflusst und die Endozytose des Komplexes aus L1, Neuropilin-1 und Semaphorin 3A vermittelt [Law *et al.*, 2008].

L1 interagiert nicht nur mit TAG-1, sondern auch mit dem sehr ähnlichen Protein F3. Die Bindungsstelle für L1 befindet sich in den ersten beiden Ig-ähnlichen Domänen von F3 [Brümmendorf *et al.*, 1993]. Im Kleinhirn werden L1 und F3 von parallelen Fasern koexprimiert und Immunpräzipitationen konnten eine physiologische Assoziation der beiden Proteine im Kleinhirn zeigen. Da der Komplex zudem mit der Tyrosinkinase $p59^{Fyn}$ assoziiert ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Signaltransduktion von F3 über L1 und $p59^{Fyn}$ funktioniert [Olive *et al.*, 1995].

Wie der Name bereits verrät, ist Caspr (*Contactin-associated protein*) mit F3 assoziiert [Bonnon *et al.*, 2007, Faivre-Sarrailh *et al.*, 2000]. Dies spielt vor allem bei der Organisation der paranodalen Schleifen des Ranvierschen Schnürrings eine Rolle [Salzer, 2003, Rios *et al.*, 2000].

Für eine saltatorische Reizleitung auf myelinisierten Axonen sind diese hochorganisierten Strukturen äußerst wichtig, da sie die spannungsgesteuerten Natrium- und Kaliumkanäle in verschiedenen Domänen anhäufen. Natriumkanäle befinden sich in der zentralen Region der Ranvierschen Schnürringe, Kaliumkanäle hingegen in juxtaparanodalen Regionen, die voneinander durch die *Paranodes* getrennt werden [Salzer, 2003] (siehe Abbildung 2.7).

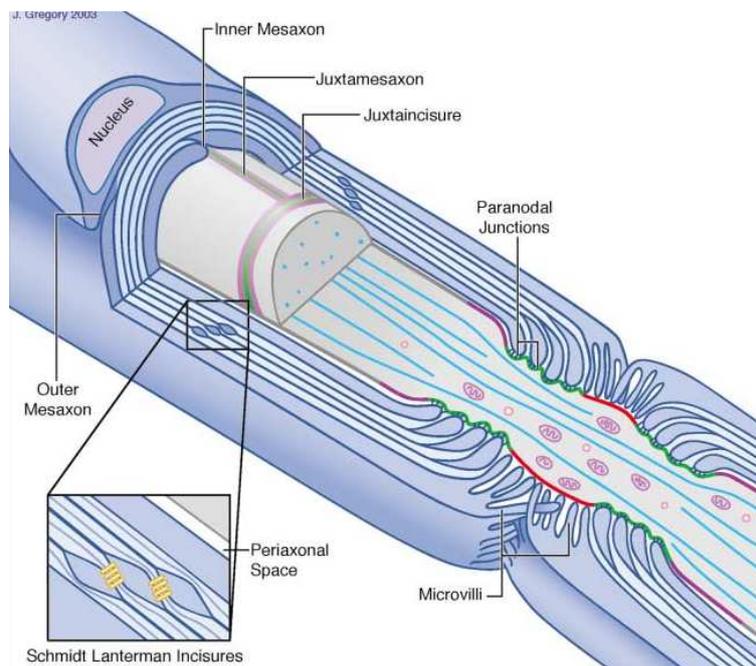


Abbildung 2.7: Schema der Morphologie des Ranvierschen Schnürrings [Salzer, 2003]

Dieses Bild zeigt schematisch die Organisation von myelinisierten peripheren Nerven am Querschnitt eines Axons (grau), das von zwei Myelinscheiden umschlossen wird. Der Ranviersche Schnürring ist rot markiert, die paranodale Region grün und die juxtaparanodale violett.

Diese Lokalisierung wird durch eine bestimmte Zusammensetzung von Membranproteinen und des Zytoskeletts vermittelt. Während der Myelinisierung ändern sich deshalb die Expressionsmuster

der Proteine, so dass postmitotisch exprimierte Proteine wie z.B. L1 weniger stark exprimiert, an der Myelinisierung beteiligte Proteine wie z.B. MAG hingegen verstärkt synthetisiert werden. Zur Abgrenzung der verschiedenen Regionen um die Ranvierschen Schnürringe bestehen sie aus unterschiedlichen Proteinen: die zentrale Region ist der Ort, an dem Aktionspotentiale generiert werden. Deshalb finden sich dort spannungsgesteuerte Natriumkanäle sowie in manchen Schnürringen des zentralen Nervensystems auch bestimmte Kaliumkanäle. Außerdem kommen hier IgSF-Mitglieder wie NrCAM und Neurofascin186 sowie teilweise F3 vor (siehe Abbildung 2.8(a)).

Der zentrale Schnürring wird auf beiden Seiten durch paranodale Regionen begrenzt, in denen Caspr und F3 auf neuronaler Seite mit Neurofascin155 in den Schleifen von Schwannzellen oder Oligodendrozyten interagieren [Salzer, 2003] (siehe Abbildung 2.8(b)). Caspr ist hierbei für die Lokalisierung von F3 in *Paranodes* verantwortlich, denn in Caspr-defizienten Mäusen ist F3 dort nicht zu finden [Bhat *et al.*, 2001]. Interessanterweise reguliert die Glykosylierung von F3 seine Bindung an Caspr. Nur F3 mit mannosereichen N-Glykanen ist mit Caspr und Neurofascin155 assoziiert, während F3, das komplexe N-Glykane trägt, nicht mit Caspr assoziiert ist und nicht an Neurofascin155 bindet [Bonnon *et al.*, 2007].

Angrenzend an die paranodalen Regionen charakterisieren Proteine wie TAG-1 und Caspr2 sowie Kaliumkanäle die juxtapanodalen Bereiche. TAG-1 interagiert hierbei sowohl in *cis* mit Caspr2 auf neuronaler Seite als auch in *trans* mit TAG-1 auf der glialen Membran [Poliak *et al.*, 2003, Traka *et al.*, 2003] (siehe Abbildung 2.8(c)).

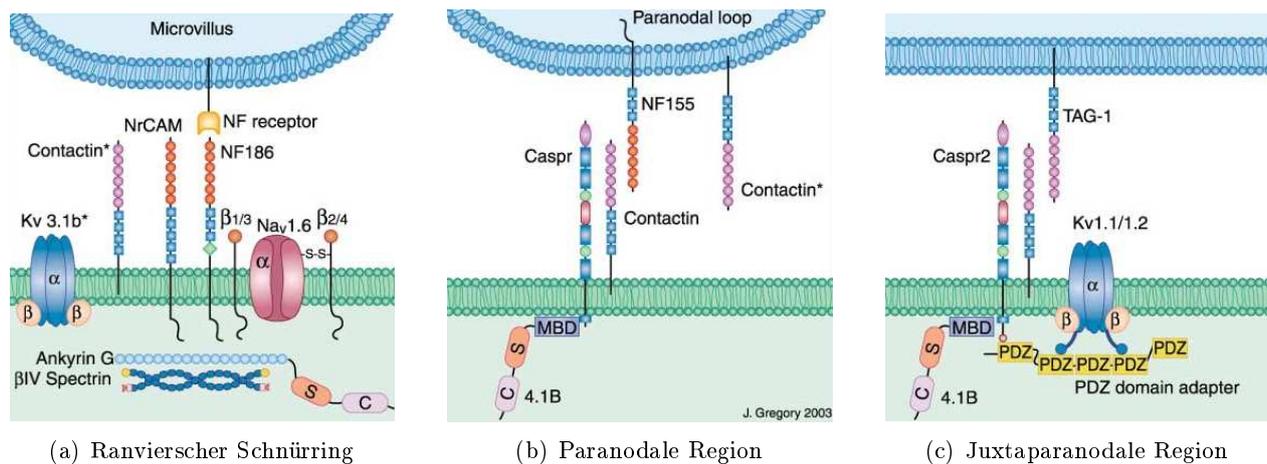


Abbildung 2.8: Molekulare Zusammensetzung der Domänen von myelinisierten Nervenfasern [Salzer, 2003]

Dargestellt sind die hauptsächlich in den entsprechenden Regionen vorhandenen axonalen Proteine und ihre glialen Rezeptoren. (a) Reife Ranviersche Schnürringe enthalten NrCAM, Neurofascin186 und einen trimeren Komplex aus Natriumkanaluntereinheiten. Neurofascin bindet in *trans* an Rezeptoren auf Schwanzell-Mikrovilli. (b) In der paranodalen Region befindet sich hauptsächlich ein axonaler *cis*-Komplex aus Caspr und F3 (Contactin), der an das Protein 4.1B sowie Neurofascin155 in der glialen Schleife bindet. (c) Juxtapanodale Regionen bestehen aus einem axonalen *cis*-Komplex aus Caspr2 und TAG-1, der an TAG-1 in der glialen Membran bindet und im Zytoplasma mit dem Protein 4.1B sowie über PDZ-Domänen mit Kaliumkanälen assoziiert ist.

3 Zielsetzung der Arbeit

Angesichts der komplexen Interaktionen zwischen den Zelladhäsionsmolekülen CD24, L1, TAG-1 und F3 ist es wichtig, ihre molekulare Basis und ihre funktionellen Konsequenzen zu untersuchen. Dabei ist im Auge zu behalten, dass alle diese Moleküle sowohl glykantragende Proteine als auch Rezeptoren für Glykane darstellen können.

Es ist bereits bekannt, dass für die funktionelle Bedeutung von CD24 im Neuritenwachstum die Glykane α 2,3-Sialinsäure und Lewis^x auf glialen CD24-Glykoformen verantwortlich sind, die mit neuronalen Rezeptoren interagieren. Die α 2,3-sialinsäureabhängige Interaktion von CD24 und L1 wurde bereits untersucht und bezüglich der Bindungsstelle und der funktionellen Relevanz charakterisiert. Auf der Suche nach neuronalen Rezeptoren für Lewis^x auf CD24, die möglicherweise in *cis* mit L1 interagieren, wurden die beiden GPI-verankerten Proteine TAG-1 und F3 als potenzielle Lewis^x-Rezeptoren identifiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation soll die funktionelle Rolle von Lewis^x im CD24-vermittelten Neuritenwachstum näher charakterisiert werden. Dabei stehen die neuronalen Rezeptoren, die für die Vermittlung der Signaltransduktionen von CD24 über Lewis^x verantwortlich sind, im Vordergrund. Die physiologische Bindung von TAG-1 und F3 an CD24 soll untersucht werden. Da CD24 Lewis^x-abhängig das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert, das von DRG-Neuronen jedoch inhibiert, ist es zudem wichtig herauszufinden, welche molekularen Unterschiede in diesen Neuronentypen zu diesen gegenteiligen Effekten von CD24 führen.

Da das Lewis^x-Glykan nicht nur für die Funktionen von CD24 wichtig ist, sondern auch in vielen weiteren medizinisch relevanten Prozessen eine große Rolle spielt, sollen in dieser Dissertation zudem organische Mimetika für Lewis^x gefunden werden, die sich für die Verwendung in der Forschung und für therapeutische Zwecke eignen.

4 Material

4.1 Lösungen und Puffer

1 x HBS	10 mM HEPES 150 mM NaCl pH 7,4
1 x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
1 x TBS	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,4
Agarosegel-Elektrophorese	
1,5 %-iges Agarosegel	1,5 % Agarose (w/v) in 1 x TAE-Puffer
5 x Probenpuffer	50 % Glycerin (v/v) 50 % TAE-Puffer (v/v) 1 Spatelspitze Orange G
50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 5,71 % Essigsäure (v/v) 50 mM EDTA pH 8,0
CD24-Aufreinigung	
Elutionspuffer C	50 mM Ethanolamin 150 mM NaCl 0,2 % CHAPS (w/v) pH 11,5
Homogenisierungspuffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM EDTA pH 7,4
Solubilisierungspuffer	10 mM HEPES 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 (v/v)

	0,1 mM PMSF pH 7,4
Waschpuffer A	10 mM HEPES 150 mM NaCl 2 % Triton X-100 (v/v) pH 7,4
Waschpuffer B	10 mM HEPES 500 mM NaCl 0,1 % Triton X-100 (v/v) pH 7,4

Genotypisierung von Mäusen

10 mM dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
10 x PCR-Puffer	200 mM Tris-HCl 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ pH 8,8
Proteinase-Lösung	50 mM Tris-HCl 50 mM KCl 2,5 mM Na ₂ EDTA 0,45 % NP-40 (v/v) 0,45 % Tween 20 (v/v) 0,1 mg/ml Proteinase K pH 8,0

Immunpräzipitation und *Pulldown*

Ammoniumsulfatlösung	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4
0,1 M Natriumphosphatpuffer	18 mM NaH ₂ PO ₄ 81 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Waschpuffer A	50 mM Tris-HCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ pH 7,5
Waschpuffer B	50 mM Tris-HCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂

	0,1 % Triton X-100 (v/v) pH 7,5
Waschpuffer C	50 mM Tris-HCl 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 1 % Triton X-100 (v/v) pH 7,5
Kopplung von Antikörpern an Sepharose	
Acetatwaschpuffer	100 mM Natriumacetat 500 mM NaCl pH 4,0
Blockierungspuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0
Kopplungspuffer	100 mM NaHCO ₃ 500 mM NaCl pH 8,3
Triswaschpuffer	100 mM Tris-HCl 500 mM NaCl pH 8,0
Primärzellkultur	
DNase-Lösung (DRG- und Motoneurone)	50 % Ham's F-12 (v/v) 50 % DMEM (v/v) 0,01 % DNase I (w/v)
DNase-Lösung (Hippocampusneurone)	1 x Neurobasal A-Medium 1 x B-27 Supplement 1 x GlutaMAX 0,05 % DNase I (w/v)
DNase-Lösung (Kleinhirnneurone)	1 x BME 0,05 % DNase I (w/v) 0,25 % Glukose (w/v)
DRG-Medium	50 % Ham's F-12 (v/v) 50 % DMEM (v/v) 50 µg/ml Transferrin 30 nM Natriumselenit 30 nM Trijodthyroxin 50 µg/ml Insulin 10 nM Hydrocortison 100 µM Putrescin 20 nM Progesteron 100 µg/ml BSA

4 Material

	2 % Penicillin/Streptomycin (v/v) 2 mM L-Glutamin 2 x B-27 Supplement 100 µg/ml NGF
Färbelösung	1 % Toluidinblau O (w/v) 1 % Methylenblau (w/v) 1 % Borax (w/v)
Hippocampus-Medium	1 x Neurobasal A-Medium 1 x B-27 Supplement 1 x GlutaMAX 2 ng/ml FGF
Kleinhirnmedium (X-1 Medium)	1 x BME 50 µg/ml Transferrin 5,4 TIU/mg Aprotinin 30 nM Natriumselenit 4 nM Trijodthyroxin 10 µg/ml Insulin 2 % Penicillin/Streptomycin (v/v) 0,1 % BSA (w/v) 1 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat
MES-Puffer für <i>Fluospheres</i>	50 mM MES pH 6,0
Motoneuron-Medium	50 % Ham's F-12 (v/v) 50 % DMEM (v/v) 5 µg/ml Transferrin 30 nM Natriumselenit 9 µg/ml Insulin 8 ng/ml Hydrocortison 29 µg/ml Putrescin 20 nM Progesteron 9 µg/ml BSA 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) 1 x B-27 Supplement
Papain/DNase-Lösung (Hippocampusneurone)	1 x Neurobasal A-Medium 1 x B-27 Supplement 1 x GlutaMAX 0,2 % Papain (w/v) 0,075 % DNase I (w/v)
0,9 % PBS für <i>Fluospheres</i>	50 mM Natriumphosphat (9 mM NaH ₂ PO ₄ , 40,5 mM Na ₂ HPO ₄) 0,9 % NaCl (w/v) pH 7,4
Trypsin/Collagenase-Lösung	50 % Ham's F-12 (v/v) 50 % DMEM (v/v)

	0,25 % Trypsin (w/v) 0,1 % Collagenase (w/v)
Trypsin/DNase-Lösung	1 x HBSS 1 % Trypsin (w/v) 0,1 % DNase I (w/v) 0,8 mM MgCl ₂ pH 7,8
SDS-PAGE	
Blockierungslösung	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM KH ₂ PO ₄ 0,05 % Tween 20 (v/v) 3 % Magermilchpulver (w/v) pH 7,4
Gelelutionspuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin pH 8,3
4 %-iges Sammelgel	1,84 ml dH ₂ O 313 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8 25 µl 10 % SDS (w/v) 332,5 µl 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (w/v) 12,5 µl 10 % APS (w/v) 2,5 µl TEMED
5 %-iges Sammelgel	1,45 ml dH ₂ O 313 µl 1 M Tris-HCl pH 6,8 25 µl 10 % SDS (w/v) 415 µl 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (w/v) 12,5 µl 10 % APS (w/v) 2,5 µl TEMED
1 x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v) pH 8,3
4 x SDS-Probenpuffer	320 mM Tris-HCl 8 % SDS (w/v) 40 % Glycerin (v/v) 10 mg/ml DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau pH 6,8
<i>Stripping</i> -Lösung	25 mM Glycin 1 % SDS (w/v) pH 2,2
1 x Transferpuffer	25 mM Tris-Base

	192 mM Glycin 20 % Methanol (v/v) pH 8,3
10 %-iges Trenngel	1,725 ml dH ₂ O 2,325 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8 62,5 µl 10 % SDS (w/v) 2,09 ml 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (w/v) 31,3 µl 10 % APS (w/v) 3,13 µl TEMED
12,5 %-iges Trenngel	1,375 ml dH ₂ O 2,325 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8 62,5 µl 10 % SDS (w/v) 2,52 ml 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (w/v) 31,3 µl 10 % APS (w/v) 3,13 µl TEMED
15 %-iges Trenngel	712 µl dH ₂ O 2,325 ml 1 M Tris-HCl pH 8,8 62,5 µl 10 % SDS (w/v) 3,13 ml 30 % Acrylamid/Bis-Lösung 29:1 (w/v) 31,3 µl 10 % APS (w/v) 3,13 µl TEMED
Waschpuffer (PBST)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM KH ₂ PO ₄ 0,05 % Tween 20 (v/v) pH 7,4
Silberfärbung	
Entwickler	3 % Na ₂ CO ₃ (w/v) 0,004 % Na ₂ S ₂ O ₃ (w/v) 0,027 % Formaldehyd (v/v)
Fixierlösung	30 % Methanol (v/v) 10 % Essigsäure (v/v)
Sensitivierungslösung	0,012 % Na ₂ S ₂ O ₃ (w/v)
Silberlösung	0,2 % AgNO ₃ (w/v) 0,027 % Formaldehyd (v/v)
Waschlösung	50 % Ethanol (v/v)

4.2 Chemikalien, Medien und sonstiges Material

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien bei Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Fluka/Riedel-de-Haen/Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) bestellt.

Acrylamid/Bis-Lösung	29:1, 30 % (w/v)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose	Elektrophoresegrad	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aprotinin	aus Rinderlunge	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
B-27 supplement	50 x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BCA-Lösungen	BCA <i>Protein Assay Reagent Kit</i> (Reagenzien A und B), Uptima	Interchim, Montlucon, Frankreich
BME	<i>Basal Medium Eagle</i> 1x	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau		Biomol GmbH, Hamburg
Chemilumineszentes Substrat	SuperSignal West Pico Substrat, Pierce	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	SuperSignal West Dura <i>Extended Duration</i> Substrat, Pierce	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , 4,5 g/l Glukose	PAA Laboratories GmbH, Marburg
DNA-Marker	<i>Quick Load</i> 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
dNTPs	je 100 mM	Bioline GmbH, Luckenwalde
EDAC	Ethyldimethylaminopropyl-carbodiimid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Einschlussmittel	Aqua Poly/Mount	Polysciences Inc., Warrington, USA
	DPX	Sigma-Aldrich GmbH, Fluka, Taufkirchen
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> , human, rekombinant	tebu-bio, Offenbach
Fluoreszierende <i>Beads</i>	<i>Fluospheres</i> , carboxylat-modifiziert, Crimson, Durchmesser 1 μm	Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
GlutaMAX	100 x	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Glutaraldehyd	25 %	Agar Scientific Ltd., Essex, England
Glykane	Lewis ^a , Dextra Laboratories LTD.	Mo Bi Tec, Göttingen
	Lewis ^x , Dextra Laboratories LTD.	Mo Bi Tec, Göttingen
Ham's F-12	ohne Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Marburg
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , 1 x, ohne Mg und Ca	PAA Laboratories GmbH, Marburg
Hybridoma SFM	serumfreies Medium	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Hybridomazelllinie 79	α CD24-Antikörper 79 produzierend, [Kadmon <i>et al.</i> , 1992]	Prof. Dr. Peter Altevogt, Heidelberg
Hydrocortison		Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Insulin	aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Laminin	Laminin-Nidogen Komplex	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
L-Glutamin	200 mM	PAA Laboratories GmbH, Marburg
Magnetische <i>Beads</i>	<i>Dynabeads</i> M-270 Epoxy, Dynal	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen
	MagnaBind Protein G <i>Beads</i> , Pierce	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
OPD	ImmunoPure, Pierce	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Optiprep- Gradientenlösung	60 % (w/v) Iodixanol in Wasser	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Organische Substanzen	potenziell Lewis ^x mimikrierend	ChemDiv Inc., San Diego, USA
Penicillin/ Streptomycin	100 x	PAA Laboratories GmbH, Marburg
Peptide	Lewis ^x -Peptid H-SACSRLNYLHC-OH	Schafer-N, Kopenhagen, Dänemark
	<i>scrambled</i> Lewis ^x -Peptid H-SACNHLRSYC-OH	Schafer-N, Kopenhagen, Dänemark
Peroxidasepuffer	<i>Stable Peroxide Substrate Buffer</i> 10 x, Pierce	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Poly-L-Lysin (PLL)	Hydrobromid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Poly-L-Ornithin (PLO)	0,01 %-ige Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Progesteron	synthetisch	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Proteinmarker	<i>Precision Plus Protein Standard All Blue</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Putrescin	Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640		PAA Laboratories GmbH, Marburg
Sepharose	CNBr-aktivierte Sepharose 4B, Amersham Biosciences	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
	Protein G Sepharose 4 <i>Fast Flow</i>	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Silikon für Nadelschale	Sylgard 182 Silicone Elastomer	Dow Corning Corporation, Wiesbaden
TEMED	Tetramethylethylendiamin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TMB	Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Transferrin	Holo, aus Rinderplasma	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt

4.3 Antikörper

4.3.1 Primäre Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Spezies	Klonalität	Quelle
Aktin	α Aktin	Kaninchen	pc	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Caspr	N-15, Kat.-Nr. sc-11174	Ziege	pc	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Caspr2	G-17, Kat.-Nr. sc-11179	Ziege	pc	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
CD24	79	Ratte	mc	selbst produziert [Kadmon <i>et al.</i> , 1992]

CHL1	α CHL1	Kaninchen	pc	Pineda Antikörper-Service, Berlin
F3	α human Contactin-1, Kat.-Nr. AF904	Ziege	pc	R&D Systems GmbH, Nordenstadt
	F3 Kaninchen	Kaninchen	pc	Labor Prof. Schachner, ZMNH
GAPDH	α GAPDH	Maus	mc	Chemicon International Inc., Schwalbach
HNK-1	412	Ratte	mc	InVivo BioTech Services GmbH, Hennigsdorf
L1	555	Ratte	mc	Gaby Loers, Labor Prof. Schachner, ZMNH
	α L1 poly	Kaninchen	pc	Pineda Antikörper-Service, Berlin
Lewis ^x	487, L5	Ratte	mc	Nainesh Katagihallimath, Labor Prof. Schachner, ZMNH
TAG-1	α human Contactin-2, Kat.-Nr. AF1714	Ziege	pc	R&D Systems GmbH, Nordenstadt
	TG3	Kaninchen	pc	Domna Karagogeos (siehe unten)

Der α TAG-1-Antikörper wurde freundlicherweise von Domna Karagogeos (*Institute of Molecular Biology and Biotechnology and University of Crete Medical School*, Kreta, Griechenland) zur Verfügung gestellt.

4.3.2 Kontrollantikörper

Als Kontrollen wurden unspezifische Antikörper (ChromPure IgG, *whole molecule*) aus Kaninchen (Kat.-Nr. 011-000-003), Ratte (Kat.-Nr. 012-000-003) und Ziege (Kat.-Nr. 005-000-003) verwendet. Die Antikörper wurden bei Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA bestellt.

4.3.3 Sekundäre Antikörper

Fluoreszenzmarkierte Sekundäntikörper wurden bei Dianova GmbH, Hamburg, HRP-konjugierte Sekundäntikörper bei Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA bestellt.

Fluoreszenzmarkierte Antikörper			
α Kaninchen	Esel		Cy2
α Ziege	Esel		Cy3
HRP-konjugierte Antikörper			
α Human	Ziege	IgG	H+L
α Kaninchen	Ziege	IgG	H+L

α Maus	Ziege	IgG + IgM	H+L
α Ratte	Ziege	IgG + IgM	H+L
α Ziege	Esel	IgG	H+L

4.4 Enzyme

Collagenase, Typ XI, aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
DNase I, Typ IV, aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
α 1-2-Fucosidase, aus <i>Xanthomonas manihotis</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
α 1-(3,4)-Fucosidase, aus <i>Xanthomonas manihotis</i>	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
N-Glycosidase F (PNGase F)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Papain, aus Papaya	Sigma-Aldrich GmbH, Fluka, Taufkirchen
Proteinase K, PCR-Grad, rekombinant	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phospholipase C, phosphoinositolphosphat- spezifisch (PIPLC)	Sigma-Aldrich GmbH, Fluka, Taufkirchen
Taq-Polymerase	Peggy Putthoff, Labor Prof. Schachner, ZMNH
Trypsin, für Zellkultur, aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich GmbH, Fluka, Taufkirchen
Trypsin, TPCK-behandelt, aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich GmbH, Fluka, Taufkirchen

4.5 Mäuse

TAG-1-defiziente Mäuse [Fukamauchi *et al.*, 2001] wurden freundlicherweise von Domna Karagogeos (*Institute of Molecular Biology and Biotechnology and University of Crete Medical School*, Heraklion, Kreta, Griechenland), F3-defiziente Mäuse [Berglund *et al.*, 1999] von Barbara Ranscht (*Burnham Institute for Medical Research*, La Jolla, Kalifornien, USA), Caspr-defiziente Mäuse [Bhat *et al.*, 2001] von Elijor Peles (*Weizmann Institute of Science*, Rehovot, Israel) und CD24-defiziente Mäuse [Wenger *et al.*, 1995] von Geneviève Chazal (*Centre National de la Recherche Scientifique*, Marseille, Frankreich) zur Verfügung gestellt. TAG-1-defiziente Mäuse wurden als homozygote Brutpaare gehalten, F3-, Caspr- und CD24-defiziente Mäuse als heterozygote Brutpaare. Für Experimente mit F3-, Caspr- und CD24-defizienten Mäusen wurden als Kontrollen stets die Wildtyp-Geschwister aus den gleichen Würfen verwendet, für alle anderen Experimente dienten Tiere des Stammes C57BL/6J

als Wildtyp-Mäuse. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bzw. in der Tierhaltung des ZMNH.

4.6 Oligonukleotide (*Primer*)

Die Oligonukleotide (*Primer*) 5'TAG, 3'TAG und 3'Neo wurden freundlicherweise von Domna Karageos (*Institute of Molecular Biology and Biotechnology and University of Crete Medical School*, Kreta, Griechenland) bereitgestellt. Alle anderen *Primer* wurden bei metabion international AG (Martinsried) bestellt.

<i>Primer</i> für die Genotypisierung von Axonin-Mäusen	
5'TAG	5'-GCT CTA CAG CCC AGG CAG TTC-3'
3'TAG	5'-CCT TGC CAC ATT GTG CTG TG-3'
3'Neo	5'-GAA GAC AAT AGC AGG CAT GC-3'
<i>Primer</i> für die Genotypisierung von Caspr-Mäusen	
NN2	5'-TTG GGT GGA GAG GCT ATT CGG CTA TG-3'
NN3	5'-CGC CCG TCG TGG CCA GCC ACG ATA GC-3'
Ex1-5	5'-GAG AGG GAA GGG TGG ATA AGG AC-3'
Ex1-3	5'-ATT GCG GAG CGC TGG GGA GAG G-3'
<i>Primer</i> für die Genotypisierung von CD24-Mäusen	
CD24ko1	5'-CCT AGG TCC GGT TGG ATG-3'
CD24ko2	5'-AAA GAC TTT GCC CCT CCT-3'
CD24_21F	5'-GCT TAG CAG ATC TCC ACT TAC CGA-3'
CD24_427R	5'-TTG GAC GGT GGA GGA TGG-3'
<i>Primer</i> für die Genotypisierung von Contactin-Mäusen	
ConFOR	5'-AGT GTC TGA GGA GGA CAA AGG ATT TGG-3'
ConREV	5'-GTG GGT GGA GAG CAT TAC TTG TAA ACT GG-3'
ConNeo	5'-GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG TTC-3'

4.7 Geräte und Ausstattung

Agarosegel-Elektrophorese		
Elektrophoresekammer	<i>Wide Mini-Sub Cell GT</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Dokumentation	E.A.S.Y. RH Imager	Herolab GmbH, Wiesloch
Chromatographie		
DNAPac-Säule	PA100	Dionex Corporation, Sunnyvale, USA
Glassäulen	5 bzw. 10 ml <i>Econo Column</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mono Q-Säule	HR 16/10	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Pumpe	<i>Econo Pump</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schreiber	<i>Econo Recorder 1327</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Detektor	<i>Econo UV Monitor</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ELISA und BCA-Test		
BCA-Platten	Mikrotiterplatten PS, nicht steril, unbehandelt	VWR International GmbH, Hannover
ELISA-Platten	96 well <i>Micro Well Polysorb</i>	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
	384 well <i>Polystyrene High Binding Microplate</i>	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
ELISA-Reader	<i>μQuant Microplate Spectrophotometer</i>	BioTek Instruments Inc., Vermont, USA
Filtration, Dialyse und Konzentration von Lösungen		
Dialyseschlauch	Servapor 8 - 10 kD, 66 mm Durchmesser	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Sterilfiltereinheiten	Rotrand 0,2 μm Celluloseacetat, Whatman Schleicher & Schuell	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Steritop	0,22 μm Express Plus	Millipore GmbH, Eschborn
Zentrifugaleinheiten	Vivaspin 6 bzw. 20, 10 bzw. 30 kD MWCO, Vivascience	VWR International GmbH, Hannover
	Microcon YM-30, 30 kD MWCO, Amicon Plastics	Millipore GmbH, Eschborn

<i>High Throughput Screening</i>		
Dispenser	<i>Easypense</i>	Tecan AG, Crailsheim
Mikrotiterplatten- <i>Reader</i>	Safire II	Tecan AG, Crailsheim
Mikrotiterplatten- Wascher	<i>Power Washer 384</i>	Tecan AG, Crailsheim
Pipettierroboter	<i>Sciclone ALH-3000</i>	Caliper Life Sciences, Hopkinton, USA
Software Clustering	SARNavigator Software	Tripos, München
Mikroskope		
Konfokales Mikroskop	Leica DM IRBE	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kontron	Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kontron-Kamera	AxioCam MRc 5	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Software konfokales Mikroskop	Leica Confocal Software V 2.61	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Software Neuritenwachstum	Axio Vision AxioVs40 V 4.6.1.0	Carl Zeiss AG, Oberkochen
SDS-PAGE und Westernblot		
Cellophan	<i>GelAir Cellophane Support</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese- und Blottingapparatur	<i>Mini Trans Blot Cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gelblottingpapier	MN 218 B	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Geleluter	<i>Mini Whole Gel Eluter</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geltrockenrahmen	<i>GelAir Drying Frame</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geltrockner	<i>GelAir Dryer</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Membran	Protran Nitrocellulose Transfermembran Whatman	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Röntgenfilme	Kodak BioMax Light Film	Sigma-Aldrich GmbH, Fluka, Taufkirchen
Schwämme	<i>Fiber Pads 8 x 11 cm</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Sonstiges		
Glasfilter	Borosilicat 3.3, 50 ml, Por. 4	Robu Glasfilter-Geräte GmbH, Hattert
Homogenisatoren	100 µl- bzw. 10 ml-Potter	Wheaton Science Products, New Jersey, USA
Parafilm	M Laborfilm	Alcan Packaging, Neenah, USA
PCR-Maschine	<i>Thermocycler</i> PTC-200 MJ Research	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße	0,5/1 bzw. 2 ml <i>Safe-Lock Tubes</i>	Eppendorf AG, Hamburg
	Cellstar 15 bzw. 50 ml PP Teströhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Vakuum- Gefriertrockner	Thermo Savant Micro Modulyo	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Verhaltensexperimente		
<i>Fear conditioning</i>	Kammer, Schockboden und <i>Power Supply</i>	Werkstatt des ZMNH
<i>Rotarod</i>	<i>Accelerating Rotarod for mice</i>	Jones & Roberts, TSE systems, Bad Homburg
Software zum Tracking von Mäusen	EthoVision	Noldus Information Technology GmbH, Wageningen, Niederlande
Aufnahme von Mausbewegungen	Mouse-E-Motion	Infra-e-motion, Henstedt-Ulzburg
Zellkultur		
Deckgläser	Glas, rund, 15 mm Durchmesser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Inkubatoren	Hera Cell 150 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	IR Autoflow CO ₂ <i>Water- Jacketed</i> Inkubator	NuAire Inc., Plymouth, USA
Kulturflaschen	Cellstar Standard Zellkultur Flasche 75 bzw. 175 mm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kulturplatten	Cellstar 6 bzw. 12 well Zellkultur Multiwell Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischalen	Cellstar Zellkultur Schale 94 x 16 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
	Zellkulturschale 40 x 10 mm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasachingen

Präparationsbesteck	div. Pinzetten und Scheren	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Zählkammer	Neubauer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zentrifugen		
Falcon-Zentrifuge	5804 R	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge	XL-80	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Ultrazentrifugen- Rotor	SW 32Ti	Beckman Coulter Inc., Krefeld
Ultrazentrifugen- Einsätze	Polyallomer Zentrifugenröhrchen 16 x 102 bzw. 25 x 89 mm	Beckman Coulter Inc., Krefeld

5 Methoden

5.1 Biochemische Methoden

5.1.1 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) können Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Proteine haben viele Eigenschaften, wie z. B. Primärsequenz, Ladung, Aggregation und Größe, aber um sie ausschließlich nach ihrer Größe auftrennen zu können, werden sie zunächst durch Aufkochen mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Hitze zerstört dabei Aggregationen, reduzierende Agenzien wie DTT brechen Disulfidbrücken auf und zerstören so die Form der Proteine, während sich SDS unabhängig von der Aminosäuresequenz in Proteine einlagert. Diese Einlagerung hängt ausschließlich von der Länge der Proteine ab. Aufgrund der in Lösung negativen Ladung von SDS und der hohen Menge an eingelagertem SDS pro Protein überlagert SDS die Eigenladung der Proteine. Proteine sind dadurch stärker geladen, je größer sie sind. So lassen sie sich im Polyacrylamidgel durch Spannung der Größe nach auftrennen.

Außerdem besteht ein Polyacrylamidgel aus einem Sammel- und einem Trenngel. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proben auf eine Front. Es besteht aus einem 4 bis 5 %-igen Polyacrylamidgel und hat einen pH-Wert von 6,8. Im sich anschließenden Trenngel (10 bis 15 % Polyacrylamid, pH 8,8) laufen die Proteine je nach Größe, d. h. Stärke der Ladung, schneller oder langsamer durch das Gel und werden so aufgetrennt.

Die zu analysierenden Proteinproben werden zunächst mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 100°C gekocht und neben einem Proteinmarker (*Precision Plus Protein Standard All Blue*, Bio-Rad Laboratories GmbH) auf das Gel aufgetragen, das in die Elektrophorese-Kammer (Mini Trans Blot Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH) eingebaut wurde. Die Elektrophorese erfolgt in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) bei zunächst 80 V für die Fokussierung der Proteine im Sammelgel und anschließend 130 V für die Auftrennung im Trenngel.

Nach der Elektrophorese können die aufgetrennten Proteine direkt mittels Silberfärbung (siehe 5.1.1.1) im Gel angefärbt oder elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden (Westernblot, siehe 5.1.1.2). Nach dem Westernblot erfolgt der Nachweis der Proteine durch proteinspezifische Antikörper. Diese Antikörper können bei Bedarf wieder von der Membran entfernt werden (*Stripping*, siehe 5.1.1.3), so dass sie für neue Detektionen verwendet werden kann.

5.1.1.1 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glutamin-, Asparagin- und Cystein-Resten von Proteinen. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag.

Für die Silberfärbung werden die Proteine nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 5.1.1) zunächst durch Einlegen des Gels für mindestens 45 min in Fixierlösung (30 % Methanol, 10 % Essigsäure) fixiert. Anschließend wird das Gel für 20 min in 50 % Ethanol gewaschen. Zur Sensitivierung folgt eine Inkubation für 1 min in 0,012 % Natriumthiosulfat. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 3 min mit dH_2O wird das Gel in Silberlösung (0,2 % Silbernitrat, 0,027 % Formaldehyd) gefärbt und wiederum zweimal für jeweils 20 s mit dH_2O gewaschen. Das Gel wird solange in Entwickler (3 % Natriumcarbonat, 0,004 % Natriumthiosulfat, 0,018 % Formaldehyd) geschwenkt, bis die gewünschte

Färbung erreicht ist. Zum Abstoppen der Färbereaktion wird das Gel wieder für mindestens 1 Stunde in Fixierlösung gelegt. Zur langfristigen Aufbewahrung kann das Gel danach mit dH₂O gewaschen und anschließend mit Hilfe eines Geltrockenrahmens (*GelAir Drying Frame*, Bio-Rad Laboratories GmbH) zwischen zwei Cellophanfolien (*GelAir Cellophane Support*, Bio-Rad Laboratories GmbH) gelegt und in einem Geltrockner (*GelAir Dryer*, Bio-Rad Laboratories GmbH) getrocknet werden.

5.1.1.2 Westernblot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen werden diese nach SDS-PAGE (siehe 5.1.1) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Westernblot). Dazu werden *Mini Trans Blot Cell* Apparaturen (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet. Das Transfersandwich aus einem Schwamm, zwei Gelblottingpapieren (MN 218 B, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG), dem Gel, einer Nitrocellulosemembran (Protran Nitrocellulose Transfermembran Whatman, GE Healthcare Europe GmbH) sowie wiederum zwei Blottingpapieren und einem Schwamm wird in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) zusammengebaut, in die mit Transferpuffer gefüllte Blotapparatur eingesetzt und mit Eiskühlung versehen. Der Transfer erfolgt bei 80 V für 2,5 Stunden im 4°C-Raum.

Anschließend wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (3 % Magermilchpulver in 0,05 % PBST) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgt bei 4°C über Nacht die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in Blockierungslösung verdünnt wird. Die Tabelle 5.1 fasst die verwendeten Primärantikörper sowie die dafür optimalen Verdünnungen bzw. Konzentrationen zusammen. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wird die Membran dann fünfmal für jeweils 5 min in 0,05 % PBST gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Primärantikörper werden HRP-gekoppelte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:10000 in Blockierungslösung verwendet, mit denen die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wird. Nach weiteren fünf Waschschritten für jeweils 5 min in 0,05 % PBST wird die Membran nach Herstellerangaben mit chemilumineszentem Substrat (SuperSignal West Pico Substrat bzw. SuperSignal West Dura *Extended Duration* Substrat, Pierce) versetzt und zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Filmkassette gelegt. Durch Auflegen von Röntgenfilmen (Kodak BioMax Light Film, Sigma-Aldrich GmbH) und deren Entwicklung erfolgt die Auswertung.

5.1.1.3 Stripping

Um eine Nitrocellulosemembran, auf der Proteine nach SDS-PAGE (siehe 5.1.1) und Westernblot (siehe 5.1.1.2) immunologisch nachgewiesen worden sind, erneut für eine Detektion mit anderen Primärantikörpern zu verwenden, können Antikörper von der Membran auch wieder entfernt werden (*Stripping*). Dazu wird die Membran zunächst zweimal für jeweils 5 min in 0,05 % PBST gewaschen und anschließend zweimal für 10 min in *Stripping*-Lösung (25 mM Glycin, 1 % SDS, pH 2,2) inkubiert. Zur Neutralisierung folgen zwei weitere Waschschriffe für jeweils 5 min in 0,05 % PBST. Nach Blockierung in 3 % Magermilchpulver in 0,05 % PBST für 30 min bei Raumtemperatur kann eine erneute Inkubation mit einem Primärantikörper und dessen Detektion wie unter 5.1.1.2 beschrieben erfolgen.

5.1.2 Abschätzung von Proteinkonzentrationen

Der BCA-Test wird verwendet, um Proteinkonzentrationen abzuschätzen. Er beruht auf der Reduktion von Kupferionen durch bestimmte Aminosäuren und der darauffolgenden Bildung eines violetten Farbkomplexes aus Cu⁺-Ionen mit Bicinchonininsäure (BCA).

Antigen	Bezeichnung	Spezies	Verdünnung bzw. Konzentration
Aktin	α Aktin	Kaninchen	1:2000
CD24	79	Ratte	0,25 μ g/ml
CHL1	α CHL1	Kaninchen	1:10000
F3	α human Contactin-1	Ziege	1:1000
HNK-1	412	Ratte	1:5000
L1	555	Ratte	10 μ g/ml
	α L1 poly	Kaninchen	1:5000
Lewis ^x	487, L5	Ratte	1:6000
TAG-1	α human Contactin-2	Ziege	1:1000
	TG3	Kaninchen	1:5000

Tabelle 5.1: Verwendete Primärantikörper für Westernblots

Unter Verwendung des *BCA Protein Assay Reagent Kit* (Uptima, Interchim) wird die BCA-Lösung hergestellt, indem die Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 gemischt werden. In 96 well-Mikrotiterplatten (PS, nicht steril, unbehandelt, VWR International GmbH) werden jeweils 10 μ l der zu bestimmenden Probe (bzw. Verdünnungen davon) mit 200 μ l BCA-Lösung gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Neben den Proben wird auch eine Standardreihe aus BSA verwendet, um Vergleichswerte für 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 und 1000 μ g/ml BSA zu erhalten. Nach der Inkubation wird die Extinktion bei 560 nm im *ELISA-Reader* gemessen. Durch lineare Regression der Standardreihe wird eine Funktion zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen der Proben erstellt.

Zu beachten ist hier, dass sich CD24-Konzentrationen nicht mit dieser Methode bestimmen lassen, da im kurzen CD24-Peptid keine Aminosäuren vorhanden sind, die mit Kupferionen reagieren. Trotzdem wurden Proteinkonzentrationen von CD24-Proben bestimmt und diese als Grundlage zur Schätzung der vorliegenden CD24-Menge verwendet, da der Anteil von CD24 am Gesamtprotein immer in etwa konstant ist. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass stets gleiche Mengen CD24 eingesetzt werden.

5.1.3 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers 79

Zur Produktion und Aufreinigung des monoklonalen α CD24-Antikörpers 79 werden Hybridomazellen [Kadmon *et al.*, 1992], die den Antikörper ins Zellkulturmedium abgeben, wie in Abschnitt 5.2.3 beschrieben kultiviert. Der Kulturüberstand wird gesammelt. Anschließend kann der Antikörper mittels einer Protein G Sepharose-Säule chromatographisch daraus isoliert werden.

Dazu wird eine 5 ml-Glassäule (*Econo Column*, Bio-Rad Laboratories GmbH) mit 2,5 ml Protein G Sepharose 4 *Fast Flow* (GE Healthcare Europe GmbH) gepackt, an ein Pumpensystem (*Econo Pump*, Bio-Rad Laboratories GmbH) angeschlossen und die Matrix zunächst bei einem Fluss von 0,35 ml/min mit ca. 20 ml PBS gewaschen. Etwa 2 Liter des gesammelten, antikörperenthaltenden Hybridomazellkulturüberstands (siehe 5.2.3) werden aufgetaut und mit einem Steritop-Sterilfilter filtriert, um enthaltene Zellbestandteile zu entfernen. Zur Vermeidung von Kontaminationen während des Säulenlaufs werden außerdem 0,01 % Natriumazid zugesetzt. Dann wird die Protein G-Säule mit

der Antikörperlösung beladen, indem diese mit einem Fluss von 0,33 ml/min kontinuierlich für 2 bis 3 Tage über die Säule gegeben wird.

Vor der Elution wird die Säule gründlich bei einem Fluss von 0,4 ml/min mit 20 bis 30 ml PBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Kurz vor Ende des Waschschrilles werden der UV-Detektor (*Econo UV Monitor*, Bio-Rad Laboratories GmbH) und der Schreiber (*Econo Recorder 1327*, Bio-Rad Laboratories GmbH) an die Säulenpumpe angeschlossen (0,5 AUFS, 500 mV, 6 cm/h). Das Waschen erfolgt so lange, bis sich die Absorption nicht mehr verringert, d. h. die horizontale Basislinie des Chromatogramms zu sehen ist. Die Elution erfolgt bei einem Fluss von 0,3 ml/min mit 0,1 M Glycin pH 2,7. Entsprechend des Elutionspeaks im Chromatogramm wird das Eluat gesammelt und anschließend mit einem Zehntel des Eluatvolumens 1 M Tris-HCl pH 8,8 neutralisiert. Die Säule wird danach mit etwa 15 ml PBS gewaschen, bevor sie erneut mit dem Durchfluss des Säulenlaufs mit Antikörperlösung beladen wird. Um die Aufreinigungseffizienz zu erhöhen, wird der Hybridomazellkulturüberstand auf diese Weise mehrmals aufgereinigt, bis darin kein Antikörper mehr nachweisbar ist.

Schließlich werden die Antikörper-Eluate mit Hilfe eines Vivaspin-Konzentrators (30 kD Ausschlussgröße, 20 ml Volumen, Vivascience) bei 3000 x g und 4°C auf PBS umgepuffert und auf ca. 1 ml pro Eluat eingengt.

5.1.4 Aufreinigung von CD24 aus Maushirn

Zur Aufreinigung von murinem neuronalen CD24 werden zunächst Maushirne homogenisiert, um eine grobe Membranfraktion herzustellen und Membranproteine daraus mittels Detergenz zu solubilisieren. Aus diesen Solubilisierungen wird CD24 chromatographisch mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 79 isoliert, die Eluate werden anschließend umgepuffert und konzentriert.

Pro Aufreinigung werden 60 bis 80 gefrorene Hirne von 5 bis 8 Tage alten (P5 - P8) Wildtyp-Mäusen benötigt. Diese werden mit einem 10 ml-Glashomogenisator (Wheaton Science Products) in 1 mM EDTA in PBS homogenisiert und ergeben etwa 80 ml Homogenat. Um zunächst Zellkern- und unhomogenisierte Bestandteile zu entfernen, wird das Homogenat in 50 ml-Röhrchen für 30 min bei 3000 x g und 4°C (langsame Bremsgeschwindigkeit) abzentrifugiert. Aus dem Überstand wird durch Zentrifugation für 1 Stunde bei 100000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge (XL-80, Rotor SW 32Ti, schwarze Einsätze, Polyallomer Zentrifugenröhrchen 25x89 mm, Beckman Coulter Inc.) eine grobe Membranfraktion erstellt. Das so erhaltene Pellet dient als Ausgangsmaterial für die Solubilisierung der Membranproteine und wird dazu mit Hilfe des Glashomogenisators in 16 ml Solubilisierungspuffer (1x HBS, 1% Triton-X 100, 0,1 mM PMSF, pH 7,4) resuspendiert.

Um eine vollständige Solubilisierung von CD24 zu erhalten, werden mehrere Solubilisierungsschritte bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, wobei man sich hier die Hitzestabilität von CD24 zunutze machen kann. Im ersten Schritt wird die resuspendierte Membranfraktion für etwa 2,5 Stunden bei 37°C auf einem Rotor inkubiert und anschließend für 1 Stunde bei 100000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge (XL-80, Rotor SW 32Ti, rote Einsätze, Polyallomer Zentrifugenröhrchen 16x102 mm, Beckman Coulter Inc.) pelletiert. Der so erhaltene Überstand ist die erste Solubilisierung und wird bei -20°C gelagert, bis die restlichen Überstände ebenfalls gesammelt wurden. Da das 100000 x g-Pellet nach der ersten Solubilisierung stets noch größere Mengen CD24 enthält, wird es wiederum in 10 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert und es folgen die zweite Solubilisierung bei 37°C über Nacht, sowie die dritte für 30 min bei 95°C. Dazwischen wird das Material wie oben beschrieben ultrazentrifugiert, der Überstand gesammelt und das Pellet weiterverwendet.

Eine Überprüfung aller so erhaltenen Fraktionen auf den CD24-Gehalt mittels SDS-PAGE (siehe 5.1.1) und Westernblot (siehe 5.1.1.2) gibt Aufschluss darüber, ob weitere Solubilisierungen von CD24 möglich bzw. nötig sind.

Für die Immunaффinitätschromatographie wird der α CD24-Antikörper 79 (Aufreinigung siehe 5.1.3) an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (siehe 5.1.5.1) und für die Chromatographie wie unter 5.1.5.2 beschrieben verwendet. Der Durchfluss des Säulenlaufs mit CD24-Solubilisierungen wird auf diese Weise mehrmals aufgereinigt, bis darin kein CD24 mehr nachweisbar ist. Die CD24-Eluate werden schließlich mit Hilfe eines Vivaspin-Konzentrators (5 kD Ausschlussgröße, 20 ml Volumen, Vivascience) bei 5000 x g und 4°C auf TBS umgepuffert und auf ca. 1 ml pro Eluat eingengt.

Bei dieser Art der Aufreinigung von CD24 ist zu beachten, dass die erhaltenen Eluate stets etwas α CD24-Antikörper enthalten, der während der Säulenelution mit ins Eluat gelangt. Soll die Aufreinigung für spezielle Anwendungen antikörperfrei sein, kann ein tryptischer Verdau (siehe 5.1.8) angeschlossen werden, bei dem zwar der Antikörper verdaut wird, das CD24-Protein jedoch unbeeinträchtigt bleibt, da sich keine Schnittstellen für Trypsin in diesem Molekül befinden.

5.1.5 Immunaффinitätschromatographie

5.1.5.1 Kopplung der Antikörper an Sepharosematrix

Zur chromatographischen Aufreinigung von CD24 aus solubilierten Membranproteinen (siehe 5.1.4) werden 10 mg α CD24-Antikörper (79) (Aufreinigung siehe 5.1.3) an 2 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH) gekoppelt. Bei den Versuchen, CD24-Glykoformen chromatographisch voneinander zu trennen, werden 3 mg α HNK-1 oder 3 mg α Lewis^x an jeweils 1 g CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt.

Pro Gramm Sepharose werden 40 ml 1 mM HCl verwendet, um die Matrix darin für einige Minuten quellen zu lassen. Mit Hilfe eines Glasfilters (Borosilicat 3.3, 50 ml, Por. 4, Robu Glasfilter-Geräte GmbH) und einer Vakuum-Wasserstrahlpumpe wird die gequollene Sepharose anschließend mit etwa 400 ml 1 mM HCl gewaschen, dann in 15 ml-Röhrchen umgefüllt und bei 300 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Gelvolumen beträgt dann ca. 3,5 ml pro Gramm Sepharose. Vor der Kopplung wird die Sepharose noch einmal mit 5 ml Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3) gewaschen, d. h. sie wird darin solange geschwenkt, bis sie sich vollständig verteilt hat und anschließend bei 300 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert, so dass der Puffer vorsichtig abpipettiert werden kann.

Zur Kopplung werden die Antikörper in 5 ml Kopplungspuffer pro Gramm Sepharose aufgenommen, mit der gewaschenen Sepharose gemischt und damit über Nacht bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Anschließend wird die Sepharose wie oben beschrieben abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Matrix wird zweimal wie beschrieben mit je 10 ml Kopplungspuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Blockierung noch freier Bindungsstellen der Sepharose folgt eine Inkubation mit 10 ml Blockierungspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0) für 2,5 Stunden bei 4°C. Schließlich wird die Matrix regeneriert, indem sie abwechselnd je viermal mit je 10 ml Acetat- (100 mM Natriumacetat, 500 mM NaCl, pH 4,0) und Triswaschpuffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen wird. Danach folgt ein Waschschrift mit 10 ml PBS, bevor die mit Antikörper gekoppelte Sepharosematrix in 0,01 % NaN₃ in PBS bei 4°C aufbewahrt oder zur Chromatographie (siehe 5.1.5.2) verwendet werden kann.

5.1.5.2 Chromatographie

Für die Immunaффinitätschromatographie wird eine 10 ml Glassäule (*Econo Column*, Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet, die mit Antikörper-gekoppelter Sepharosematrix (siehe 5.1.5.1) gepackt und an ein Pumpensystem (*Econo Pump*, Bio-Rad Laboratories GmbH) angeschlossen wird. Dann wird die Matrix zunächst bei einem Fluss von 0,35 ml/min mit etwa 20 ml PBS gewaschen.

Zeit	Pufferzusammensetzung
0 bis 10 min	100 % Puffer A
10 bis 50 min	linearer Gradient von 100 % Puffer A zu 100 % Puffer B
50 bis 75 min	100 % Puffer B
75 bis 80 min	linearer Gradient von 100 % Puffer B zu 100 % Puffer A

Tabelle 5.2: Gradientenverlauf für die Anionenaustauschchromatographie

Anschließend wird die Säule mit der entsprechenden Proteinlösung beladen. Zur chromatographischen Aufreinigung von CD24 aus Maushirn mittels α CD24-Antikörper werden die CD24-enthaltenen Solubilisierungen von Membranproteinen (siehe 5.1.4) verwendet. Für die Versuche, CD24-Glykoformen chromatographisch voneinander zu trennen, wird bereits chromatographisch aufgereinigtes Gesamt-CD24 eingesetzt. Bei einem Fluss von 0,2 ml/min wird die Proteinlösung kontinuierlich für 2 bis 3 Tage über die Säule gegeben.

Vor der Elution wird die Säule gründlich gewaschen um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Bei einer Flussrate von 0,35 ml/min wird zuerst mit 15 ml Waschpuffer A (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 % Triton X-100, pH 7,4), dann mit 15 ml Waschpuffer B (10 mM HEPES, 500 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, pH 7,4) und schließlich mit 20 bis 30 ml HBS gewaschen. Während des HBS-Waschschrilles werden der UV-Detektor (*Econo UV Monitor*, Bio-Rad Laboratories GmbH) und der Schreiber (*Econo Recorder 1327*, Bio-Rad Laboratories GmbH) an die Säulenpumpe angeschlossen (0,5 AUFS, 500 mV, 6 cm/h). Das Waschen erfolgt so lange, bis sich die Absorption nicht mehr verringert, d. h. die horizontale Basislinie des Chromatogramms zu sehen ist. Die Elution erfolgt bei einer Flussrate von 0,3 ml/min mit Elutionspuffer C (10 mM Ethanolamin, 150 mM NaCl, 0,2 % CHAPS, pH 11,5). Entsprechend des Elutionspeaks im Chromatogramm wird das Eluat gesammelt und anschließend mit einem Drittel des Eluatvolumens 1 M Tris-HCl pH 6,8 neutralisiert. Die Säule wird danach mit etwa 15 ml HBS bei 0,35 ml/min gewaschen, bevor sie erneut mit dem Durchfluss des Säulenlaufs beladen wird. Um die Aufreinigungseffizienz zu erhöhen, wird der Durchfluss des Säulenlaufs mit CD24-Solubilisierung auf diese Weise mehrmals aufgereinigt, bis darin kein CD24 mehr nachweisbar ist.

5.1.6 Anionenaustauschchromatographie

Eine theoretisch mögliche Methode, um CD24-Glykoformen voneinander zu trennen, ist die Anionenaustauschchromatographie. Dabei werden Proteine mit negativen Ladungen unterschiedlich stark gebunden. Durch Elution mittels eines Salzgradienten werden Proteine mit geringerer Ladung zuerst eluiert. Da die verschiedenen CD24-Glykoformen aufgrund unterschiedlicher Glykane möglicherweise unterschiedlich starke negative Ladungen tragen, ist es theoretisch möglich, sie auf diese Weise voneinander zu trennen. Hier werden zwei verschiedene Säulen getestet: die Mono Q-Säule (HR 16/10, GE Healthcare Europe GmbH) und die DNAPac-Säule (PA100, Dionex Corporation).

Auf jede Säule werden 100 μ l aufgereinigtes (siehe 5.1.4) und anschließend tryptisch verdautes (siehe 5.1.8) CD24 injiziert. Um die beiden Säulen in ihrem Trennungsvermögen zu vergleichen, werden bei einer Flussrate von 1 ml/min die gleichen Puffer (Puffer A: dH₂O, Puffer B: 2 M Ammoniumacetat) und der in Tabelle 5.2 dargestellte Gradient verwendet, der durch die Mischung von Puffer A und Puffer B erzeugt wird.

Dabei werden 1,5 ml-Fractionen gesammelt. Da CD24 aufgrund seines kurzen Peptidrückgrats, das keine aromatischen Aminosäuren aufweist, nicht mit Hilfe eines UV-Detektors nachweisbar ist,

werden alle Fraktionen im ELISA (siehe 5.1.13) getestet, um ein ungefähres Chromatogramm zu erhalten.

Leider erwies sich keine der beiden Säulen für die Trennung der CD24-Glykoformen geeignet.

5.1.7 Gelelution

Neben der Anionenaustauschchromatographie ist die Gelelution eine weitere, theoretisch mögliche Methode zur Trennung von CD24-Glykoformen. Bei der Gelelution werden Proteine präparativ elektroeluiert, die zunächst über eine SDS-PAGE (siehe 5.1.1) elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Hier wird der *Mini Whole Gel Eluter* (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet, mit dem 14 horizontale Fraktionen gesammelt werden können. Zunächst wird aufgereinigtes CD24 (siehe 5.1.4) unbehandelt oder nach N-Deglykosylierung (siehe 5.1.9) auf ein 1,5 mm dickes SDS-Gel (5 % Sammelgel, 15% Trenngel) mit einer großen Tasche aufgetragen und wie unter 5.1.1 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel für 15 min bei Raumtemperatur in Gelelutionspuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, pH 8,3) äquilibriert, bevor es nach Herstellerangaben in den Geleluter eingebaut wird. Die Gelelution wird für 30 min bei konstanten 100 mA durchgeführt. Um die eluierten Proteine dann von der Zellulosemembran zurück in den Puffer der Fraktionskammern zu transferieren, wird die Polarität der Stromquelle für 15 Sekunden geändert. Mittels langer Pipettenspitzen erfolgt schließlich eine manuelle Entnahme der Elutionsfraktionen.

Die Fraktionen werden einzeln mittels SDS-PAGE (siehe 5.1.1) und Westernblot (siehe 5.1.1.2) auf ihren CD24-Gehalt überprüft. Außerdem wird die Effizienz der Gelelution überprüft, indem nach der Elution im SDS-Gel verbliebene Proteine durch Silberfärbung angefärbt werden.

Leider erwies sich die Gelelution nicht als geeignete Methode zur Trennung der CD24-Glykoformen.

5.1.8 Tryptischer Verdau

In CD24-Aufreinigungen sind stets auch geringe Mengen α CD24-Antikörper sowie einige andere Proteine enthalten. Für einige Anwendungen ist es allerdings notwendig, diese zu entfernen. Eine effiziente Methode ist hierbei der Verdau mit Trypsin, da diese Protease Peptidbindungen an Arginin und Lysin schneidet. Diese beiden Aminosäuren sind allerdings im kurzen CD24-Peptid nicht vorhanden. Auf diese Weise können alle anderen Proteine, unter anderem auch Antikörper, vom unverdauten CD24 entfernt werden.

Zunächst wird aufgereinigtes CD24 (siehe 5.1.4, etwa 1 mg Gesamtproteinmenge) mit flüssigem Stickstoff eingefroren und im Vakuum-Gefriertrockner (Thermo Savant Micro Modulyo, Thermo Fisher Scientific Inc.) lyophilisiert. Nach etwa 12 Stunden ist sämtlicher Puffer verdampft. Vor dem tryptischen Verdau müssen die Proteine zunächst reduziert und alkyliert werden. Dazu wird die lyophilisierte CD24-Probe in 5 ml 4 M Harnstoff in PBS aufgenommen, mit 10 mM DTT versetzt und für zwei Stunden bei 37°C auf einem Rotor inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 55 mM Jodacetamid und eine weitere Inkubation für zwei Stunden bei 37°C auf einem Rotor.

Zum Pufferwechsel folgt eine Dialyse gegen 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat. Die reduzierte und alkylierte CD24-Probe wird dazu in einen Dialyseschlauch (Servapor 8 - 10 kD, 66 mm Durchmesser, Serva Electrophoresis GmbH) gefüllt und dieser für insgesamt 24 Stunden in jeweils 2 l des Ammoniumhydrogencarbonatpuffers gegeben. Dabei wird sechsmal der Puffer gewechselt, so dass insgesamt 14 l Dialysepuffer verwendet werden. Die dialysierte CD24-Lösung kann anschließend aus dem Schlauch entnommen werden und ist bereit für den tryptischen Verdau.

TPCK-behandeltes Trypsin (Sigma-Aldrich GmbH) wird im Enzym/Substrat-Verhältnis 1:40 zugegeben. Bei 1 mg Gesamtprotein entspricht das 25 μ g Trypsin. Der Verdau wird für 24 Stunden bei 37°C auf einem Rotor durchgeführt und anschließend durch Zugabe von PMSF gestoppt. Um nach dem Verdau sämtliche kleinen Peptidfragmente zu entfernen und reines CD24 zu erhalten, folgt

eine weitere Dialyse gegen 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat wie oben beschrieben. Schließlich kann die reine CD24-Lösung mit Hilfe eines Vivaspin-Konzentrators (10 kD Ausschlussgröße, 6 ml Volumen, Vivascience) bei 3000 x g und 4°C auf das gewünschte Volumen eingengt werden.

5.1.9 N-Deglykosylierung

Zur Entfernung N-verknüpfter Glykane von CD24 wird ein N-deglykosidischer Verdau mit PNGase F durchgeführt. Dazu werden etwa 20 µg aufgereinigtes CD24 (siehe 5.1.4) mit 1% SDS versetzt und zur Vordenaturierung für 5 min bei 95°C inkubiert. Für den Verdau werden anschließend 0,57% CHAPS, 11,4 mM Natriumphosphatpuffer sowie 4 u PNGaseF (Roche Diagnostics GmbH) zugesetzt und alles über Nacht bei 37°C inkubiert. Die N-deglykosylierte CD24-Probe wird dann direkt mittels SDS-PAGE (siehe 5.1.1) und Westernblot (siehe 5.1.1.2) analysiert bzw. für die Gelelektion (siehe 5.1.7) verwendet.

5.1.10 Phospholipase C-Verdau

Die Phospholipase C (PIPLC) ist ein Enzym, das phosphatidylinositolspezifisch im GPI-Anker schneidet. Um zu testen, ob sich das GPI-verankerte Protein CD24 durch PIPLC-Verdau von Zellmembranen solubilisieren lässt, wird wie unter 5.1.4 beschrieben eine Membranfraktion aus Maushirnen erstellt. Dieses 100000 x g-Pellet wird in PIPLC-Puffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1% DOC, pH 7,4) resuspendiert. Die Hälfte dieser Membranfraktion wird anschließend mit 50 mU PIPLC (Sigma-Aldrich GmbH) versetzt, die andere Hälfte zur Kontrolle nur mit Puffer. Beide Proben werden für 1,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 1 Stunde bei 100000 x g und 4°C in der Ultrazentrifuge (XL-80, Rotor SW 32Ti, rote Einsätze, Polyallomer Zentrifugenröhrchen 16x102 mm, Beckman Coulter Inc.) pelletiert. Der Überstand wird daraufhin mittels SDS-PAGE (siehe 5.1.1) und Westernblot (siehe 5.1.1.2) auf den CD24-Gehalt analysiert.

Leider erwies sich der Phospholipase C-Verdau nicht als effiziente Methode zur Solubilisierung von CD24.

5.1.11 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation können mittels eines Antikörpers das entsprechende Antigen und teilweise auch Bindungspartner des Antigens (Co-Immunpräzipitation) aus einer Probe isoliert werden.

Als Untersuchungsmaterial wird hier eine grobe Membranfraktion (17000 x g-Pellet) von Kleinhirnhomogenat aus 5 bis 7 Tage alten Mäusen (P5 - P7) verwendet, und zwar pro Ansatz 250 µg in Konzentrationen zwischen 700 und 1000 µg/ml. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die verwendeten Protein G *Beads* zu minimieren, wird die Proteinlösung zunächst damit vorinkubiert (*Preclearing*). Zu 250 µl Kleinhirnhirnmembranfraktion werden 25 µl nach Herstellerangaben gewaschene, magnetische Protein G *Beads* (Magna Bind Protein G *Beads*, Pierce) gegeben und für 2 bis 3 Stunden bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Anschließend werden die *Beads* mittels eines Magnetständers entfernt und die Proteinlösung kann für die Immunpräzipitation verwendet werden. Tabelle 5.3 zeigt die eingesetzten Mengen der entsprechenden Antikörper bzw. der unspezifischen IgG-Kontrollen. Die Kleinhirnhirnpoteinlösung wird über Nacht bei 4°C auf einem Rotor mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Um die gebildeten Protein-Antikörper-Komplexe daraufhin zu isolieren, wird jeder Ansatz mit 25 µl nach Herstellerangaben gewaschenen magnetischen Protein G *Beads* für 7 Stunden bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Schließlich werden die *Beads* mit Hilfe eines Magnetständers fünfmal mit Waschpuffer C (50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, pH 7,5) und dreimal mit Waschpuffer A (50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,5) gewaschen,

um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die *Beads* werden mit SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Antikörper		Spezies	Menge pro IP-Ansatz
α CD24	79	Ratte	5 μ g
IgG		Ratte	5 μ g
α F3	α human Contactin-1	Ziege	0,5 μ g
α TAG-1	α human Contactin-2	Ziege	0,5 μ g
IgG		Ziege	0,5 μ g

Tabelle 5.3: Verwendete Antikörper für die Immunpräzipitation

5.1.12 *Pulldown*

Pulldown-Experimente werden verwendet, um mögliche Bindungspartner eines Proteins zu finden bzw. die Bindung zweier Proteine aneinander zu untersuchen. Hier wird die Bindung zwischen an *Beads* gekoppeltem CD24 und TAG-1 bzw. F3 analysiert.

Für die Kopplung von CD24 an magnetische *Dynabeads* M-270 Epoxy (Invitrogen Dynal AS) werden pro Ansatz 10^8 (1,5 mg) *Beads* nach Herstellerangaben gewaschen, in Natriumphosphatpuffer aufgenommen, mit 2 μ g CD24 in PBS sowie 3 M Ammoniumsulfatlösung (Endkonzentration 1 M) gemischt und anschließend für ca. 24 Stunden bei 37°C auf einem Rotor inkubiert. Danach werden die noch freien Bindungsstellen der *Beads* geblockt, indem sie dreimal mit 0,1 % BSA in PBS gewaschen werden. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS können die CD24-*Beads* für *Pulldown*-Experimente verwendet werden.

Um die Bindung von CD24 an TAG-1 und F3 zu untersuchen, werden aufgereinigtes TAX-1-Fc (humanes Analogon zu TAG-1-Fc), F3-Fc, sowie als Kontrollen humanes Fc alleine und CHL1-Fc verwendet. Pro Ansatz werden 10^8 CD24-*Beads* mit 18,75 pMol des jeweiligen Fc-Proteins (siehe Tabelle 5.4) in Gegenwart von 0,1 % Triton X-100 in 100 μ l Gesamtvolumen über Nacht bei 4°C auf einem Rotor inkubiert.

Protein	Menge pro <i>Pulldown</i> -Ansatz
TAX-1-Fc	3 μ g
F3-Fc	3 μ g
CHL1-Fc	3,75 μ g
humanes Fc	0,47 μ g

Tabelle 5.4: Verwendete Proteine für *Pulldown*

Die eingesetzte Proteinmenge entspricht pro Ansatz jeweils 18,75 pMol.

Nach Inkubation der Proteinlösungen mit CD24-*Beads* werden diese mit Hilfe eines Magnetständers dreimal mit Waschpuffer B (50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X-100, pH 7,5) und dreimal mit Waschpuffer A (50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,5) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die *Beads* werden mit SDS-Ladepuffer

versetzt, für 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

5.1.13 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein immunologisches Nachweisverfahren stellt der *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) dar. Dabei können entweder viele Proben auf den Gehalt eines Antigens überprüft werden, oder die Bindung zwischen zwei Proteinen bzw. einem Antigen und dessen Antikörper unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

5.1.13.1 CD24-ELISA

Der CD24-ELISA wird zum Nachweis von CD24 in verschiedenen Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie (siehe 5.1.6) verwendet. Das Versuchsprotokoll wurde freundlicherweise von Christina Bleckmann (Biochemisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen) zur Verfügung gestellt.

Die Vertiefungen von 96 well-Platten (*Micro Well Polysorb*, Nunc GmbH) werden mit 100 µl/well der erhaltenen Säulenfraktionen beschichtet. Als Positivkontrolle dient aufgereinigtes CD24, von dem etwa 500 ng/well in TBS verdünnt und ebenfalls adsorbiert werden. Die Negativkontrolle stellt TBS dar. Zur Doppelbestimmung werden alle Proben in jeweils zwei wells adsorbiert. Die Beschichtung erfolgt durch etwa 1-stündige Lyophilisierung.

Nach der Beschichtung werden ausgefallene Salze durch zweimaliges Waschen mit je 250 µl/well TBS entfernt und es folgt eine Blockierung der ungesättigten Proteinbindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 200 µl/well 1 % BSA in TBS. Vor der Zugabe des Primärantikörpers wird wiederum zweimal mit je 250 µl/well TBS gewaschen.

Der αCD24-Antikörper 79 wird in 1 % BSA in TBS auf 2 µg/ml verdünnt und die Vertiefungen mit 50 µl/well für 1 Stunde bei 37°C damit inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 250 µl/well 0,1 % Tween in TBS erfolgt die Inkubation mit 50 µl/well HRP-konjugiertem anti-Ratte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in 0,1 % Tween in TBS für eine Stunde bei 37°C.

Nach wiederum viermaligem Waschen mit je 250 µl/well 0,1 % Tween in TBS werden von der zur Detektion verwendeten Substratlösung (TMB, Sigma-Aldrich GmbH) 100 µl/well hinzugegeben und die Reaktion nach etwa 30 bis 60 min durch Zugabe von 100 µl/well 12,5%-iger Schwefelsäure gestoppt. Anschließend können die Absorptionen bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen werden.

5.1.13.2 Lewis^x-ELISA

Im Lewis^x-ELISA wird die Bindung des αLewis^x-Antikörpers 487 (L5) an ein Lewis^x-mimikrierende Peptid (H-SACSRLNYLHC-OH) in Anwesenheit potenziell inhibierender organischer Substanzen getestet (siehe auch 5.1.14). Das Standard-ELISA-Protokoll wurde freundlicherweise von Nainesh Katagihallimath (ZMNH) zur Verfügung gestellt und zu folgendem kompetitiven ELISA abgeändert:

Vertiefungen von 384 well-Mikrotiterplatten (*Polystyrene High Binding*, Corning B.V. Life Sciences) werden über Nacht bei 4°C mit 10 µg/ml Lewis^x-Peptid in 25 µl 50 mM Natriumacetat pH 5,0 pro well beschichtet. Als Positivkontrolle werden 5, 10 und 20 µg/ml Lewis^x-Peptid verwendet, als Negativkontrolle 5, 10 und 20 µg/ml *scrambled* Lewis^x-Peptid (H-SACNHLRSYC-OH). Für alle Proben erfolgt eine Doppelbestimmung. Nach der Beschichtung werden die ungesättigten Proteinbindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 90 µl/well 1 % BSA in PBS blockiert.

Der αLewis^x-Primärantikörper 487 wird auf 6,67 µg/ml in 1,67 % BSA in PBS verdünnt. Die Menge resultiert in einer Endkonzentration von 4 µg/ml in 1 % BSA in PBS, da bei Positiv- und Negativkontrollen 10 µl/well 0,2 % DMSO in PBS vorgelegt werden, bei den Kompetitionskontrollen je 10 µl/well 0,2 % DMSO in PBS oder 50 bzw. 100 µg/ml Lewis^x-Peptid in 0,2 % DMSO in PBS. Zum

Testen der organischen Verbindungen werden von diesen je 10 μl /well 8 μM , 20 μM und 40 μM in PBS vorgelegt. Anschließend werden 15 μl /well Primärantikörperverdünnung zugegeben und damit für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 50 μl /well 0,025 % Tween in PBS erfolgt die Inkubation mit 25 μl /well HRP-konjugiertem anti-Ratte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:4000 in 0,1 % BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Nach wiederum dreimaligem Waschen mit je 50 μl /well 0,025 % Tween in PBS werden 50 μl /well von der zur Detektion verwendeten Substratlösung (0,5 mg/ml OPD in 1x *Stable Peroxide Substrate Buffer*, Pierce) hinzugegeben und die Reaktion nach etwa 4 bis 10 min durch Zugabe von 50 μl /well 2,5 M Schwefelsäure gestoppt. Anschließend können die Absorptionen bei 490 nm im ELISA-Reader ($\mu\text{Quant Microplate Spectrophotometer}$, BioTek Instruments) gemessen werden.

5.1.14 High Throughput Screening einer Bibliothek von organischen Substanzen

Um organische, das Lewis^x-Epitop mimikrierende Verbindungen zu finden, wird eine Bibliothek aus 20000 organischen Substanzen im kompetitiven Lewis^x-ELISA (siehe 5.1.13.2) getestet. Dabei werden Substanzen gesucht, die die Bindung des α Lewis^x-Antikörpers 487 an das Lewis^x-Peptid spezifisch um mehr als 50 % inhibieren. Dieses *High Throughput Screening* (HTS) wurde in Kooperation mit Dr. Jens Peter von Kries (Screening Unit, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) durchgeführt.

Die Substanzbibliothek besteht aus 57 Mikrotiterplatten, in deren Vertiefungen jeweils eine der insgesamt 20000 organischen Verbindungen enthalten ist. Diese Bibliotheksplatten werden bei 4°C aufbewahrt. Vor Benutzung im HTS werden sie auf Raumtemperatur erwärmt und für 1 min bei 1000 x g zentrifugiert, um kondensierte Flüssigkeit von der Innenseite der Plattenversiegelung wieder zurück in die jeweiligen Vertiefungen zu befördern. Um ausgefallene Substanzen wieder in Lösung zu bringen, werden die Platten anschließend für 1,5 min im Ultraschallwasserbad behandelt. Schließlich wird sämtliches außen an den Platten befindliches Wasser entfernt, indem diese für 10 min im Lyophilisator zentrifugiert werden. Danach sind sie bereit für den Einsatz im Screen.

Zum Auftragen der Blockierungslösung sowie zum Vorlegen von PBS wird der Dispenser *Easypense* (Tecan AG) verwendet. Die Applikation der organischen Verbindungen erfolgt mittels eines Pipettierroboters (*Robot Sciclone*, Caliper Life Sciences), die Waschschritte mit Hilfe des *Power Washer 384* (Tecan AG). Alle anderen Pipettierschritte erfolgen per Hand mittels automatischer Multikanalpipetten.

Zum Screening der 20000 organischen Substanzen werden 57 Mikrotiterplatten (384 well *Polystyrene High Binding*, Corning B.V. Life Sciences) benötigt. Auf jeder Platte werden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle, die in der 24. Spalte jeder Platte platziert wird, werden 5 oder 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lewis^x-Peptid in 25 μl 50 mM Natriumacetat pH 5,0 als Beschichtung verwendet. Als Negativkontrolle dient 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *scrambled* Lewis^x-Peptid in 25 μl 50 mM Natriumacetat pH 5,0, das in der ersten Spalte jeder Platte adsorbiert wird. Diese Kontrollen werden ohne Zusatz von organischen Verbindungen wie unter 5.1.13.2 beschrieben detektiert. Alle restlichen 22 Spalten der Mikrotiterplatten werden verwendet, um die Kompetitionsfähigkeit jeweils einer organischen Verbindung zu testen. Dazu werden die Vertiefungen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lewis^x-Peptid in 25 μl 50 mM Natriumacetat pH 5,0 pro well beschichtet. Die Adsorption der Peptide wird über Nacht bei 4°C durchgeführt.

Nach der Beschichtung der Mikrotiterplatten mit den Peptiden werden ungesättigte Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit 50 μl /well 1 % BSA in PBS blockiert (Dispenser *Easypense*). Um dann eine gewisse Flüssigkeitsmenge bereitzustellen, in die der Pipettierroboter die geringen Volumina der organischen Verbindungen absetzen kann, werden anschließend in jedem well 10 μl PBS vorgelegt (Dispenser *Easypense*). Wie oben beschrieben erfolgt dann in 22 Spalten (d. h. 352

wells) jeder Mikrotiterplatte mittels Roboter (*Robot Sciclone*) der Transfer von jeweils 0,1 µl/well einer der 20000 organischen Verbindungen aus den Bibliotheksplatten. Die organischen Substanzen sind in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst, d. h. im Screen wird 1 pmol/well verwendet, die Endkonzentration beträgt also 40 µM. In die ersten und letzten Spalten (Negativ- bzw. Positivkontrollen) werden keine Substanzen zugesetzt. Anschließend werden 15 µl/well Primärantikörperverdünnung zugegeben und damit für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (*Power Washer 384*) mit je 50 µl/well 0,025 % Tween in PBS erfolgt die Inkubation mit 25 µl/well HRP-konjugiertem anti-Ratte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:4000 in 0,1 % BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach wiederum dreimaligem Waschen (*Power Washer 384*) mit je 50 µl/well 0,025 % Tween in PBS werden 50 µl/well von der zur Detektion verwendeten Substratlösung (0,5 mg/ml OPD in 1 x *Stable Peroxide Substrate Buffer*, Pierce) hinzugegeben und die Reaktion nach etwa 4 bis 10 min durch Zugabe von 50 µl/well 2,5 M Schwefelsäure gestoppt. Anschließend können die Absorptionen bei 490 nm im *ELISA-Reader* (*Safire ELISA-Reader*, Tecan AG) gemessen werden.

5.2 Zellkultur

5.2.1 Primärzellkultur

5.2.1.1 Beschichtung von Deckgläschen

Für die Kultivierung von Primärzellen auf verschiedenen Substraten werden Deckgläschen verwendet, die zunächst mit Poly-L-Lysin (PLL) im Fall von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen (DRG-Neuronen) oder mit Poly-L-Ornithin (PLO) bei Motoneuronen beschichtet werden. Diese können direkt eingesetzt oder vorher zusätzlich mit verschiedenen anderen Proteinen, Peptiden oder Antikörpern beschichtet werden.

Für die PLL- bzw. PLO-Beschichtung werden jeweils 100 Deckgläschen (Glas, rund, 15 mm Durchmesser, Carl Roth GmbH & Co. KG) in einem 500 ml-Glaserlenmeyerkolben für 30 min mit 3 M HCl, zweimal 15 min mit dH₂O, über Nacht mit Aceton, fünfmal 10 min mit dH₂O und zweimal 10 min mit Ethanol unter Schütteln gewaschen (jeweils mit ca. 100 ml). Zur anschließenden Sterilisation werden die Deckgläschen für 2 Stunden auf 200°C erhitzt. Nach dem Abkühlen werden sie in 50 ml steriler 0,01 %-iger Poly-L-Lysin-Lösung bzw. 0,0015 %-iger PLO-Lösung über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Es folgen zwei weitere zehnmünütige Waschschrirte mit dH₂O. Für die Lagerung werden die beschichteten Deckgläschen einzeln auf einer sterilen Unterlage ausgelegt und unter UV getrocknet. In einem sterilen Gefäß können sie danach bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Sollen die Zellen auf einem anderen Substrat als Poly-L-Lysin bzw. Poly-L-Ornithin wachsen, werden die PLL- bzw. PLO-Deckgläschen vor Gebrauch über Nacht zusätzlich beschichtet. Hier werden CD24 (5 µg/ml) und Laminin (10 µg/ml) verwendet und in HBSS verdünnt. Dazu werden pro Deckgläschen 75 µl der jeweiligen Substratlösung (bzw. nur HBSS für PLL- bzw. PLO-Kontrollen) auf eine UV-sterile Parafilmfläche getropft, die Deckgläschen einzeln darauf gelegt und über Nacht bei 4°C gelagert. Dann werden die Deckgläschen mit der beschichteten Seite nach oben in 12 well-Zellkulturplatten (*Cellstar Multiwell Platte*, Greiner Bio-One GmbH) gelegt und mit HBSS (für Kleinhirn- und Hippocampusneurone) oder Ham's F-12 (für *Dorsal Root Ganglion* (DRG)- oder Motoneurone) gewaschen. Anschließend können die Primärzellen darauf ausgesät werden.

5.2.1.2 Einzelzellkultur von Kleinhirneuronen

Fünf bis sieben Tage alte Mäuse (P5 - P7) werden dekaptiert, die Kleinhirne entnommen und in eiskaltes HBSS gelegt. Unter dem Stereomikroskop wird fremdes Gewebe und Hirnhaut mit Pin-

zeten entfernt, bevor die Kleinhirne mit einer kleinen Schere in drei Teile geschnitten und in ein 15 ml-Röhrchen überführt werden. Anschließend werden sie mit 10 ml HBSS gewaschen und für 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml Trypsin/DNase-Lösung (1 x HBSS, 1 % Trypsin, 0,1 % DNase I, 0,8 mM MgCl₂, pH 7,8) behandelt. Um diese wieder zu entfernen, wird das Kleinhirngewebe anschließend dreimal mit je 10 ml HBSS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml DNase-Lösung (1 x BME, 0,05 % DNase I, 0,25 % Glukose) werden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und vereinzelt, indem sie mittels drei Glaspasteurpipetten mit abnehmenden Durchmessern mehrmals auf- und abpipettiert werden. Der DNase-Verdau wird durch Zugabe von 10 ml HBSS gestoppt und die Zellen werden bei 200 x g und 4°C für 15 min pelletiert. Nach Aufnahme der Neurone in 10 ml vorgewärmtem X-1 Medium wird die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer, Carl Roth GmbH & Co. KG) bestimmt und durch Verdünnung mit X-1 Medium auf 100000 bis 200000 Zellen pro ml eingestellt. Die Kleinhirneurone werden anschließend auf mit PLL, CD24 oder Laminin beschichteten Deckgläschen in 12 well-Zellkulturplatten (Cellstar Multiwell Platte, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät (1 ml pro well) und für ca. 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

5.2.1.3 Einzelzellkultur von Hinterwurzelganglienneuronen

Fünf bis sieben Tage alte Mäuse (P5 - P7) werden dekaptiert. Vom Rumpf wird zunächst das Fell entfernt, um anschließend die Wirbelsäule samt Rippenansätzen isolieren zu können. Diese wird in eiskaltes Ham's F-12 gelegt. Zur Präparation der Hinterwurzelganglien wird das Rückgrat mit der dorsalen Seite nach oben auf einer Silikon-Oberfläche in Ham's F-12 mit feinen Nadeln fixiert und auf Eis unter ein Stereomikroskop gelegt. Vom kaudalen Ende aus werden die Wirbel vorsichtig in rostraler Richtung aufgeschnitten, ohne dabei das Rückenmark zu verletzen. Mit Hilfe von zwei Pinzetten kann der Wirbelkanal geöffnet werden, so dass sowohl Vorder- als auch Hinterwurzeln zu erkennen sind. Diese werden mit Pinzetten entnommen und in eine kleine Petrischale mit eiskaltem Ham's F-12 überführt. Nach vollständiger Präparation werden die Neuronenfaser mit einer angefeuchteten Glaspipette in ein 15 ml-Röhrchen überführt und mit 10 ml Ham's F-12 gewaschen, indem sie nach Zugabe des Puffers kurz abzentrifugiert werden (short spin, ca. 12 s, 4°C). Danach wird das Gewebe für 30 min bei 37°C mit 1 ml Trypsin/Collagenase-Lösung (50 % Ham's F-12, 50 % DMEM, 0,25 % Trypsin, 0,1 % Collagenase) behandelt und zweimal wie beschrieben mit je 10 ml Ham's F-12 gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml DNase-Lösung (50 % Ham's F-12, 50 % DMEM, 0,01 % DNase I) werden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und vereinzelt, indem sie mittels vier Glaspasteurpipetten mit abnehmenden Durchmessern mehrmals auf- und abpipettiert werden. Der DNase-Verdau wird durch Zugabe von 10 ml Ham's F-12 gestoppt und die Zellen werden bei 500 x g und 4°C für 5 min pelletiert. Nach Aufnahme der Zellen in vorgewärmtem DRG-Medium werden sie auf mit PLL oder CD24 beschichteten Deckgläschen in 12 well-Zellkulturplatten (Cellstar Multiwell Platte, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät (1 ml pro well) und für ca. 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

5.2.1.4 Einzelzellkultur von Motoneuronen

Ein trächtiges Mausweibchen wird nach etwa 14 Tagen Tragzeit mittels CO₂ getötet, seine Bauchseite mit 70 % Ethanol desinfiziert und die Bauchhöhle vorsichtig geöffnet. Die beiden Uterushörner werden entnommen, in eine Petrischale mit eiskaltem Ham's F-12 gelegt und die Embryonen (E14) daraus isoliert. Sie werden in eine neue Petrischale mit eiskaltem Ham's F-12 überführt. Nach der Entfernung des Kopfes wird der Embryo mit feinen Nadeln auf einer Silikon-Oberfläche in Ham's F-12 fixiert und auf Eis unter ein Stereomikroskop gelegt. Vom kaudalen Ende aus wird vorsichtig links und rechts vom Wirbelkanal in rostraler Richtung mit der kleinsten Schere geschnitten.

Das Rückenmark wird vorsichtig entnommen und in eine neue Petrischale mit eiskaltem Ham's F-12 überführt. Nach der Präparation des Rückenmarks aller Embryonen werden diese Gewebestücke in je drei kleine Teile geschnitten und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Rückenmarkteile werden einmal mit 5 ml Ham's F-12 gewaschen und für 30 min bei 37°C mit Trypsin/Collagenase-Lösung (50 % Ham's F-12, 50 % DMEM, 0,25 % Trypsin, 0,1 % Collagenase) behandelt. Anschließend wird das Gewebe zweimal mit je 5 ml Ham's F-12 gewaschen. Nach Zugabe von DNase-Lösung (50 % Ham's F-12, 50 % DMEM, 0,01 % DNase I) werden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und vereinzelt, indem sie mittels drei Glaspasteurpipetten mit abnehmenden Durchmessern mehrmals auf- und abpipettiert werden. Der DNase-Verdau wird durch Zugabe von 10 ml Ham's F-12 gestoppt. Die Zellsuspension wird auf einen 25 % und 50 % Optiprep-Gradienten geschichtet und bei 400 x g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Dabei werden die kleineren Epithel- und Blutzellen von den Neuronen abgetrennt. Motoneuronen können danach aus der Interphase zur 25 % Optiprep-Phase entnommen werden. Die Zellsuspension wird mit 5 ml Ham's F-12 verdünnt und über ein 3,5 %-iges BSA-Kissen gewaschen, indem sie damit bei 120 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert wird. Dabei wird Zellschrott entfernt, da er nicht sedimentiert. Das Zellpellet wird in 5 ml Motoneuron-Medium aufgenommen. Die Zellzahl wird mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer, Carl Roth GmbH & Co. KG) bestimmt und durch Verdünnung mit Motoneuron-Medium auf 50000 bis 100000 Zellen pro ml eingestellt. Die Motoneurone werden anschließend auf mit PLO oder CD24 beschichteten Deckgläsern in 12 well-Zellkulturplatten (Cellstar Multiwell Platte, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät (1 ml pro well) und für ca. 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Präparation von Motoneuronen wurde von Dr. Gaby Loers (ZMNH) durchgeführt.

5.2.1.5 Einzelzellkultur von Hippocampusneuronen

Null bis zwei Tage alte Mäuse (P0 - P2) werden dekaptiert, die gesamten Hirne entnommen und in eiskaltes Hippocampus-Medium ohne FGF (1x Neurobasal A-Medium, 1x B-27 Supplement, 1x GlutaMAX) gelegt. Unter dem Stereomikroskop werden die zwei Neocortices mit Hilfe von Pinzetten getrennt und vorsichtig umgeklappt. Davon werden die Hippocampi mit Pinzetten entnommen und in raumtemperaturwarmes Hippocampus-Medium ohne FGF gelegt. Anschließend werden die Hippocampi mit einer kleinen Schere in zwei Teile geschnitten und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Sie werden mit 10 ml Hippocampus-Medium ohne FGF gewaschen und für 12 min bei 37°C mit 6 ml Papain/DNase-Lösung (1x Neurobasal A-Medium, 1x B-27 Supplement, 1x GlutaMAX, 0,2 % Papain (w/v), 0,075 % DNase I (w/v)) behandelt. Nach der Entfernung der Papain/DNase-Lösung werden 2 ml DNase-Lösung (1x Neurobasal A-Medium, 1x B-27 Supplement, 1x GlutaMAX, 0,05 % DNase I (w/v)) zugegeben. Die Zellen werden aus dem Gewebeverband gelöst und vereinzelt, indem sie mittels drei Glaspasteurpipetten mit abnehmenden Durchmessern mehrmals auf- und abpipettiert werden. Der DNase-Verdau wird durch Zugabe von 10 ml Hippocampus-Medium ohne FGF gestoppt, und die Zellen werden bei 80 x g und 24°C für 10 min pelletiert. Nach Aufnahme der Neuronen in 10 ml vorgewärmtem Hippocampus-Medium wird die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer, Carl Roth GmbH & Co. KG) bestimmt und durch Verdünnung mit Hippocampus-Medium auf 50000 bis 100000 Zellen pro ml eingestellt. Die Hippocampusneurone werden anschließend auf mit PLL, CD24 oder Laminin beschichteten Deckgläsern in 12 well-Zellkulturplatten (Cellstar Multiwell Platte, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät (1 ml pro well) und für ca. 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert.

5.2.1.6 Neuritenwachstumsexperimente

In Neuritenwachstumsexperimenten wird an einzelnen Primärzellen untersucht, wie die Gesamtneuritenlänge durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise dem Genotyp der Mäuse, dem Substrat

oder zusätzlich löslich zugegebenen Zuckern, Antikörpern oder organischen Substanzen beeinflusst wird.

Dazu werden die Einzelzellkulturen wie unter 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4 und 5.2.1.5 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich löslich verwendete Zucker, Antikörper oder organische Substanzen werden etwa eine Stunde nach dem Aussäen der Zellen zugegeben, wenn die Zellen sich an die Oberfläche der beschichteten Deckgläschen angeheftet haben. Die Zucker Lewis^x und Lewis^a werden in Endkonzentrationen von je 10 μM eingesetzt, organische Substanzen von je 40 μM und Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000.

Nach etwa 24-stündiger Kultivierung bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit werden die Zellen durch Zugabe von 2,5 % Glutaraldehyd für 30 min fixiert, anschließend zweimal mit dH₂O gewaschen und für 30 min mit Färbelösung (1 % Toluidinblau O, 1 % Methylenblau, 1 % Borax) angefärbt. Danach wird überschüssige Färbelösung durch dreimaliges Waschen mit dH₂O entfernt. Die Deckgläschen werden getrocknet, bevor sie mit Hilfe von DPX (Sigma-Aldrich GmbH, Fluka) auf Objektträger geklebt werden. Nach der Aushärtung können die so fixierten Zellen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Ein Kontron-Mikroskop (Axiovert 135 mit Kamera AxioCam MRc 5, Carl Zeiss AG) sowie die Software Axio Vision (AxioVs40 V4.6.1.0, Carl Zeiss AG) werden verwendet, um die Längen aller Neuriten von mindestens 100 einzelnen Kleinhirn- bzw. Hippocampusneuronen oder 50 bis 100 DRG- bzw. Motoneuronen pro Probe zu messen. Aus diesen Messwerten wird der Mittelwert gebildet und aus mindestens drei einzelnen unabhängigen Experimenten werden wiederum Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Die Signifikanzniveaus werden mit dem Student t-test berechnet. Alle Berechnungen erfolgen mit Microsoft Excel.

5.2.1.7 Immunzytochemie

In immunzytochemischen Experimenten können Proteine in fixierten Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper lokalisiert werden.

Um die Bindung von CD24 in *trans* an neuronale Proteine zu untersuchen, wird CD24 zunächst an fluoreszierende *Beads* (*Fluospheres*, carboxylat-modifiziert, Crimson, Durchmesser 1 μm , Molecular Probes, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) gekoppelt. Bei allen folgenden Schritten sind die *Fluospheres* lichtgeschützt zu behandeln. 200 μl *Beads* werden zweimal mit je 200 μl MES-Puffer gewaschen, indem sie darin gemischt und anschließend bei 5000 x g für 10 min abzentrifugiert werden und der Überstand vorsichtig abgenommen wird. Die *Fluospheres* werden in 200 μl MES-Puffer aufgenommen, mit 110 μg CD24 in MES-Puffer gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Rotor inkubiert. Als *Crosslinker* werden anschließend 1,5 mg EDAC zugegeben und zur Kopplung für ca. 18 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rotor inkubiert. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von Glycin (Endkonzentration 100 mM) und 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rotor gestoppt. Nach einer Zentrifugation bei 5000 x g für 10 min wird der Überstand entfernt und die *Fluospheres* werden dreimal mit je 500 μl 0,9 % PBS wie oben beschrieben gewaschen. Schließlich werden die *Beads* in 1 % BSA in 0,9 % PBS aufgenommen, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die CD24-*Fluospheres* können anschließend für immunzytochemische Experimente verwendet bzw. für wenige Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Als Kontrolle werden außerdem ungekoppelte *Fluospheres* vorbereitet, die nur für eine Stunde durch EDAC aktiviert und mit Glycin gestoppt werden. Alle Waschschritte werden wie für CD24-*Fluospheres* beschrieben durchgeführt. Vor Gebrauch werden die *Beads* 20 s lang gemischt und für 5 min in einem Ultraschallwasserbad behandelt um Aggregation zu vermeiden. Die benötigte Menge *Fluospheres* wird entnommen und in Ham's F-12 verdünnt.

Für die Immunzytochemie werden Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen wie unter 5.2.1.3 be-

Antikörper	Spezies	Verdünnung bzw. Konzentration
α F3	α human Contactin-1	Ziege 10 μ g/ml
α L1	α L1 poly	Kaninchen 1:500
α TAG-1	α human Contactin-2	Ziege 13,3 μ g/ml

Tabelle 5.5: Verwendete Primärantikörper für die Immunzytochemie

schrieben durchgeführt. Nach etwa 48-stündiger Kultivierung bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit werden pro well 5 μ l CD24- oder Kontroll-*Fluospheres* zu den Zellen gegeben und damit für eine weitere Stunde bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend werden ungebundene *Beads* durch dreimaliges Waschen mit je 500 μ l/well Ham's F-12 entfernt und die Zellen werden fixiert, indem sie zweimal mit je 500 μ l/well 4 %-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung gewaschen und anschließend für etwa 20 min bei Raumtemperatur mit je 750 μ l/well 4 % PFA inkubiert werden. Nach zweimaligem Waschen mit je 500 μ l/well 3 % BSA in PBS werden unspezifische Bindungsstellen mit je 750 μ l/well 3 % BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend werden die Zellen mit den gewünschten Primärantikörpern inkubiert, die in 3 % BSA in PBS verdünnt werden. Die Tabelle 5.5 zeigt die eingesetzten Antikörper und die entsprechend verwendeten Verdünnungen. Pro Deckgläschen werden 75 μ l der jeweiligen Antikörperlösung auf eine Parafilmfläche getropft, die Deckgläschen einzeln mit der von Zellen bewachsenen Seite nach unten darauf gelegt und über Nacht bei 4°C gelagert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, werden die Deckgläschen zweimal gewaschen, indem sie einzeln in kleine Färbegestelle gehängt und zweimal für je 1 min in eine Schale mit PBS gestellt werden. Zum Nachweis der verwendeten Primärantikörper dienen fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (α Kaninchen Cy2 und α Ziege Cy3, beide aus Esel). Diese werden in 3 % BSA in PBS jeweils 1:200 verdünnt. Pro Deckgläschen werden 75 μ l der jeweiligen Antikörperlösung auf eine Parafilmfläche getropft, die Deckgläschen einzeln darauf gelegt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden überschüssige Antikörper wiederum wie oben beschrieben durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Deckgläschen werden mit Aqua Poly/Mount (Polysciences Inc.) auf Objektträger geklebt und zum Aushärten über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend können die so fixierten und gefärbten Zellen unter Lichtabschluss bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Analyse der immunzytochemischen Experimente dient ein konfokales Mikroskop (Leica DM IRBE mit Leica Confocal Software V2.61, Leica Microsystems GmbH).

5.2.2 Präparation und Kultivierung von Makrophagen

Für die optimale Kultivierung von Hybridomazellen (siehe 5.2.3) ist es nötig, diese zunächst auf einer Makrophagenschicht auszusäen.

Dafür werden zwei adulte Mausweibchen, die bereits mehrmals trächtig gewesen sind, mittels CO₂ getötet, zur Desinfektion für etwa 30 Sekunden in 70 % Ethanol gelegt, abgetrocknet und mit der Bauchseite nach oben auf einer Styroporfläche befestigt. Nach dem Entfernen des Fells von der Bauchoberfläche wird ein kleines Loch in die Bauchhöhle geschnitten. Durch dieses werden dreimal je 500 μ l 340 mM Sukroselösung in die Bauchhöhle pipettiert, durch Massieren verteilt, wieder abpipettiert und in einem 15 ml-Röhrchen gesammelt. Von zwei Mäusen erhält man auf diese Weise etwa 3 ml Sukroselösung mit Makrophagen. Zum Waschen werden 10 ml RPMI-Medium hinzugefügt und die Zellen bei 1000 x g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Das so erhaltene Makrophagen-Pellet wird

in 4 ml RPMI-Medium resuspendiert und die Zellen können auf zwei Vertiefungen einer 6 well-Zellkulturplatte (Cellstar Multiwell Platte, Greiner Bio-One GmbH) verteilt werden. Während der etwa 24-stündigen Kultivierung bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit adhären die Makrophagen an die Plastikoberfläche. Anschließend werden alle nicht-adhäsiven Zellen durch Waschen entfernt. Dazu wird zunächst das Medium abgesaugt und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, so dass der Überstand als Konditionsmedium, das Wachstumsfaktoren aus Makrophagen enthält, verwendet werden kann. Die Makrophagen werden drei- bis fünfmal mit RPMI-Medium gewaschen. Danach können Hybridomazellen auf ihnen ausgesät werden (siehe 5.2.3).

5.2.3 Kultivierung von Hybridomazellen

Hybridomazellen, die den monoklonalen α CD24-Antikörper 79 exprimieren und produzieren [Kadmon *et al.*, 1992], werden nach Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff schnell aufgetaut, in ein 15 ml-Röhrchen transferiert und mit 10 ml RPMI-Medium gewaschen. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen bei 500 x g und 4°C für 5 min werden sie in 5 ml RPMI-Medium resuspendiert und in 6 well-Zellkulturplatten (Cellstar Multiwell Platte, Greiner Bio-One GmbH) ausgesät. Um sicherzugehen, dass die Hybridomazellen in jedem Fall gut anwachsen, werden sie sowohl auf zuvor kultivierten Makrophagen (siehe 5.2.2) in RPMI-Medium, ohne Makrophagen aber in Makrophagen-Konditionsmedium (siehe 5.2.2), als auch ohne Makrophagen in RPMI-Medium ausgesät. Anschließend werden die Zellen bei 37°C, 5 % CO₂ und 90 %-iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach etwa 24 Stunden können Proben der Zellkulturüberstände mittels SDS-PAGE (siehe 5.1.1) und Westernblot (siehe 5.1.1.2) auf die Effizienz der Antikörperproduktion hin analysiert werden.

Um ausreichende Mengen von antikörperproduzierenden Hybridomazellen zu erlangen, werden diese etwa 1:4 in RPMI-Medium expandiert und in Zellkulturflaschen (Cellstar Standard Zellkultur Flasche 75 mm², Greiner Bio-One GmbH) kultiviert. Zur Produktion werden die Zellen in serumfreiem Produktionsmedium (SFM) expandiert, indem sie für 5 min bei 900 x g abzentrifugiert, in 50 ml SFM aufgenommen und in Zellkulturflaschen (Cellstar Standard Zellkultur Flasche 175 mm², Greiner Bio-One GmbH) ausgesät werden. Nach etwa zwei- bis dreitägiger Kultivierung in SFM wird der antikörperenthaltende Zellkulturüberstand gewonnen, indem die Produktionskultur für 5 min bei 900 x g abzentrifugiert wird. Der Überstand wird gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Hybridomazellen werden wieder in 50 ml SFM pro Flasche aufgenommen und weiter kultiviert. Pro Produktionsflasche sind so etwa 7 bis 8 Passagen mit Gewinnung von Antikörperüberstand möglich.

Aus dem so gewonnenen Zellkulturüberstand kann der produzierte Antikörper anschließend mittels einer Protein G Sepharose-Säule chromatographisch isoliert werden (siehe 5.1.3).

5.3 Sonstige Methoden

5.3.1 Genotypisierung von Mäusen

Um den Genotyp von Mäusen zu untersuchen, wird aus Schwanzbiopsien genomische DNA isoliert (siehe 5.3.1.1). Durch den Einsatz von *Primern*, die spezifisch für Wildtyp- bzw. defiziente Mäuse sind, können in der darauffolgenden Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* (PCR)) charakteristische Bereiche amplifiziert werden (siehe 5.3.1.2, 5.3.1.3, 5.3.1.4 und 5.3.1.5). Nach der Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese und der Anfärbung mittels Ethidiumbromid (siehe 5.3.1.6) können die erhaltenen Bandenmuster den Genotypen (homozygot Wildtyp, homozygot defizient oder heterozygot) zugeordnet werden.

5.3.1.1 Proteinaseverdau von Schwanzbiopsien

Schwanzbiopsien werden etwa ein bis zwei Tage nach der Geburt angefertigt, nachdem die Mäuse eindeutig markiert worden sind (durchgeführt von Mitarbeitern der Tierhaltung des UKE bzw. ZMNH). Um die genomische DNA aus den Schwanzbiopsien zu isolieren, erfolgt ein Verdau mit Proteinase K (Roche Diagnostics GmbH). Zu jeder Biopsie werden 150 µl der Proteinase-Lösung (0,1 mg/ml Proteinase K in 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM EDTA, 0,45 % NP-40, 0,45 % Tween 20, pH 8,0) zugegeben und diese über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Die so erhaltene Lösung kann direkt für die Genotypisierungs-PCR (siehe 5.3.1.2, 5.3.1.5 und 5.3.1.3) verwendet werden.

5.3.1.2 Genotypisierungs-PCR für Axonin-Mäuse

Axonin-defiziente Mäuse sind bezüglich der Exons II bis IV des *TAG-1*-Genes deletiert, was der Aminosäuresequenz vom Translationsstart bis zur ersten Ig-Domäne entspricht. Dies führt dazu, dass das TAG-1-Protein nicht mehr produziert wird [Fukamauchi *et al.*, 2001]. Folgender PCR-Ansatz wird zur Genotypisierung von Axonin-Mäusen verwendet:

1 µl *Primer* 5'TAG (50 ng/µl)
 1 µl *Primer* 3'TAG (50 ng/µl)
 1 µl *Primer* 3'Neo (50 ng/µl)
 1 µl 10 % DMSO
 2 µl 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,8)
 0,4 µl 10 mM dNTP-Mix
 1 µl Taq-Polymerase
 1 µl genomische DNA (siehe 5.3.1.1)
 11,6 µl dH₂O

Im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) wird anschließend die PCR bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

3 min	94°C	Vordenaturierung	} 32 Zyklen
30 s	94°C	Denaturierung	
30 s	59°C	<i>Primerannealing</i>	
1 min	72°C	Elongation	
5 min	72°C	Elongation	

Die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte erfolgt mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 5.3.1.6). Das erwartete PCR-Produkt des Wildtypgens ist 450 bp lang, während die Länge des PCR-Produktes von defizienten Mäusen 200 bp beträgt.

5.3.1.3 Genotypisierungs-PCR für Caspr-Mäuse

Caspr-defiziente Mäuse sind bezüglich der ersten sieben Exons des *NCP1*-Genes (Neurexin IV/Caspr/Paranodin) deletiert, so dass kein Caspr-Protein mehr produziert wird [Bhat *et al.*, 2001]. Folgender PCR-Ansatz wird zur Genotypisierung von Caspr-Mäusen verwendet:

1 µl *Primer* NN2 (20 pmol/µl)
 1 µl *Primer* NN3 (20 pmol/µl)
 1 µl *Primer* Ex1-5 (20 pmol/µl)

1 μl *Primer* Ex1-3 (20 pmol/ μl)
 2,5 μl 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,8)
 0,625 μl 10 mM dNTP-Mix
 1 μl Taq-Polymerase
 1 μl genomische DNA (siehe 5.3.1.1)
 15,875 μl dH₂O

Im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) wird anschließend die PCR bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min	95°C	Vordenaturierung	} 30 Zyklen
45 s	95°C	Denaturierung	
1,5 min	64°C	<i>Primerannealing</i>	
1,5 min	72°C	Elongation	
10 min	72°C	Elongation	

Die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte erfolgt mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 5.3.1.6). Das erwartete PCR-Produkt des Wildtypgens ist 363 bp lang, während die Länge des PCR-Produktes von defizienten Mäusen 170 bp beträgt.

5.3.1.4 Genotypisierungs-PCR für CD24-Mäuse

In CD24-defizienten Mäusen wurden der Promotor und das erste Exon des *cd24a*-Gens durch eine Neomycinresistenz-Kassette ersetzt, so dass kein CD24-Protein mehr produziert wird [Wenger *et al.*, 1995]. Folgende PCR-Ansätze werden zur Genotypisierung von CD24-Mäusen verwendet, indem für jede Schwanzbiopsie ein PCR-Ansatz mit *Primern* für defiziente Mäuse und ein Ansatz mit Wildtyp-*Primern* durchgeführt wird:

2 μl *Primer* CD24ko1 (20 pmol/ μl)
 2 μl *Primer* CD24ko2 (20 pmol/ μl)
 2,5 μl 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,8)
 0,625 μl 10 mM dNTP-Mix
 1 μl Taq-Polymerase
 1 μl genomische DNA (siehe 5.3.1.1)
 15,875 μl dH₂O

2 μl *Primer* CD24_21F (20 pmol/ μl)
 2 μl *Primer* CD24_427R (20 pmol/ μl)
 2,5 μl 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,8)
 0,625 μl 10 mM dNTP-Mix
 1 μl Taq-Polymerase
 1 μl genomische DNA (siehe 5.3.1.1)
 15,875 μl dH₂O

Im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) wird anschließend die PCR bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min	95°C	Vordenaturierung	} 30 Zyklen
45 s	95°C	Denaturierung	
1,5 min	63°C	<i>Primerannealing</i>	
1,5 min	72°C	Elongation	
10 min	72°C	Elongation	

Die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte erfolgt mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 5.3.1.6). Das erwartete PCR-Produkt des Wildtypgens ist 400 bp lang, während die Länge des PCR-Produktes von defizienten Mäusen 1150 bp beträgt.

Die Genotypisierung von CD24-Mäusen wurde von Achim Dahlmann (ZMNH) durchgeführt.

5.3.1.5 Genotypisierungs-PCR für Contactin-Mäuse

In Contactin-defizienten Mäusen wurde das Exon 3 des *contactin*-Genes durch eine Neomycinresistenz-Kassette ersetzt, was dazu führt, dass kein F3-Protein mehr produziert wird [Berglund *et al.*, 1999]. Folgender PCR-Ansatz wird zur Genotypisierung von Contactin-Mäusen verwendet:

0,5 µl *Primer* ConFOR (20 pmol/µl)
 0,5 µl *Primer* ConREV (20 pmol/µl)
 0,5 µl *Primer* ConNEO (20 pmol/µl)
 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8,8)
 0,625 µl 10 mM dNTP-Mix
 1 µl Taq-Polymerase
 1 µl genomische DNA (siehe 5.3.1.1)
 18,375 µl dH₂O

Im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) wird anschließend die PCR bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min	95°C	Vordenaturierung	} 30 Zyklen
1 min	95°C	Denaturierung	
1 min	67°C	<i>Primerannealing</i>	
2 min	72°C	Elongation	
10 min	72°C	Elongation	

Die Analyse der erhaltenen PCR-Produkte erfolgt mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe 5.3.1.6). Das erwartete PCR-Produkt des Wildtypgens ist 166 bp lang, während die Länge des PCR-Produktes von defizienten Mäusen 369 bp beträgt.

5.3.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente voneinander zu trennen.

Zur Analyse der Genotypisierungs-PCR-Produkte werden 1,5 %-ige Agarosegele verwendet. Dafür werden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer durch Kochen gelöst, daraus mit Hilfe eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen und dieses nach Erkalten in eine Elektrophoresekammer (*Wide Mini-Sub Cell GT*, Bio-Rad Laboratories GmbH) gelegt. Die PCR-Reaktionen werden mit 5 x Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Standard wird ein 100 bp-Marker (*Quick Load 100 bp DNA Ladder*, New England Biolabs GmbH, 10 µl/Spur) verwendet. Die Elektrophorese wird bei 90 V durchgeführt, bis sich die DNA ausreichend weit aufgetrennt hat. Zur Sichtbarmachung der DNA wird das Gel für 30 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und anschließend unter UV fotografiert (Imagesystem E.A.S.Y. RH Imager, Herolab).

5.3.2 Verhaltensexperimente mit Mäusen

Mit den im Folgenden beschriebenen Verhaltensexperimenten können motorische und koordinatori-sche Fähigkeiten sowie verändertes Angst- bzw. Furchtverhalten von Mäusen analysiert werden.

5.3.2.1 *Open field*-Test

Mit dem *Open field*-Test wird das Explorations- und Lokomotionsverhalten von Mäusen untersucht, indem die zurückgelegte Distanz und die Geschwindigkeit bei freier Bewegung auf einer offenen Fläche gemessen werden. Zusätzlich kann dieser Test zur Messung von Angstverhalten verwendet werden. Da die Mitte einer Fläche ein Angst auslösender Stimulus ist, ist die Thigmotaxis, d. h. die Tendenz, sich entlang der Wand aufzuhalten und zu bewegen, ein Maß für Ängstlichkeit. Die Arena besteht aus einer der Maus unbekanntem, 50 cm x 50 cm großen und mit 40 cm hohen Wänden begrenzten Fläche, die mit weißem Licht (25 Lux) illuminiert wird. Die Tiere werden einzeln in eine Box in einer Ecke der Arena gesetzt. Sie können sich für 15 min frei auf der ganzen Fläche bewegen, nachdem die Box angehoben und entfernt wurde. Videoaufzeichnungen der Bewegungen der Tiere werden erstellt und diese mit Hilfe der Software EthoVision (Noldus Information Technology GmbH) verfolgt. Nach jedem Tier wird die gesamte Ausstattung gereinigt, indem sie zunächst mit Seifenlö-sung, dann mit Wasser und schließlich mit 70 %-igem Ethanol abgewischt wird. Die Fläche der Arena wird virtuell in verschiedene Zonen unterteilt: das Zentrum (20 cm x 20 cm), den inneren (10 cm um das Zentrum) und den äußeren Ringbereich (Rand von 5 cm). Für jedes Tier werden die zurückge-legte Gesamtstrecke, die Durchschnittsgeschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Zonen sowie die Anzahl der hinterlassenen Kotpillen bestimmt.

5.3.2.2 *Pole*-Test

Der *Pole*-Test dient zur Beobachtung motorischer und koordinatorischer Fähigkeiten von Mäusen. Die Tiere werden auf die Spitze einer vertikalen, 60 cm langen, rauhen Holzstange (Durchmesser 7 mm) gesetzt und dazu motiviert, die Stange hinunter zu klettern, indem Nistmaterial aus dem eigenen Käfig am Fuß der Stange platziert wird. Jede Maus wird so auf die Spitze der Stange gesetzt, dass sie sich mit allen vier Pfoten daran festhält und mit dem Kopfende nach oben zeigt. Die Dauer, bis das Tier den Boden erreicht hat, wird gemessen. Außerdem wird die Fähigkeit der Mäuse beobachtet, sich um 180° zu drehen und kopfüber zu klettern. Dazu wird bestimmt, in welchem Drittel der Stange sich die Mäuse drehen.

5.3.2.3 *Beam walking*-Test

Im *Beam walking*-Test werden motorische und koordinatorische Fähigkeiten sowie die Balance von Mäusen ermittelt, indem sie über verschieden breite Stäbe laufen. Dabei wird nur Rotlicht als Be-leuchtung verwendet, um eine Beeinflussung durch zu helles Licht zu vermeiden. Zunächst werden die Mäuse solange darauf trainiert, über eine 2,5 cm breite Latte zu laufen, bis sie ihren eigenen Käfig am gegenüberliegenden Ende der Latte innerhalb von etwa 3 min erreichen. Dann werden die Tiere jeweils in zwei Versuchen mit je drei Wiederholungen getestet. Für den ersten Versuch wird ein 2,5 cm breiter, für den zweiten ein 1 cm breiter Holzstab verwendet. Der Stab ist jeweils 1 m lang und wird in einer Höhe von etwa 50 cm aufgebaut. Die Maus wird auf das Ende des Stabes gesetzt, so dass sie darüber laufen muss, um in den eigenen Käfig zu gelangen. Zwischen den Wiederholungen werden Pausen von jeweils 20 s gemacht. Videoaufzeichnungen werden von hinten aufgenommen, um die Anzahl der Fehlritte der Hinterpfoten zu bestimmen. Jedes Abrutschen einer Pfote wird als Fehltritt definiert. Außerdem wird die Dauer gemessen, bis die Tiere den Käfig erreicht haben.

5.3.2.4 Rotarod-Test

Der *Rotarod*-Test bestimmt die motorische Koordinationsfähigkeit und den Gleichgewichtssinn von Mäusen. Das *Rotarod* (Jones & Roberts, TSE systems) besteht aus einer sich drehenden Walze (3,2 cm Durchmesser). Die Tiere werden auf die Walze gesetzt und die Dauer, bis sie sich fallen lassen, wird bestimmt. Die Mäuse werden jeweils fünfmal am ersten und einmal am zweiten Tag getestet. Die ersten beiden Tests werden bei konstanter Geschwindigkeit (4 rpm) für jeweils maximal 3 min durchgeführt, alle weiteren bei zunehmender Umdrehungszahl (4 bis 40 rpm innerhalb von 4 min) für jeweils maximal 5 min. Nach den ersten beiden Durchgängen wird eine Pause von jeweils mindestens 30 min gemacht, nach dem dritten und vierten von jeweils mindestens 45 min. Am darauffolgenden Tag wird eine Wiederholung mit ansteigender Umdrehungszahl durchgeführt.

5.3.2.5 Fear conditioning-Test

Um das Furchtverhalten von Mäusen zu untersuchen, kann der *Fear conditioning*-Test eingesetzt werden. Dabei werden die Lernfähigkeit und das Furchtgedächtnis der Tiere bestimmt, da emotionale Mäuse besser durch furchtauslösende Stimuli konditioniert werden können. Als Maß für Furcht dient die Immobilität der Tiere, also dass sie abgesehen von Atembewegungen für mindestens 1 s keine Körperbewegungen zeigen (auch als *Freezing* bezeichnet). Die Bestimmung von Bewegungen des Tieres erfolgt mit Hilfe von Infrarotmessungen (Mouse-E-Motion, Infra-e-motion). Mouse-E-Motion besteht aus fünf passiven Infrarotsensoren, die die Infrarotabstrahlung von lebenden Körpern messen und deren Position und Bewegungen detektieren. Damit wird der zeitliche Anteil an Immobilität (*Freezing*) berechnet. Am ersten Tag des Versuchs werden die Tiere in einer Plexiglaskammer mit Schockboden konditioniert, indem sie innerhalb des 4-minütigen Aufenthalts drei elektrische Fußschocks (1 s, 250 μ A, nach 120, 160 und 200 s) erhalten. Dabei dienen die ersten beiden Minuten vor den Fußschocks zur Bestimmung der Basislinie des Furchtverhaltens (*Preconditioning*). In den 40 s nach den Schocks wird das Furchtverhalten direkt nach Konditionierung bestimmt. 24 Stunden nach der Konditionierung (*Recall* und Extinktion, Tag 2) werden die Gedächtnisleistung und Lernfähigkeit gemessen, indem die Mäuse in dieselbe Plexiglaskammer mit Schockboden gesetzt werden, sich dort allerdings für 30 min frei bewegen können, ohne dass sie Schocks ausgesetzt werden. Die ersten 4 min dieser Phase werden verwendet, um die Leistung des Gedächtnisses der Mäuse zu testen, während die letzten 4 min zur Messung der Kurzzeit-Extinktion dienen. Das bedeutet, dass die Mäuse während 30 min lernen können, dass die Kammer keine Gefahr mehr bedeutet. Nach wiederum 24 Stunden (Tag 3) werden die Mäuse erneut für 4 min in dieselbe Kammer gesetzt, ohne dass sie Schocks ausgesetzt werden. Dabei wird untersucht, ob die Mäuse langfristig gelernt haben, dass die Kammer keine Gefahr bedeutet (Langzeit-Extinktion). Die Anzahl der hinterlassenen Kotpillen wird nach jedem Durchlauf gezählt. Bei allen Durchführungen wird eine Beleuchtung mit weißem Licht (10 Lux) verwendet. Nach jeder Benutzung werden Plexiglaskammer und Schockboden mit 70 %-igem Ethanol gereinigt.

6 Ergebnisse

6.1 Optimierung der Aufreinigung von CD24 aus Maushirn

CD24 ist ein Glykoprotein, das mittels GPI-Anker in der Plasmamembran verankert ist. Um Funktionen und Bindungspartner sowie die Glykosylierung des murinen neuronalen CD24 analysieren zu können, wurde es aus Maushirnen isoliert. Die Aufreinigung sollte dafür möglichst effizient sein, da große Mengen des Proteins benötigt wurden. Deshalb wurden verschiedene Parameter der Isolierung getestet und optimiert. Grundlage waren Aufreinigungsprotokolle wie in Kleene *et al.* [2001] und Brendel [2005] beschrieben. Zur Aufreinigung wurden zunächst Maushirne homogenisiert, um eine grobe Membranfraktion herzustellen und Membranproteine daraus mittels Detergenz zu solubilisieren. Aus diesen Solubilisierungen wurde CD24 chromatographisch mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 79 isoliert, die Eluate wurden anschließend umgepuffert und konzentriert. Unter 5.1.4 ist das optimierte Protokoll der Aufreinigung von CD24 aus Maushirn beschrieben.

Zur Optimierung der Aufreinigung wurden für alle Einzelschritte verschiedene Bedingungen getestet, d. h. verschiedene Homogenisierungspuffer, unterschiedliche Kombinationen aus Zentrifugationsschritten zur Erstellung einer Membranfraktion aus dem Homogenat sowie verschiedene Möglichkeiten zur Solubilisierung von CD24 aus der Membran. Außerdem wurden bei der anschließenden Immunaffinitätschromatographie mehrere Elutionspuffer auf ihre Effizienz getestet. Für jede Aufreinigung wurden Hirne von 5 bis 8 Tage alten (P5 - P8) Wildtyp-Mäusen verwendet.

Im ursprünglichen Protokoll zur Isolierung von murinem CD24 aus Maushirn wurde Aceton zur Homogenisierung verwendet [Kleene *et al.*, 2001]. Zunächst wurde getestet, ob dieses Lösungsmittel auch durch gepufferte, physiologische Salzlösung ersetzt werden kann, damit kein reizendes und leicht entzündliches Lösungsmittel mehr zum Einsatz kommt. Als erste Testmethode wurden dazu Maushirne wie in Kleene *et al.* [2001] beschrieben mittels eines Glashomogenisators in Aceton homogenisiert und anschließend mit Hilfe eines Glasfilters und einer Vakuumpumpe wieder davon getrennt. Das erhaltene Gewebepulver wurde nochmals wie beschrieben mit Aceton homogenisiert und gefiltert sowie daraufhin zweimal mit HBS-Puffer gewaschen, indem es darin resuspendiert, für 15 min bei 4°C auf einem Rotor inkubiert und für 15 min bei 4°C und 20000 x g abzentrifugiert wurde. In der zweiten Testmethode wurden Maushirne in 1x PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4 mittels eines Glashomogenisators homogenisiert und direkt für 15 min bei 4°C und 20000 x g abzentrifugiert. Die dritte Methode stellt eine Mischung aus den beiden ersten dar, denn hierbei wurden Maushirne zunächst ebenfalls in 1x PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4 mittels eines Glashomogenisators homogenisiert und für 15 min bei 4°C und 20000 x g abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde allerdings daraufhin in Aceton homogenisiert und gefiltert, das Gewebepulver wiederum mit Aceton homogenisiert und gefiltert sowie daraufhin zweimal mit HBS-Puffer gewaschen (siehe oben) und für 15 min bei 4°C und 20000 x g abzentrifugiert. Zum Vergleich, wie gut sich CD24 mittels dieser drei beschriebenen Möglichkeiten der Homogenisierung aufreinigen lässt, wurden die jeweils erhaltenen 20000 x g-Pellets in 1x HBS, 0,5 % DOC, 0,1 mM PMSF, pH 7,9 resuspendiert und zur Solubilisierung über Nacht bei 4°C auf einem Rotor inkubiert. Der Überstand nach anschließender Zentrifugation für 1 Stunde bei 100000 x g und 4°C wurde mittels α CD24-Antikörper-gekoppelter Sepharosematrix (siehe 5.1.5.1) immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe 5.1.5). Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot auf ihren CD24-Gehalt überprüft. Abbildung 6.1 zeigt das Ergebnis. Dabei

ist zu sehen, dass kaum Unterschiede in der Menge an aufgereinigtem CD24 vorliegen. Da Aceton demnach nicht nötig zu sein scheint, wurde im Folgenden nur die zweite Methode eingesetzt, in der ausschließlich 1x PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4 verwendet wurde.

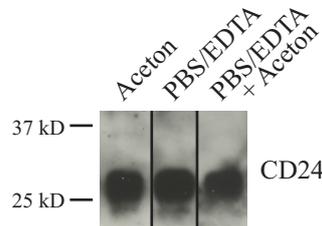


Abbildung 6.1: Test verschiedener Lösungen zur Homogenisierung der Maushirne für die CD24-Aufreinigung

Maushirne wurden in Aceton, PBS/EDTA (1x PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4) oder zunächst in PBS/EDTA und anschließend in Aceton homogenisiert. Nach der Solubilisierung von Membranproteinen wurde CD24 immunaffinitätschromatographisch daraus aufgereinigt. Die Eluate wurden im Westernblot mit dem Antikörper gegen CD24 (79) analysiert.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Kombinationen aus Zentrifugationsgeschwindigkeiten getestet, mit denen aus Hirnhomogenat eine Membranfraktion erstellt wurde. Ursprünglich [Kleene *et al.*, 2001] wurde das Homogenat zunächst bei 20000 x g zentrifugiert, aus dem Pellet Proteine solubilisiert und anschließend bei 100000 x g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde dann zur chromatographischen Aufreinigung verwendet. In eigenen Versuchen erwies es sich allerdings als geeigneter, zwei Zentrifugationsschritte vor der Solubilisierung durchzuführen, um die Menge ungewünschter Proteine zu reduzieren. Dazu wurde das Homogenat zunächst bei 3000 x g zentrifugiert, um Zellkern- und unhomogenisierte Bestandteile zu entfernen. Aus dem 3000 x g-Überstand wurde anschließend durch Zentrifugation die Membranfraktion erstellt (100000 x g-Pellet), die als Ausgangsmaterial für die Solubilisierung verwendet wurde. Durch diese Vorgehensweise wurden die Proteine vorab entfernt, die bei 100000 x g auch ohne Solubilisierung löslich sind. So wurde trotzdem in etwa die gleiche Menge CD24 isoliert, allerdings enthielt die Solubilisierungslösung deutlich weniger andere Proteine als mit der ursprünglichen Methode (Daten nicht gezeigt). Aufgrund geringerer Verunreinigungen wurde die zur Chromatographie verwendete Antikörpersäule geschont und konnte länger verwendet werden.

Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten um Membranproteine in Lösung zu bringen. Deshalb wurden verschiedene Detergenzien und Solubilisierungstemperaturen getestet sowie der Versuch unternommen, CD24 enzymatisch aus der Membranfraktion zu isolieren. Dazu wurde die Membranfraktion aufgeteilt und in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit entweder 1 % DOC und 0,1 % SDS, 1 % CHAPS, 1 % Triton X-100 oder 5 % DOC resuspendiert. Letzteres entspricht dem in Brendel [2005] beschriebenen Solubilisierungspuffer für CD24. Die Solubilisierung erfolgte für eine Stunde auf einem Rotor, wobei der Ansatz mit Triton X-100 bei 37°C, alle anderen bei 4°C inkubiert wurden. Nach Zentrifugation bei 100000 x g wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Westernblot auf ihren CD24-Gehalt überprüft. Abbildung 6.2(a) zeigt die Überstände nach Zentrifugation und es ist zu erkennen, dass mit Triton X-100 bei 37°C die beste Ausbeute erzielt werden konnte. CD24 wird auch *Heat Stable Antigen* (HSA) genannt [Springer *et al.*, 1978]. Aufgrund der Eigenschaft hitzestabil zu sein, wurde zudem getestet, bei welchen höheren Temperaturen sich CD24 am besten solubilisieren lässt, ohne strukturell zerstört zu werden. Die Solubilisierung mit 1 % Triton X-100 wurde deshalb auch bei 80°C, 85°C, 90°C und 95°C durchgeführt. Auch bei 95°C waren keine Unterschiede im Laufverhalten von CD24 im SDS-Gel zu erkennen und bei dieser Temperatur war die Effizienz erwartungsgemäß am höchsten. Abbildung 6.2(b) zeigt, dass nach Solubilisierung bei 37°C

noch einmal in etwa die gleiche Menge CD24 in Lösung gebracht werden kann, wenn eine zweite Solubilisierung im Anschluss daran bei 95°C durchgeführt wird. In das optimierte Aufreinigungsprotokoll für CD24 wurden deshalb mehrere Solubilisierungsschritte aufgenommen: zunächst für etwa 2,5 Stunden bei 37°C, anschließend bei 37°C über Nacht sowie für 30 min bei 95°C (siehe 5.1.4). Zusätzlich zur chemischen Solubilisierung von Membranproteinen gibt es für GPI-verankerte Proteine eine weitere Möglichkeit, sie von der Membran zu trennen. Das Enzym Phospholipase C (PIPLC) ist phosphoinositolphosphat-spezifisch und schneidet im GPI-Anker. Da CD24 GPI-verankert ist, sollte es theoretisch möglich sein, CD24 freizusetzen, indem die Membranfraktion mit PIPLC verdaut wird. Um dies zu testen, wurde wie unter 5.1.10 beschrieben das 100000 x g-Pellet in PIPLC-Puffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 % DOC, pH 7,4) resuspendiert und mit PIPLC versetzt. Zur Kontrolle erfolgte ein Ansatz ohne Enzym. Beide Proben wurden nach dem Verdau bei 100000 x g pelletiert und die Überstände mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den CD24-Gehalt analysiert. Wie in Abbildung 6.2(c) zu erkennen ist, hatte die Behandlung mit PIPLC jedoch keinen großen Einfluss auf die solubilisierete Menge CD24. Da das Enzym zudem relativ teuer ist, wurde dieser Ansatz zur Aufreinigung großer Mengen von CD24 nicht weiterverfolgt.

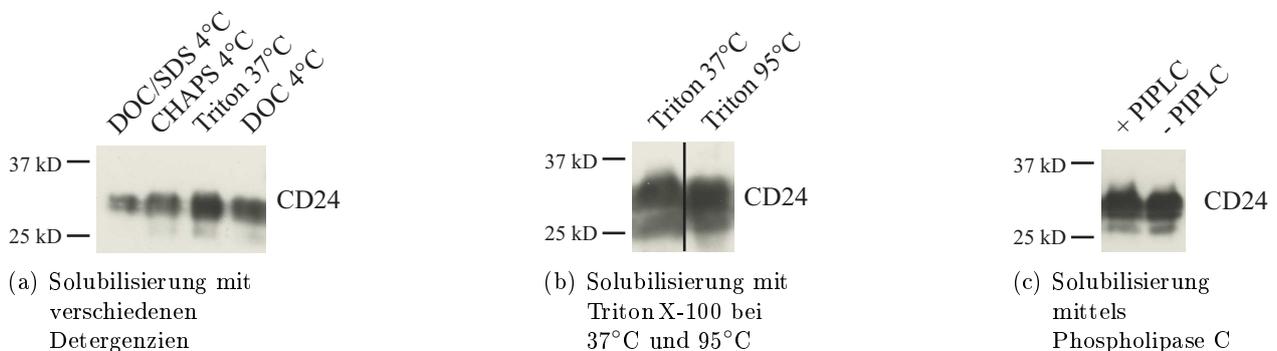


Abbildung 6.2: Test verschiedener Solubilisierungsmöglichkeiten für CD24

In PBS/EDTA (1 x PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4) homogenisierte Maushirne wurden mit verschiedenen Methoden solubilisiert. In allen Fällen wurden anschließend die Überstände nach Zentrifugation bei 100000 x g im Westernblot mit dem Antikörper gegen CD24 (79) analysiert. (a) Als Solubilisierungspuffer wurde 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 1 % DOC und 0,1 % SDS, 1 % CHAPS, 1 % Triton X-100 oder 5 % DOC verwendet. (b) Nach Solubilisierung bei 37°C mit 1 % Triton X-100 erfolgte eine zweite Solubilisierung bei 95°C. (c) Die Membranfraktion wurde in PIPLC-Puffer (25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 % DOC, pH 7,4) resuspendiert und für 1,5 h bei 37°C mit PIPLC verdaut (+ PIPLC). Ein Ansatz ohne Enzym (- PIPLC) erfolgte zur Kontrolle.

Die immunaffinitätschromatographische Aufreinigung von CD24 aus Solubilisierungen von Membranproteinen wurde bereits in Kleene *et al.* [2001] beschrieben. Dabei wird als Elutionspuffer Puffer C (10 mM Ethanolamin, 150 mM NaCl, 0,2 % CHAPS, pH 11,5) verwendet. Davon abweichend wurden als zusätzliche Möglichkeiten der Elution von CD24 verschiedene Salzkonzentrationen (0,8 bis 1,5 M NaCl) sowie Puffer mit unterschiedlicher Detergenzzusammensetzung (Puffer C, Puffer C mit 0,5 % CHAPS oder mit 0,2 % CHAPS und 1 % Triton X-100) getestet. Alle Eluate wurden anschließend neutralisiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den CD24-Gehalt analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.3 dargestellt. In 6.3(a) ist zu erkennen, dass die Elution mit Salz unabhängig von den getesteten Konzentrationen nicht funktioniert und CD24 nur durch Einsatz von Puffer C eluiert werden kann. Außerdem ist die Menge an eluiertem CD24 zwar höher, wenn der Elutionspuffer 0,5 statt 0,2 % CHAPS enthält, allerdings steigt dann auch der Gehalt an von der Matrix gewaschenem α CD24-Antikörper. Deshalb wurde weder die CHAPS-Konzentration erhöht noch zusätzlich Triton X-100 eingesetzt, sondern weiterhin Puffer C als Elutionspuffer verwendet.

Zusammenfassend wurden bei der CD24-Aufreinigung im Vergleich zu den ursprünglichen Proto-

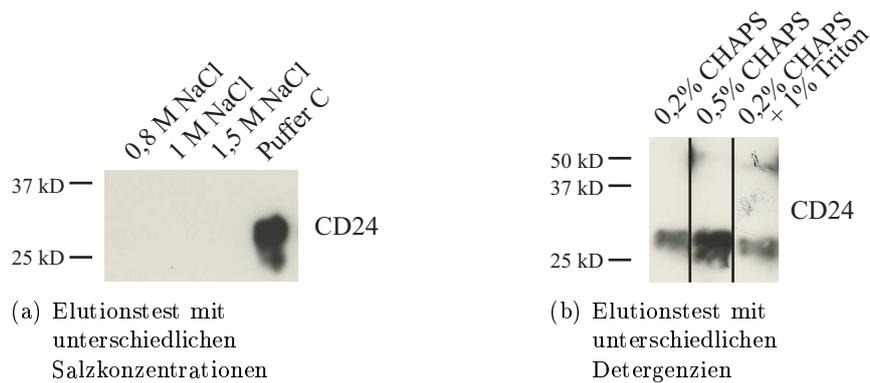


Abbildung 6.3: Test verschiedener Elutionspuffer bei der affinitätschromatographischen CD24-Aufreinigung

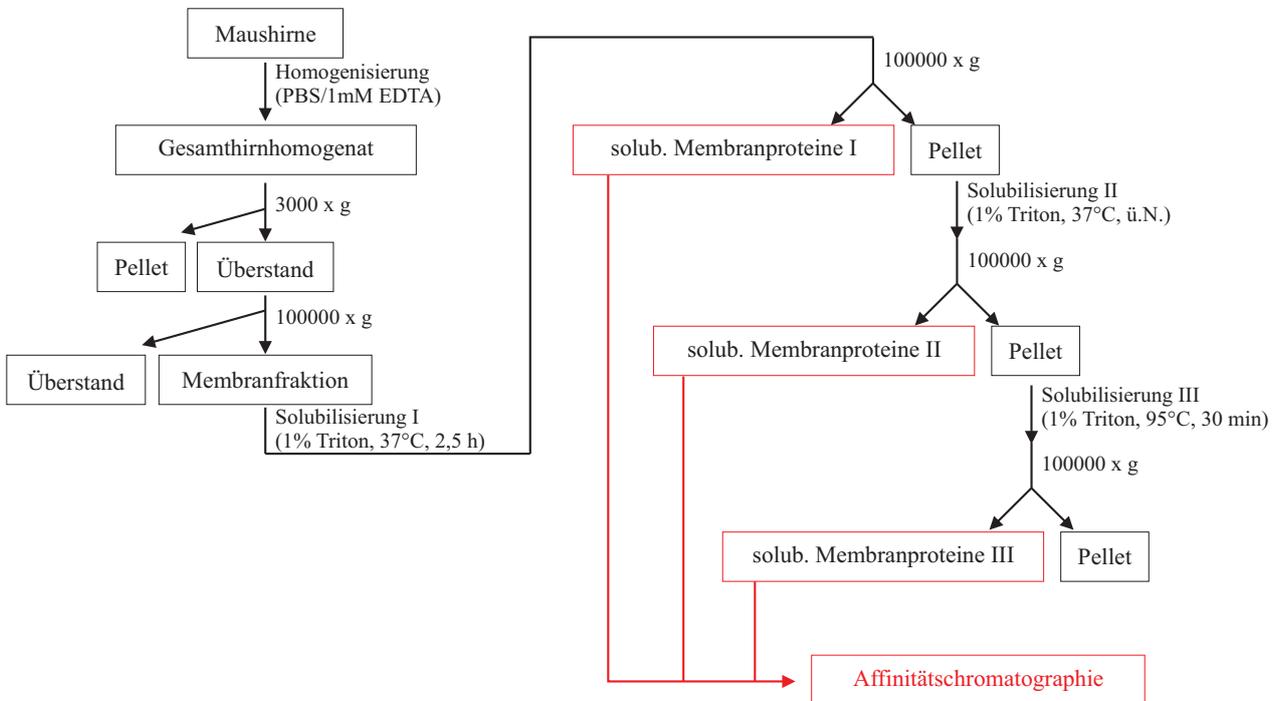
Die Membranfraktion aus Maushirnen wurde solubilisiert und mittels an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppeltem α CD24-Antikörper immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt. Verschiedene Möglichkeiten der Elution wurden im Vergleich zu Elutionspuffer C (10 mM Ethanolamin, 150 mM NaCl, 0,2 % CHAPS, pH 11,5) getestet. Die Eluate wurden anschließend im Westernblot mit dem Antikörper gegen CD24 (79) analysiert. (a) 0,8 bis 1,5 M NaCl (b) Puffer C mit 0,5 % CHAPS oder mit 0,2 % CHAPS und 1 % Triton X-100.

kollen [Brendel, 2005, Kleene *et al.*, 2001] der Homogenisierungspuffer, die Zentrifugationsgeschwindigkeiten, das Detergenz im Solubilisierungspuffer sowie die Temperaturen bei der Solubilisierung geändert. Die so entwickelte optimierte Aufreinigungsmethode ist in 5.1.4 beschrieben und schematisch in Abbildung 6.4(a) dargestellt. In 6.4(b) ist zu sehen, wie nach dem ersten und zweiten Solubilisierungsschritt stets noch CD24 in Lösung gebracht werden kann. Jedoch ist auch zu erkennen, dass sich die Menge an solubilisiertem CD24 nach jedem Schritt verringert. Abbildung 6.4(c) zeigt aufgereinigtes CD24 im Vergleich zu in Gesamthirnhomogenat detektiertem CD24.

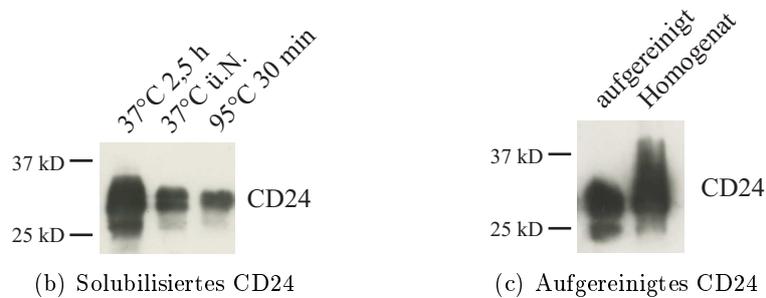
6.2 Trennung der CD24-Glykoformen

CD24 wird im Nervensystem als drei Glykoformen exprimiert, die sich durch unterschiedliche Molekulargewichte auszeichnen [Kleene *et al.*, 2001]. Dies wird dadurch hervorgerufen, dass die Formen unterschiedliche Glykane enthalten: auf O-Glykanen trägt die größte, 33 kD große Glykoform u. a. Lewis^x, α 2,3-Sialinsäure und HNK-1, die mittlere 30 kD große u. a. Lewis^x und α 2,3-Sialinsäure. Auf der kleinsten, 27 kD großen Glykoform lassen sich diese Glykane nicht detektieren [Brendel, 2005]. Die Funktionen, die CD24 im Neuritenwachstum aufweist, sind von Lewis^x und α 2,3-Sialinsäure auf O-Glykanen abhängig. Außerdem wirkt CD24 dabei in *trans* und die beiden großen Glykoformen von CD24, die sowohl Lewis^x als auch α 2,3-Sialinsäure tragen, werden von Gliazellen exprimiert [Brendel, 2005, Kleene *et al.*, 2001]. Daher wird vermutet, dass die verschiedenen Glykoformen von CD24 unterschiedliche Aufgaben besitzen. Um diese Theorie näher zu untersuchen, sollten die drei CD24-Glykoformen voneinander getrennt und einzeln in Neuritenwachstumsexperimenten getestet werden. Dabei wurden verschiedene Möglichkeiten zur Trennung getestet.

Zunächst wurde versucht, die Glykoformen affinitätschromatographisch zu trennen. Antikörper gegen HNK-1 und Lewis^x wurden an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (siehe 5.1.5.1) und Säulen wurden mit diesen Matrices gepackt, um bereits chromatographisch aufgereinigtes Gesamt-CD24 (siehe 5.1.4) wie beschrieben aufzutrennen (siehe 5.1.5.2). Die so erhaltenen Eluate wurden anschließend neutralisiert und mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den CD24-Gehalt hin analysiert. Abbildung 6.5 zeigt das dabei erhaltene Ergebnis. Es ist zu erkennen, dass die Eluate von beiden



(a) Schema der optimierten Aufreinigung von CD24



(b) Solubiliertes CD24

(c) Aufgereinigtes CD24

Abbildung 6.4: Optimierte Aufreinigung von CD24

(a) Darstellung des optimierten Aufreinigungsprotokolls für CD24 aus Maushirn. (b) Die nach drei Solubilisierungsschritten (zunächst 2,5 Stunden bei 37°C, anschließend bei 37°C über Nacht (ü.N.) sowie für 30 min bei 95°C) erhaltenen 100000 x g-Überstände wurden im Westernblot mit dem Antikörper gegen CD24 (79) analysiert. (c) Im Westernblot mit dem Antikörper gegen CD24 (79) detektiertes, fertig aufgereinigtes CD24 im Vergleich zu Gesamthirnhomogenat.

Säulen stets noch alle CD24-Glykoformen enthalten und die Trennung der Formen auf diese Weise nicht funktioniert. Wahrscheinlich ist die homophile Bindung von CD24 dafür verantwortlich, dass auch CD24-Glykoformen, die die entsprechenden Glykane nicht tragen, an die jeweilige Säulenmatrix binden und dann ebenfalls eluiert werden.

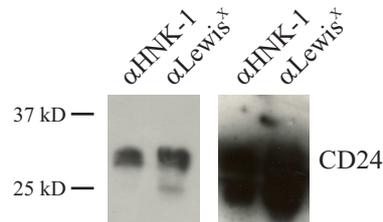


Abbildung 6.5: Versuch der CD24-Glykoformentrennung durch Affinitätschromatographie

Bereits chromatographisch aufgereinigtes Gesamt-CD24 wurde über Säulen mit an Sepharose gekoppelten α HNK-1 bzw. α Lewis^x-Antikörpern aufgetrennt. Die Eluate wurden anschließend mit dem Antikörper gegen CD24 (79) im Westernblot analysiert. Das rechte Bild zeigt einen Film nach längerer Expositionszeit.

Da die Trennung der Glykoformen durch Affinitätschromatographie nicht erfolgreich war, wurde versucht, die Glykoformen mittels Gelelektion anhand ihrer unterschiedlichen Größen voneinander zu trennen. Dazu wurde bereits aufgereinigtes Gesamt-CD24 (siehe 5.1.4) auf einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und daraus wie unter 5.1.7 beschrieben präparativ elektroeluiert. Die einzelnen Fraktionen der Gelelektion wurden wiederum mittels SDS-PAGE und Westernblot auf den CD24-Gehalt analysiert. Abbildung 6.6(a) zeigt die CD24-positiven Fraktionen. Allerdings ist zu sehen, dass auch hier die Glykoformen nicht voneinander getrennt werden konnten. Um eine bessere Auftrennung der CD24-Glykoformen in der SDS-PAGE zu erhalten, wurde außerdem N-deglykosyliertes CD24 verwendet, da die N-Glykane von CD24 ohnehin nicht für die zu untersuchenden Funktionen im Neuritenwachstum nötig sind [Brendel, 2005]. Dafür wurde CD24 wie unter 5.1.9 beschrieben mit PNGase F verdaut, anschließend wieder auf einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und daraus mittels Gelelektion elektroeluiert. Abbildung 6.6(b) zeigt zwar, dass die Molekulargewichte der CD24-Glykoformen nach N-Deglykosylierung kleiner wurden, jedoch war eine Trennung der Formen voneinander auch mit dieser Methode nicht erfolgreich.

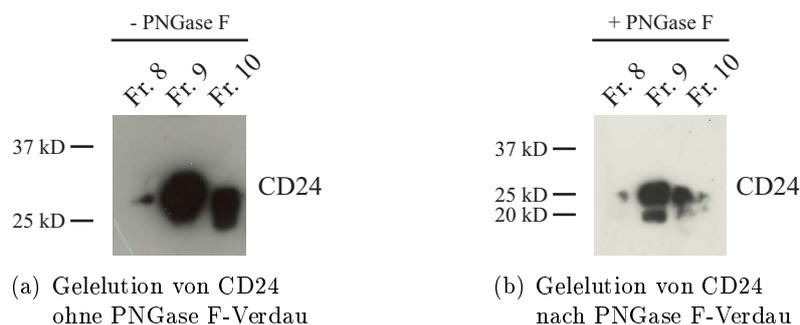


Abbildung 6.6: Versuch der CD24-Glykoformentrennung durch Gelelektion

Bereits chromatographisch aufgereinigtes Gesamt-CD24 wurde auf einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt und daraus präparativ elektroeluiert (Gelelektion). Alle Fraktionen wurden anschließend im Westernblot mit dem Antikörper gegen CD24 (79) analysiert. Gezeigt sind stets nur die CD24-positiven Fraktionen. (a) Unbehandeltes CD24 wurde für die Gelelektion eingesetzt. (b) Das für die Gelelektion verwendete CD24 wurde zuvor durch Verdau mit PNGase F N-deglykosyliert.

Da sich die CD24-Glykoformen in ihren Glykanen unterscheiden und ein Teil der Glykane negativ oder positiv geladen ist, sind die Formen wahrscheinlich unterschiedlich stark negativ geladen. Eine Methode, um unterschiedlich stark negativ geladene Moleküle voneinander zu trennen, ist die Anionenaustauschchromatographie. Proteine mit negativen Ladungen werden dabei unterschiedlich stark gebunden und können durch Elution mittels eines Salzgradienten nacheinander eluiert werden, wobei Proteine mit geringeren Ladungen zuerst eluiert werden. Als dritter Versuch, die CD24-Glykoformen voneinander zu trennen, wurde deshalb eine solche chromatographische Auftrennung von bereits aufgereinigtem Gesamt-CD24 getestet. Zunächst erfolgte ein tryptischer Verdau, um andere Proteine und vor allem den noch in der Aufreinigung enthaltenen α CD24-Antikörper zu entfernen (siehe 5.1.8). Anschließend wurden jeweils etwa 2 mg dieser CD24-Probe über zwei verschiedene Anionenaustausch-Säulen (Mono Q HR 16/10, GE Healthcare Europe GmbH und DNAPac PA100, Dionex Corporation) gegeben und wie unter 5.1.6 beschrieben eluiert. Die Eluate wurden in jeweils 44 Fraktionen à 1,5 ml gesammelt. Da CD24 aufgrund seines kurzen Peptidrückgrats, das keine aromatischen Aminosäuren aufweist, nicht mit Hilfe eines UV-Detektors nachweisbar ist, wurden alle Fraktionen im CD24-ELISA (siehe 5.1.13) getestet, um ein ungefähres Chromatogramm zu erhalten. In Abbildung 6.7 ist beispielhaft das Ergebnis des ELISA mit allen Fraktionen der Mono Q-Säule dargestellt. Dabei ist anzumerken, dass die Absorptionen aller Fraktionen relativ gering sind und sich nur selten stark von der TBS-Negativkontrolle unterscheiden. Die größte Menge an detektierbarem CD24 ist in Fraktion 11 enthalten. Vergleicht man die entsprechende Absorption mit dem als Positivkontrolle eingesetzten CD24 ohne Anionenaustauschchromatographie, so entspricht die in der gesamten Fraktion enthaltene CD24-Menge in etwa 100 ng. Da diese Menge zu gering ist, um CD24 mittels Westernblot zu detektieren, konnte nicht überprüft werden, ob eine Trennung der Glykoformen theoretisch erfolgreich war. Der größte Teil des eingesetzten CD24 ging demnach während der Anionenaustauschchromatographie verloren, wobei der Grund hierfür unbekannt ist. Diese Methode wurde deshalb als ebenfalls ungeeignet für die Trennung der CD24-Formen befunden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen ist, die CD24-Glykoformen voneinander zu trennen. Daher war es nicht möglich, die Funktionen der einzelnen Glykoformen näher zu untersuchen. Alle funktionellen Untersuchungen erfolgten deshalb mit Gesamt-CD24.

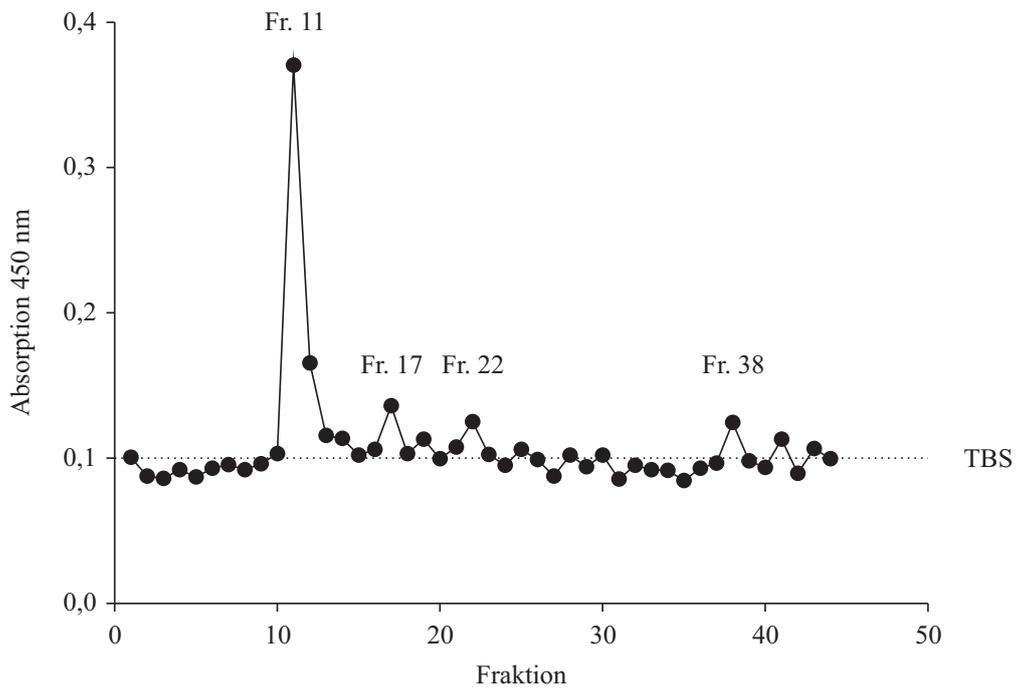


Abbildung 6.7: Versuch der CD24-Glykoformentrennung durch Anionenaustauschchromatographie

Bereits chromatographisch aufgereinigtes Gesamt-CD24 wurde nach tryptischem Verdau durch Anionenaustauschchromatographie mit Hilfe der Mono Q-Säule aufgetrennt. Alle Fraktionen wurden anschließend im ELISA analysiert. Die gestrichelte Linie stellt die Absorption der Negativkontrolle dar, bei der nur TBS-Puffer als Substrat verwendet wurde.

6.3 CD24-vermitteltes Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen

CD24 ist bekannt dafür, dass es das Neuritenwachstum von perinatalen DRG-Neuronen inhibiert und im Gegensatz dazu das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert [Kleene *et al.*, 2001]. Da diese Erkenntnisse Grundlage für die vorliegende Dissertation sind und im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden konnten, sind sie in Abbildung 6.8 dargestellt. Kleinhirnneurone zeigen auf CD24 ein um etwa 50 % verstärktes Neuritenwachstum im Vergleich zur PLL-Kontrolle (siehe Abbildung 6.8(a) und 6.8(b)). Bei DRG-Neuronen ist hingegen eine Inhibition der Neuritenlänge durch CD24 auf etwa 65 % im Vergleich zu PLL-Substrat zu sehen (siehe Abbildung 6.8(c) und 6.8(d)).

Zusätzlich zur Reduktion der Neuritenlänge von DRG-Neuronen durch CD24 wurde außerdem festgestellt, dass auch die Anzahl der Neuriten von DRG-Neuronen auf CD24-Substrat verringert ist. Auf PLL bilden DRG-Neurone im Zeitraum von etwa 24 Stunden im Durchschnitt fast 8 Neuriten pro Zelle, während die Zellen auf CD24 nach dieser Zeit nur durchschnittlich 6,5 Neuriten besitzen. CD24 hemmt also nicht nur das Wachstum der Neuriten, es beeinflusst auch deren Auswachsen.

6.4 Identifikation von TAG-1 und F3 als funktionelle Rezeptoren für CD24

Bei den CD24-vermittelten Neuritenwachstumseffekten sind die glialen Glykoformen von CD24 wichtig, die unter anderem die beiden Glykane α 2,3-Sialinsäure und Lewis^x tragen. Gliales CD24 vermittelt die Neuritenwachstumseffekte in einer zuckerabhängigen *trans*-Interaktion mit neuronalen Proteinen. Die funktionelle Bedeutung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1 im α 2,3-sialinsäureabhängigen, CD24-vermittelten Neuritenwachstum konnte bereits gezeigt und eine direkte Bindung von L1 an α 2,3-Sialinsäure auf CD24 nachgewiesen werden. Als neuronale Rezeptoren, die für Lewis^x-vermittelte Neuritenwachstumseffekte von CD24 verantwortlich sind, konnten aufgrund von Sequenzvergleichen zwischen Adhäsionsmolekülen der L1-Familie und fukosebindenden Pflanzenlektinen die beiden neuronalen Adhäsionsmoleküle TAG-1 und F3 identifiziert werden. Auch eine Bindung von TAG-1 an Lewis^x wurde bereits gezeigt [Brendel, 2005].

Daher ist nun der nächste Schritt, die funktionelle Relevanz von TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum und den Zusammenhang zwischen diesen Proteinen näher zu untersuchen. Dazu wurden Neuritenwachstumsexperimente mit TAG-1- bzw. F3-defizienten Neuronen durchgeführt (siehe 6.4.1). Mittels Immunpräzipitationen (siehe 6.4.2), *Pulldown*-Experimenten (siehe 6.4.3) und immunzytochemischen Experimenten (siehe 6.4.4) wurde außerdem die Interaktion von CD24 mit TAG-1 und F3 untersucht. Schließlich ermöglichten weitere Neuritenwachstumsexperimente die Bestätigung der Lewis^x-Abhängigkeit (siehe 6.4.6) sowie die Identifikation potenzieller Korezeptoren für TAG-1 und F3 (siehe 6.4.7) und die nähere Charakterisierung der Beteiligung von TAG-1 und F3 am CD24-abhängigen Neuritenwachstum (siehe 6.4.5 und 6.4.7).

6.4.1 Funktionelle Relevanz von TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum

Um zu untersuchen, ob TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen funktionell wichtig sind, wurden TAG-1- bzw. F3-defiziente Mäuse verwendet. TAG-1-defiziente Mäuse wurden freundlicherweise von Domna Karagogeos (*Institute of Molecular Biology and Biotechnology and University of Crete Medical School*, Kreta, Griechenland) und F3-defiziente Mäuse von Barbara Ranscht (*Burnham Institute for Medical Research*, La Jolla, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt. Wie in 5.2.1.2 und 5.2.1.3 beschrieben, wurden Einzelzellkulturen

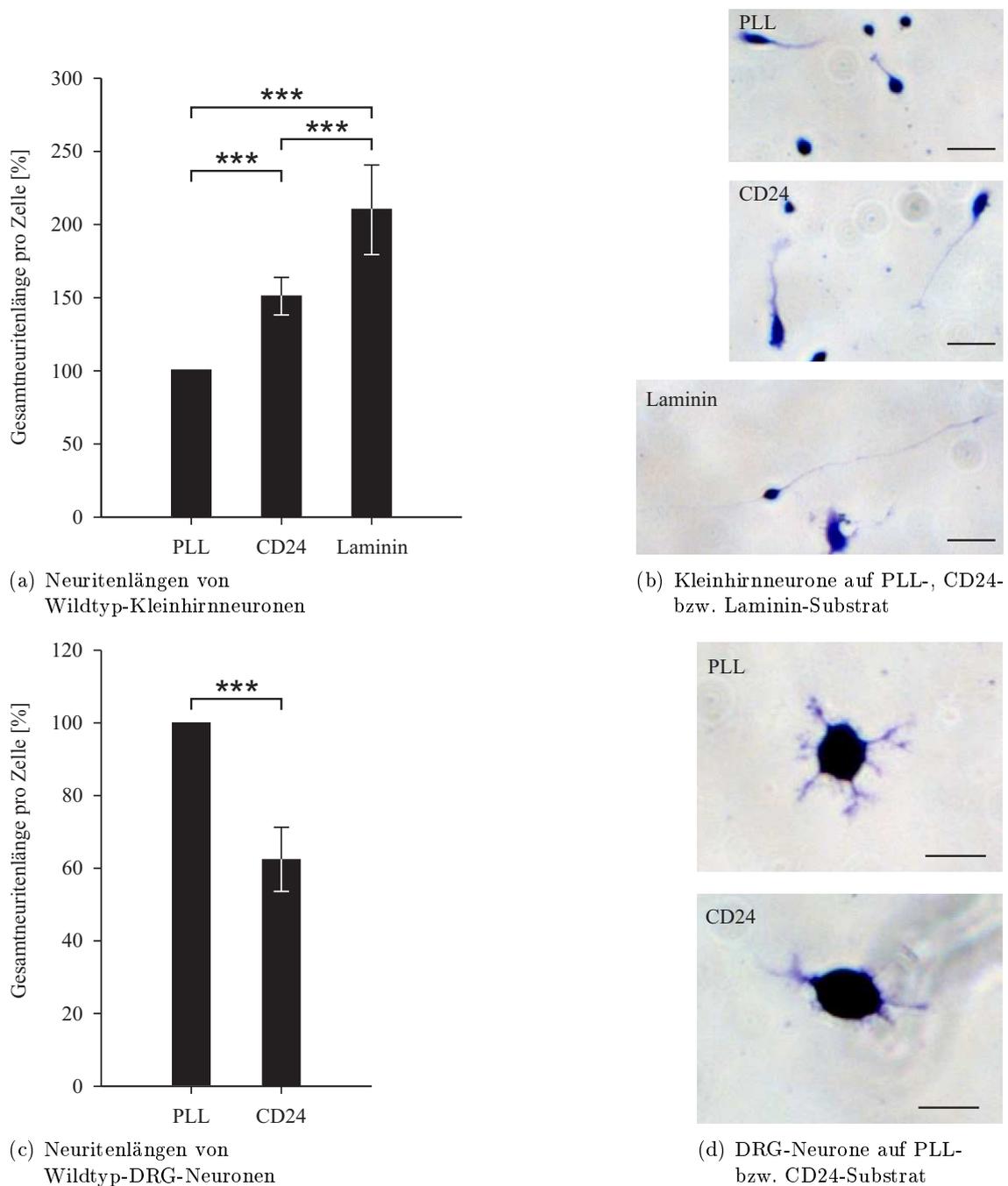


Abbildung 6.8: Neuritenwachstumsförderung bei Kleinhirnneuronen und -inhibition bei DRG-Neuronen durch CD24

Primäre Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen und DRG-Neuronen aus Wildtyp-Mäusen wurden auf PLL, PLL mit CD24 (5 µg/ml) oder PLL mit Laminin (10 µg/ml) als Substrat ausgesät. Nach etwa 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 100 Kleinhirnneuronen bzw. 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gemessen. (a), (c) Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit drei Sternen markiert sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$; Student t-test). (b), (d) Fotografien von Kleinhirnneuronen bzw. DRG-Neuronen, die entweder auf PLL-, CD24- oder Laminin-Substrat ausgesät wurden. Die Skalierungsbalken haben jeweils eine Länge von 20 µm.

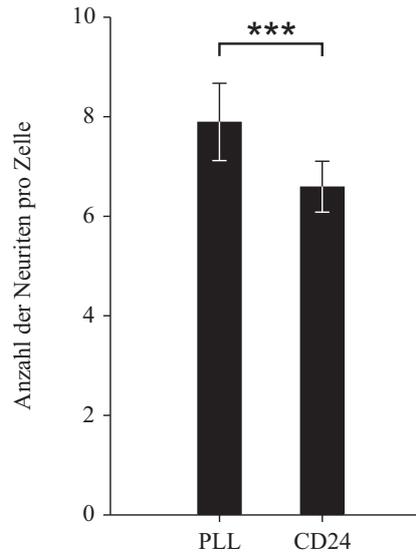


Abbildung 6.9: Neuritenanzahl von Wildtyp-DRG-Neuronen

Primäre Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen aus Wildtyp-Mäusen wurden auf PLL und PLL mit CD24 (5 µg/ml) als Substrat ausgesät. Nach etwa 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die Neuriten von mindestens 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten. Balken, die mit drei Sternen markiert sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$; Student t-test).

von Kleinhirn- und DRG-Neuronen aus diesen defizienten Mäusen sowie aus Wildtyp-Mäusen angefertigt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL, CD24 und im Fall von Kleinhirnneuronen auch auf Laminin als Substrat ausgesät. Anschließend wurde untersucht, wie sich der Genotyp der Mäuse auf die Gesamtneuritenlänge auswirkt, indem diese wie beschrieben gemessen wurde.

In den Abbildungen 6.10 und 6.11 sind die erhaltenen Ergebnisse aus jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Wildtyp-Kleinhirnneurone zeigen auf CD24 ein um etwa 50 % gefördertes Neuritenwachstum im Vergleich zur PLL-Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist eindeutig zu erkennen, dass sowohl in TAG-1- als auch in F3-defizienten Kleinhirnneuronen die CD24-abhängige Förderung des Neuritenwachstums vollständig aufgehoben ist, da die Neuritenlängen auf CD24 in beiden Genotypen den Längen auf PLL entsprechen. Bei Wildtyp-DRG-Neuronen ist die bekannte Reduktion der Neuritenlänge durch CD24-Substrat auf etwa 65 % im Vergleich zu PLL-Substrat zu sehen. Dagegen ist bei DRG-Neuronen von sowohl TAG-1- als auch F3-defizienten Mäusen nur eine teilweise Reduktion der Neuritenlängen auf CD24-Substrat im Vergleich zum Wildtyp vorhanden. In beiden defizienten Genotypen liegen die Neuritenlängen von DRG-Neuronen bei etwa 82 % im Vergleich zu PLL, während sie im Wildtyp bei etwa 65 % liegen.

Aus diesen Beobachtungen folgt, dass sowohl TAG-1 als auch F3 für die Förderung des Neuritenwachstums durch CD24 in Kleinhirnneuronen notwendig ist, wohingegen beide Proteine an der Inhibition des Neuritenwachstums von DRG-Neuronen durch CD24 in etwa zur Hälfte beteiligt sind.

Es ist bereits bekannt, dass L1 für die Vermittlung der CD24-Effekte auf das Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen notwendig ist [Kleene *et al.*, 2001]. Daher ist es möglich, dass die beeinträchtigte Förderung bzw. Inhibition durch CD24 in TAG-1- und F3-defizienten Neuronen durch eine Dysregulation von L1 in diesen Genotypen zustande kommt. Um dies auszuschließen, wurden die Expressionslevel der beteiligten Proteine im Nervensystem von Wildtyp-, TAG-1- und F3-defizienten Mäusen untersucht. Dazu wurde eine grobe Membranfraktion (17000 x g-Pellet) von Gesamthirnhomogenat

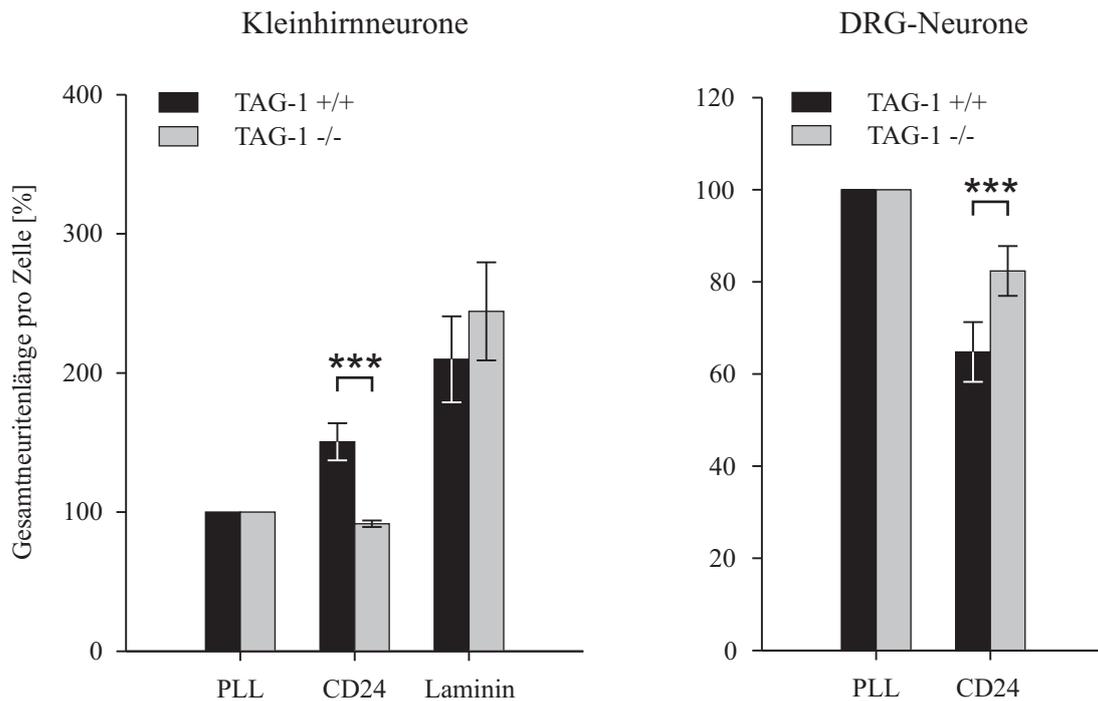


Abbildung 6.10: Funktionelle Relevanz von TAG-1 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen

Primäre Einzelzellkulturen von Kleinhirn- und DRG-Neuronen aus Wildtyp- (+/+) und TAG-1-defizienten (-/-) Mäusen wurden auf PLL, PLL mit CD24 (5 µg/ml) oder PLL mit Laminin (10 µg/ml) als Substrat ausgesät. Nach etwa 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 100 einzelnen Kleinhirnneuronen bzw. 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelexperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit drei Sternen markiert sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$; Student t-test).

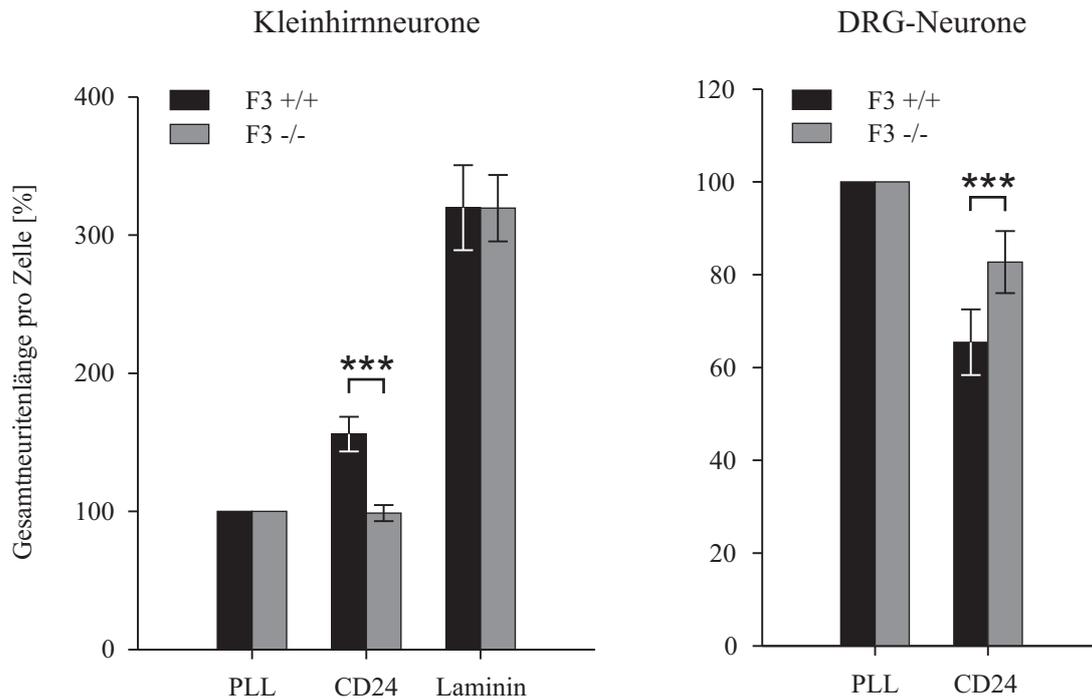


Abbildung 6.11: Funktionelle Relevanz von F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen

Primäre Einzelzellkulturen von Kleinhirn- und DRG-Neuronen aus Wildtyp- (+/+) und F3-defizienten (-/-) Mäusen wurden auf PLL, PLL mit CD24 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder PLL mit Laminin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als Substrat ausgesät. Nach etwa 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 100 einzelnen Kleinhirnneuronen bzw. 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelexperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit drei Sternen markiert sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$; Student t-test).

mogenat dieser Genotypen per SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Ladekontrolle verwendet. In Abbildung 6.12 ist zu sehen, dass die Proteinmengen von CD24 und L1 in allen drei Genotypen vergleichbar sind. Die Mengen von TAG-1 in Wildtyp- und F3-defizienten Hirnen sowie von F3 in Wildtyp- und TAG-1-defizienten Hirnen sind ebenfalls identisch. Durch die jeweilige Defizienz ist TAG-1 jedoch wie erwartet nicht in TAG-1-defizienten und F3 nicht in F3-defizienten Hirnen detektierbar. Diese Kontrolle zeigt, dass die Ergebnisse aus den Neuritenwachstumsexperimenten nicht durch Dysregulation von L1, sondern tatsächlich durch das Fehlen von TAG-1 bzw. F3 zustande kommen.

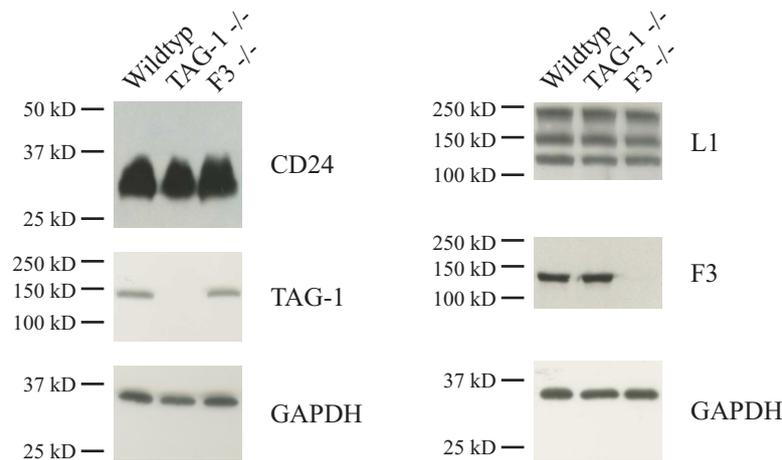


Abbildung 6.12: Kontrolle der Expressionslevel der am CD24-vermittelten Neuritenwachstum beteiligten Proteine

Pro Spur wurden 50 µg Membranfraktion von Wildtyp-, TAG-1- und F3-defizienten (-/-) Mäusen aufgetragen und in Westernblots mit Antikörpern gegen CD24 (79), TAG-1 (TG3), F3 (F3 Kaninchen) oder L1 (αL1 poly) analysiert. Als Ladekontrolle wurden die Membranen zusätzlich mit αGAPDH-Antikörper detektiert.

6.4.2 Assoziation von TAG-1 und F3 mit CD24 im Kleinhirn

Die Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3 sind funktionell wichtig für das CD24-vermittelte Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen (siehe 6.4.1). Daher liegt es nahe, die physiologische Assoziation der beiden Proteine mit CD24 zu untersuchen. Dazu wurden Immunpräzipitationen aus Kleinhirn- und Hinterwurzelgewebe durchgeführt. Da die Ausbeute bei der Präparation von Hinterwurzelgewebe relativ gering und dieses Gewebe schwer zu homogenisieren ist, waren alle Versuche der Immunpräzipitation aus diesem Gewebe erfolglos (Daten nicht gezeigt). Deshalb werden im Folgenden nur die Ergebnisse der Immunpräzipitationen aus Kleinhirngewebe dargestellt. Für DRG-Neuronen wurde für diesen Zweck ein anderer Versuchsansatz gewählt (siehe 6.4.4).

Dazu wurde zunächst wie in 5.1.11 beschrieben eine grobe Membranfraktion von Kleinhirnhomogenat nach *Pre-clearing* mit dem αCD24-Antikörper bzw. unspezifischen IgGs oder nur PBS als Negativkontrollen inkubiert. Durch die Verwendung von Protein G *Beads* wurden die gebildeten Protein-Antikörper-Komplexe isoliert und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Abbildung 6.13(a) zeigt die erhaltenen Ergebnisse nach der Detektion von CD24, TAG-1 und F3. Wie erwartet ist eine Präzipitation von CD24 mittels des αCD24-Antikörpers zu sehen. Zusätzlich konnten allerdings auch die beiden Proteine TAG-1 und F3 spezifisch mit dem αCD24-Antikörper co-immunpräzipitiert werden. In allen Fällen sind keine Banden bei den Negativkontrollen ohne Antikörper bzw. mit unspezifischen IgGs zu sehen. Zusätzlich wurde CHL1 als Negativkontrolle verwendet, da

dieses Protein nicht mit CD24 assoziiert ist und deshalb nicht mittels α CD24-Antikörper präzipitiert werden kann.

Um dieses Ergebnis abzusichern, wurde die gleiche Immunpräzipitation auch umgekehrt durchgeführt. Dazu wurden α TAG-1- und α F3-Antikörper für die Präzipitation verwendet und wiederum die gebildeten Protein-Antikörper-Komplexe mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert, indem CD24, TAG-1 und F3 detektiert wurden. Aus Abbildung 6.13(b) ist ersichtlich, dass auch diese Immunpräzipitationen spezifisch waren, da sich TAG-1 mit α TAG-1-Antikörper und F3 mit α F3-Antikörper isolieren lassen, während in den Negativkontrollen keine Banden zu sehen sind. Außerdem ist zu erkennen, dass die beiden Proteine miteinander assoziiert sind, da sie sich beide mit dem jeweils anderen co-immunpräzipitieren lassen. Die Detektion von CD24 zeigt außerdem, dass auch CD24 mit beiden Proteinen co-immunpräzipitiert werden kann. CHL1 diente auch hier als Negativkontrolle und ist weder mit TAG-1 noch mit F3 assoziiert.

Die Ergebnisse aus den durchgeführten Immunpräzipitationen zeigen, dass sowohl TAG-1 als auch F3 mit CD24 im Kleinhirn assoziiert ist. Außerdem treten TAG-1 und F3 zusammen in einem Komplex auf.

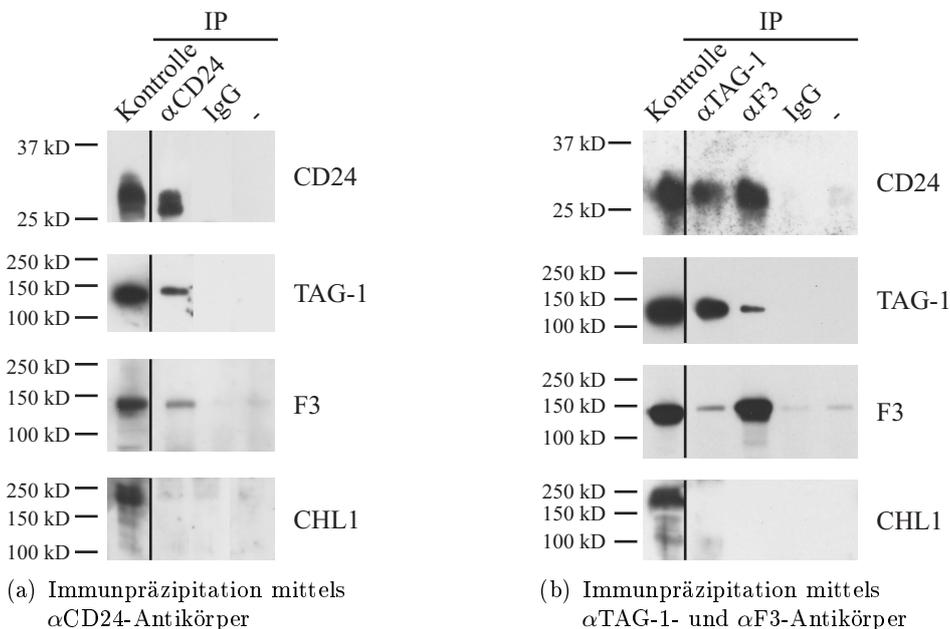


Abbildung 6.13: Assoziation von TAG-1 und F3 mit CD24 im Kleinhirn

Immunpräzipitationen aus dem 17000 x g-Pellet von Kleinhirnhomogenat. (a) IP mittels α CD24-Antikörper (79), unspezifischer IgGs aus Ratte oder ohne Antikörper (-). (b) IP mittels α TAG-1-Antikörper (α human Contactin-2), α F3-Antikörper (α human Contactin-1), unspezifischer IgGs aus Ziege oder ohne Antikörper (-). Die Immunpräzipitate wurden in Westernblots mit Antikörpern gegen CD24 (79), TAG-1 (TG3), F3 (F3 Kaninchen) oder CHL1 analysiert. Zur Kontrolle wurden 10 μ g des 17000 x g-Pellets von Kleinhirnhomogenat aufgetragen.

6.4.3 Bindung von TAG-1 und F3 an CD24

Die physiologische Assoziation von CD24, TAG-1 und F3 im Kleinhirn (siehe 6.4.2) und ihr funktioneller Zusammenhang bei Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen (siehe 6.4.1) werfen die Frage auf, ob diese Proteine durch direkte Interaktion oder indirekt über weitere Rezeptoren miteinander wirken. Um diese Frage zu beantworten wurden *Pulldown*-Experimente durchgeführt. Wie in 5.1.12 beschrieben, wurde aufgereinigtes CD24 dazu an magnetische *Beads* gekoppelt und mit F3-

Fc bzw. TAX-1-Fc (humanes Analogon zu TAG-1-Fc) inkubiert. Humanes Fc und CHL1-Fc wurden als Negativkontrollen verwendet. Nach dem Waschen der *Beads* wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot untersucht, welche der verwendeten Proteine spezifisch an CD24-*Beads* binden, indem zur Detektion des Fc ein humaner Sekundärantikörper verwendet wurde.

Abbildung 6.14 zeigt das erhaltene Ergebnis. Auf der linken Seite (Kontrolle) sind alle verwendeten Proteine zu sehen: TAX-1-Fc und F3-Fc bei etwa 150 kD, humanes Fc bei etwa 30 kD und CHL1-Fc bei etwa 210 kD. Auf der rechten Seite wurden die *Beads* nach *Pulldown* auf das SDS-Gel aufgetragen. In diesen Proben sind nur TAX-1-Fc und F3-Fc nachweisbar. Diese beiden Proteine wurden also spezifisch durch CD24-*Beads* gebunden, während humanes Fc alleine und CHL1-Fc nicht mit CD24-*Beads* interagieren konnten.

Damit wurde gezeigt, dass sowohl TAG-1 als auch F3 in der Lage ist, direkt an CD24 zu binden.

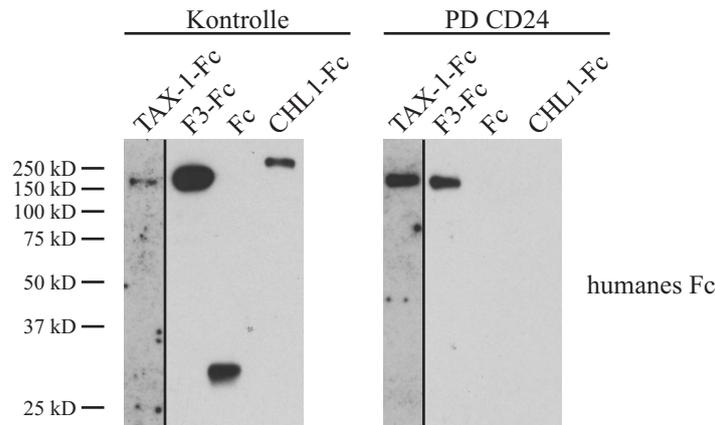


Abbildung 6.14: Bindung von TAG-1 und F3 an CD24

CD24 wurde an magnetische *Dynabeads* M-270 Epoxy gekoppelt und im *Pulldown* mit aufgereinigtem TAX-1-Fc, F3-Fc oder als Kontrollen mit CHL1-Fc oder Fc alleine inkubiert. Die nach *Pulldown* erhaltenen *Beads* (PD CD24) wurden im Westernblot analysiert, indem zur Detektion von Fc α Human-Sekundärantikörper verwendet wurde. Zur Kontrolle wurden die aufgereinigten Fc-Proteine ohne Inkubation mit *Beads* detektiert (links).

6.4.4 Bindung von CD24 an TAG-1/L1- und F3/L1-Komplexe auf Hinterwurzelganglienneuronen in Kultur

Eine direkte Bindung von CD24 an TAG-1 und F3 im *Pulldown* (siehe 6.4.3) sowie die physiologische Assoziation der drei Proteine konnte für Kleinhirngewebe bereits mittels Immunpräzipitationen gezeigt werden (siehe 6.4.2). Da es aufgrund geringer Proteinmengen nicht möglich war, Immunpräzipitationen auch aus Hinterwurzelgewebe durchzuführen, wurde für diesen Zelltyp eine andere Methode gewählt, um eine physiologische Assoziation von CD24 mit L1, TAG-1 und F3 zu untersuchen. Dazu wurden immunzytochemische Experimente mit primärkultivierten DRG-Neuronen durchgeführt, für die zusätzlich an fluoreszierende *Beads* gekoppeltes CD24 eingesetzt wurde, um eine Interaktion in *trans* zu analysieren.

Wie unter 5.2.1.7 beschrieben, wurde CD24 an Carboxylat-modifizierte *Fluospheres* gekoppelt. Ungekoppelte *Fluospheres* dienten als Negativkontrolle. Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen wurden wie in 5.2.1.3 beschrieben aus Wildtyp-Mäusen angefertigt und auf PLL ausgesät. Nach etwa 48-stündiger Kultivierung wurden CD24- bzw. Kontroll-*Fluospheres* zu den Zellen gegeben und damit für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurden ungebundene *Beads* durch Waschen entfernt, die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen L1 und TAG-1 bzw. F3 angefärbt. Proben oh-

ne Primärantikörper wurden als Kontrollen mitgeführt, um die Spezifität der Antikörperfärbungen zu testen. Zum Nachweis der verwendeten Primärantikörper dienten fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper. Unter einem konfokalen Mikroskop wurden die Zellen anschließend betrachtet.

Abbildung 6.15 zeigt exemplarische Zellen, die durch diese Experimente entstanden. Dabei ist zunächst zu erkennen, dass L1 sowohl mit TAG-1 (Abbildung 6.15(a) und 6.15(c)) als auch mit F3 (Abbildung 6.15(b) und 6.15(c)) in regelmäßigen Komplexen entlang der Neuriten auftritt. Diese haben meist einen Abstand von 20 bis 25 μm . Außerdem ist deutlich zu sehen, dass mit CD24 gekoppelte *Fluospheres* vorzugsweise an diese Komplexe binden (Abbildung 6.15(a) und 6.15(b)), während Kontroll-*Fluospheres* (Abbildung 6.15(c)) kaum an Zellen zu finden sind, und wenn, dann nicht an den beschriebenen Komplexen. In den Proben ohne Primärantikörper waren keine Färbungen sichtbar, so dass die Spezifität dieser Immunzytochemie gewährleistet ist (nicht gezeigt).

Diese immunzytochemischen Experimente zeigen, dass CD24 in *trans* mit neuronalen Proteinkomplexen auf kultivierten DRG-Neuronen, die L1 und TAG-1 bzw. L1 und F3 enthalten, interagiert. Auch für DRG-Neurone ist somit eine physiologische Assoziation von CD24 mit TAG-1 und F3 gegeben.

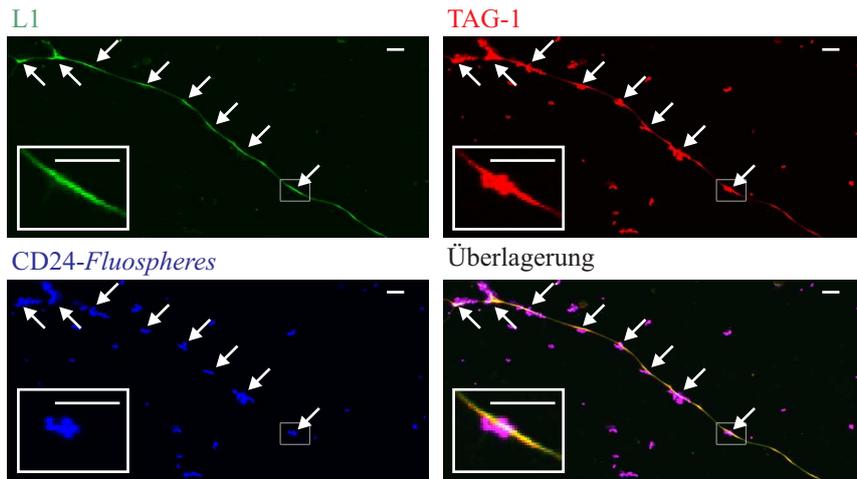
6.4.5 Synergistische Wirkung von TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen

Die in 6.4.1 beschriebenen Neuritenwachstumsversuche mit TAG-1- und F3-defizienten Hinterwurzelganglienneuronen zeigen, dass CD24 in beiden defizienten Situationen im Vergleich zum Wildtyp eine etwa um die Hälfte verringerte Inhibition der Neuritenlängen verursacht. Daher ist es möglich, dass TAG-1 und F3 jeweils für eine Hälfte der CD24-vermittelten Inhibition des Neuritenwachstums von DRG-Neuronen verantwortlich sind. Das wiederum würde bedeuten, dass bei TAG-1-defizienten Neuronen noch der Resteffekt der F3-vermittelten Inhibition zu sehen ist, während bei F3-defizienten Neuronen die TAG-1-vermittelte Inhibition sichtbar bleibt. Interessant wäre es also, DRG-Neuronen von Mäusen zu untersuchen, die sowohl TAG-1- als auch F3-defizient sind. Unveröffentlichte Daten (Andrew Furley, *University of Sheffield*, UK und Barbara Ranscht, *Burnham Institute for Medical Research*, La Jolla, Kalifornien, USA) zeigen allerdings, dass dies nicht möglich ist, da die Defizienz für beide Proteine zu perinataler Lethalität führt.

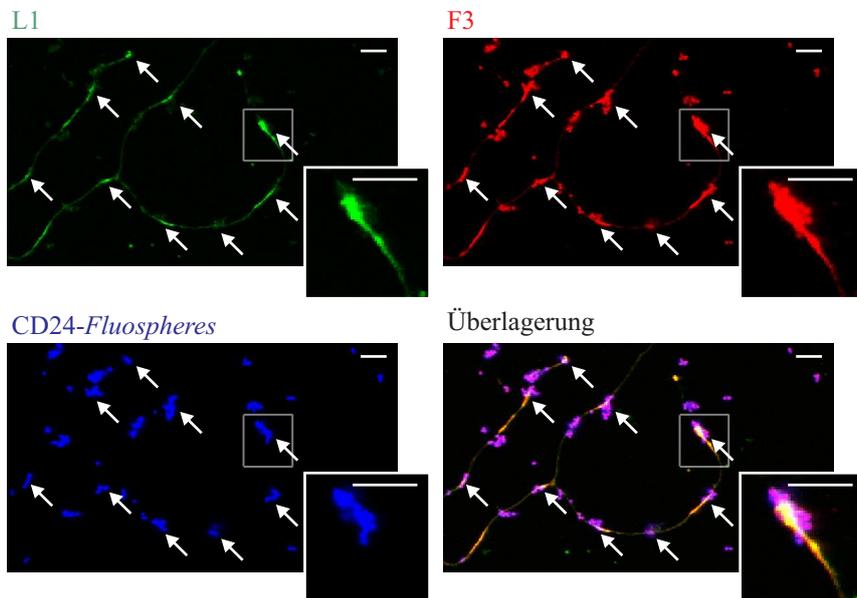
Daher wurde ein anderer Versuch gewählt, um eine Situation zu imitieren, in der weder TAG-1 noch F3 vorhanden ist. Dazu wurden Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen wie in 5.2.1.3 beschrieben aus Wildtyp-Mäusen angefertigt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL und CD24 ausgesät. Zusätzlich wurden etwa eine Stunde nach dem Aussäen der Zellen Antikörper gegen TAG-1 und F3 jeweils 1:1000 verdünnt zugegeben, um Bindungen und damit Funktionen dieser beiden Proteine zu blockieren.

Die Zugabe beider Antikörper hatte keinen Einfluss auf die Neuritenlänge der DRG-Neurone auf PLL-Substrat (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 6.16 dargestellt, war es dagegen möglich, die jeweilige defiziente Situation durch Zugabe von TAG-1- bzw. F3-Antikörper nachzuahmen, da die Neuritenlängen auf CD24 von etwa 64 % ohne Antikörper auf jeweils etwa 80 % mit α TAG-1- bzw. α F3-Antikörper steigen und damit in etwa der Länge der defizienten Neurone auf CD24 entsprechen (siehe 6.4.1). Außerdem ist zu erkennen, dass die CD24-Inhibition durch Zugabe beider Antikörper vollständig aufgehoben werden kann, da die Neuritenlänge auf CD24 durch die Kombination beider Antikörper auf 100 % steigt und damit PLL-Niveau entspricht.

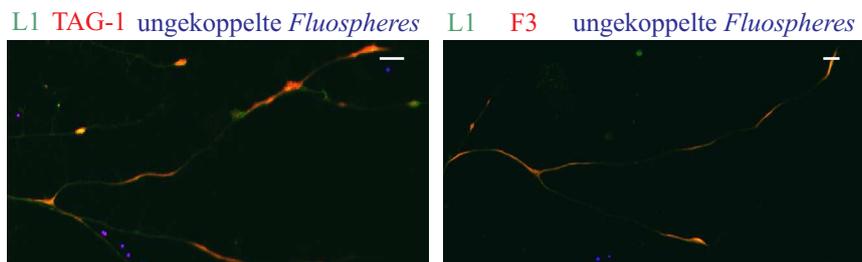
Dieser Versuch bestätigt, dass TAG-1 und F3 jeweils für eine Hälfte der CD24-vermittelten Inhibition des Neuritenwachstums von DRG-Neuronen verantwortlich sind. Bei TAG-1-defizienten Neuronen ist also der Resteffekt der F3-vermittelten Inhibition zu sehen, während bei F3-defizienten Neuronen die TAG-1-vermittelte Inhibition übrig bleibt. TAG-1 und F3 wirken damit synergistisch



(a) Färbung von L1 und TAG-1 mit CD24-Fluospheres



(b) Färbung von L1 und F3 mit CD24-Fluospheres



(c) Überlagerungen der Färbungen von L1 und TAG-1 bzw. F3 mit ungekoppelten Fluospheres

Abbildung 6.15: Immunzytochemie mit kultivierten DRG-Neuronen

Wildtyp-DRG-Neurone wurden kultiviert und mit CD24-gekoppelten bzw. ungekoppelten *Fluospheres* inkubiert. Anschließend wurden L1 und TAG-1 bzw. F3 immunzytochemisch angefärbt. Die Pfeile markieren Komplexe aus CD24-*Fluospheres*, L1 und TAG-1 bzw. F3. Die eingerahmten Bereiche wurden zudem vergrößert dargestellt. Die Skalierungsbalken haben jeweils eine Länge von 10 µm.

im CD24-vermittelten Neuritenwachstum, d. h. die CD24-Inhibition in der Wildtyp-Situation stellt die Summe aus beiden Einzeleffekten dar.

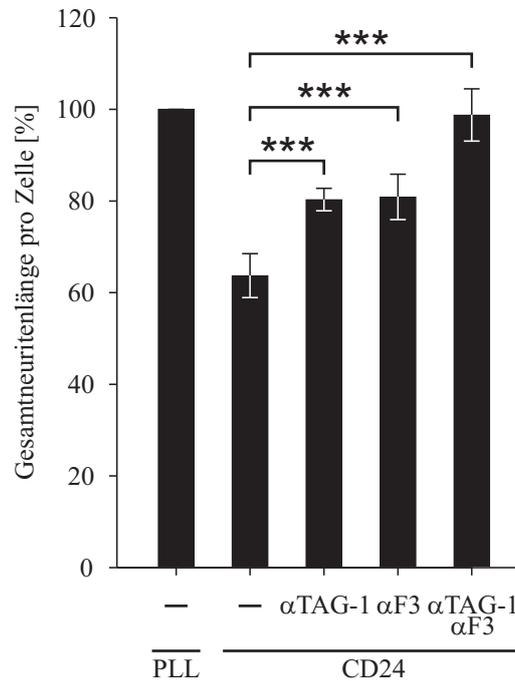


Abbildung 6.16: Synergistische Wirkung von TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Wildtyp-DRG-Neuronen

Primäre Einzelzellkulturen von Wildtyp-DRG-Neuronen wurden auf PLL oder PLL mit CD24 (5 µg/ml) als Substrat ausgesät und in Gegenwart von jeweils 1:1000 verdünnten Antikörpern gegen TAG-1 (αhuman Contactin-2) und F3 (αhuman Contactin-1) für etwa 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelexperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit drei Sternen markiert sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$; Student t-test).

6.4.6 Lewis^x-Abhängigkeit des TAG-1- und F3-vermittelten Neuritenwachstums von Hinterwurzelganglienneuronen auf CD24

Wie in 6.4.5 gezeigt, sind TAG-1 und F3 jeweils für eine Hälfte der CD24-vermittelten Inhibition des Neuritenwachstums von Hinterwurzelganglienneuronen verantwortlich. Das wiederum bedeutet, dass bei TAG-1-defizienten Neuronen noch der Resteffekt der F3-vermittelten Inhibition zu sehen ist, während bei F3-defizienten Neuronen die TAG-1-vermittelte Inhibition sichtbar bleibt. Sowohl TAG-1 als auch F3 wurden ursprünglich als potenzielle Lewis^x-Rezeptoren identifiziert [Brendel, 2005]. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde untersucht, ob die jeweiligen Resteffekte in den defizienten DRG-Neuronen tatsächlich Lewis^x-abhängig sind. Dazu wurden erneut Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen wie in 5.2.1.3 beschrieben aus TAG-1- und F3-defizienten sowie aus Wildtyp-Mäusen angefertigt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL und CD24 ausgesät. Zusätzlich wurden etwa eine Stunde nach dem Aussäen der Zellen die Zucker Lewis^x oder Lewis^a in einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben. Für Wildtyp-Primärzellen wurde bereits gezeigt, dass sich spezifisch durch die Zugabe von Lewis^x der positive bzw. negative Effekt von CD24 auf das Neuritenwachstum von Kleinhirn- bzw. DRG-Neuronen aufheben lässt [Brendel, 2005].

Wie in Abbildung 6.17 dargestellt, ließ sich dieses Ergebnis hier reproduzieren. Bei Wildtyp-DRG-Neuronen kann die mittlere Neuritenlänge auf CD24 von etwa 62 % im Vergleich zum PLL-Niveau nur durch Zugabe von Lewis^x auf 100 % angehoben werden, so dass sie der auf PLL entspricht. Die Zugabe von Lewis^a hat dagegen keinen Effekt auf die mittlere Neuritenlänge. Interessanterweise ist es auch bei TAG-1- und F3-defizienten DRG-Neuronen möglich, den jeweils übrigen Inhibitionseffekt von CD24 durch Lewis^x aufzuheben. Abbildung 6.17(a) zeigt, dass bei TAG-1-defizienten DRG-Neuronen die Neuritenlängen auf CD24 von etwa 75 % im Vergleich zum PLL-Niveau nur durch Zugabe von Lewis^x auf 100 %, d. h. PLL-Niveau, angehoben werden kann. Analog steigt die mittlere Neuritenlänge von F3-defizienten Neuronen auf CD24 von etwa 79 % durch Zugabe von Lewis^x auf PLL-Niveau (siehe Abbildung 6.17(b)). Die Zugabe von Lewis^a hat in beiden Fällen hingegen kaum einen Effekt auf die Längen. Außerdem zeigte keines der Glykane einen Einfluss auf die Neuritenlängen auf PLL-Substrat.

Diese Experimente zeigen, dass die restlichen Inhibitionseffekte von CD24 in TAG-1- bzw. F3-defizienten DRG-Neuronen Lewis^x-abhängig sind. Da also bei TAG-1-defizienten Neuronen noch der Resteffekt der F3-vermittelten Inhibition zu sehen ist und bei F3-defizienten Neuronen die TAG-1-vermittelte Inhibition übrig bleibt, folgt daraus, dass sowohl die TAG-1- als auch die F3-vermittelte Inhibition durch CD24 Lewis^x-abhängig ist. Beide Proteine sind damit funktionelle Rezeptoren für Lewis^x auf CD24.

6.4.7 Caspr bzw. Caspr2 als mögliche Korezeptoren von F3 bzw. TAG-1 bei CD24-vermitteltem Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen

Die beiden Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3 sind mittels GPI-Anker mit der äußeren Zellmembran verknüpft [Gollan *et al.*, 2003, Zuellig *et al.*, 1992]. Da sie somit keine Transmembrandomäne besitzen, haben sie keinen direkten Kontakt mit dem intrazellulären Raum und können nur indirekt über transmembranäre Bindungspartner Signale ins Zellinnere weiterleiten. Wie in 6.4.1 gezeigt, sind beide Proteine aber funktionell wichtig für die Vermittlung der CD24-abhängigen Promotion bzw. Inhibition von Neuritenwachstum. In Hinterwurzelganglienneuronen wirken TAG-1 und F3 zudem synergistisch in der CD24-Inhibition der Neuritenlänge (siehe 6.4.5). Es stellt sich also die Frage, über welche Korezeptoren TAG-1 und F3 dieses inhibitorische Signal weiterleiten. DRG-Neurone sind Teil des peripheren Nervensystems und durch Schwannzellen mit einer Myelinscheide versehen [Chan *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 1994]. Dabei treten unter anderem F3 und Caspr zusammen auf, während TAG-1 zusammen mit Caspr2 einen Komplex bildet [Bonnon *et al.*, 2007, Poliak *et al.*, 2003, Traka *et al.*, 2003, Faivre-Sarrailh *et al.*, 2000]. Da TAG-1 und F3 in der Vermittlung der CD24-abhängigen Inhibition des Neuritenwachstums von DRG-Neuronen ebenfalls einzeln auftreten, besteht die Möglichkeit, dass der Grund dafür die unterschiedliche Lokalisierung dieser beiden Proteine darstellt. Damit sind Caspr und Caspr2 gute Kandidaten als Korezeptoren für F3 bzw. TAG-1.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen wie in 5.2.1.3 beschrieben aus TAG-1- und F3-defizienten sowie aus Wildtyp-Mäusen angefertigt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL und CD24 ausgesät. Zusätzlich wurden etwa eine Stunde nach dem Aussäen der Zellen Antikörper gegen TAG-1 und F3 sowie gegen Caspr und Caspr2 jeweils 1:1000 verdünnt zugegeben, um Bindungen und damit Funktionen dieser beiden Proteine zu blockieren. Ein Antikörper gegen L1 wurde als Positivkontrolle verwendet, da für L1 bereits gezeigt wurde, dass es für die CD24-Inhibition des Neuritenwachstum von DRG-Neuronen essenziell ist [Kleene *et al.*, 2001].

Keiner der Antikörper hatte einen Einfluss auf die Neuritenlängen der DRG-Neurone auf PLL-Substrat (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 6.18(a) ist die Wirkung aller Antikörper auf die Neu-

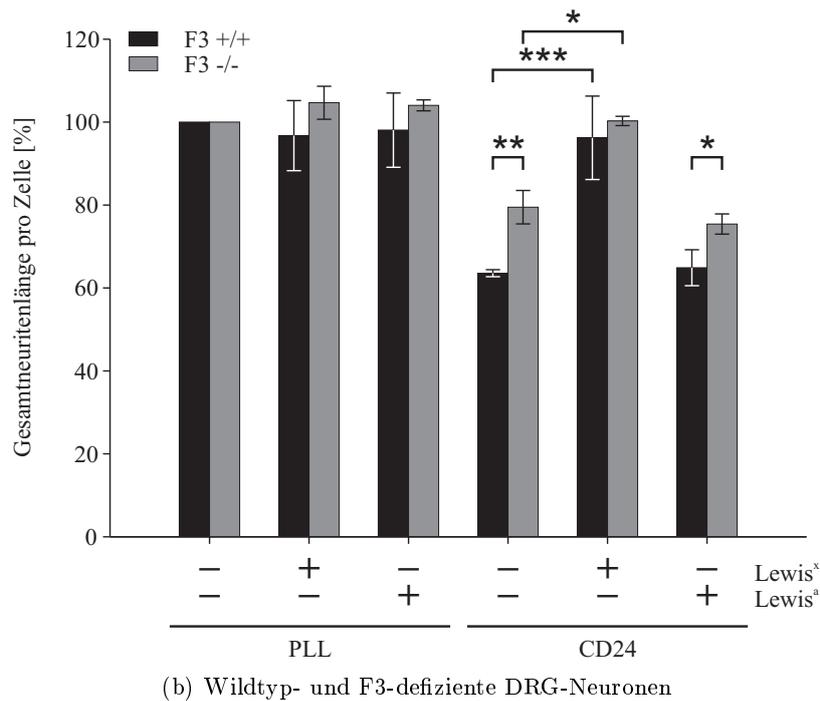
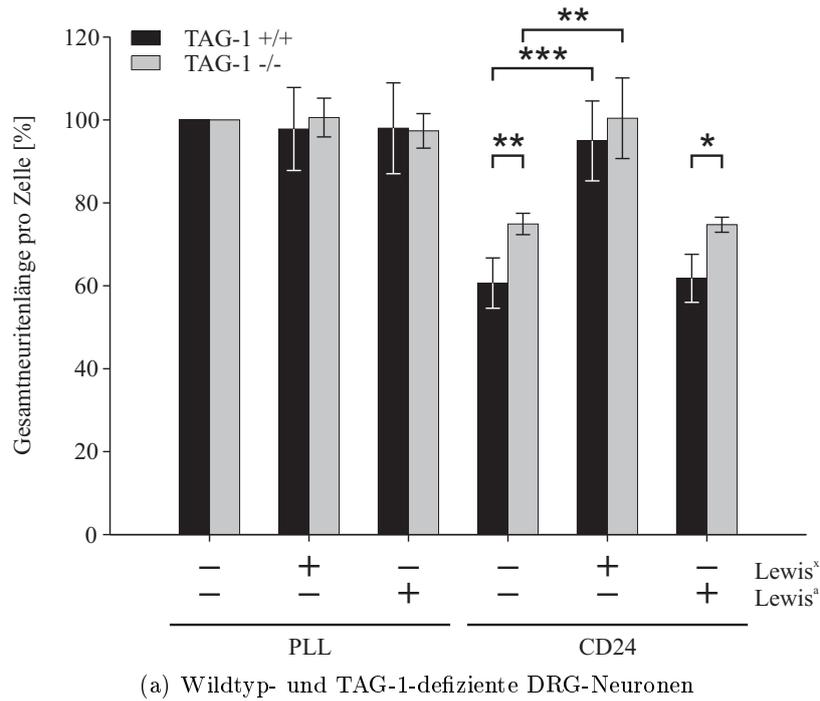


Abbildung 6.17: Lewis^x-Abhängigkeit des TAG-1- und F3-vermittelten Neuritenwachstums von DRG-Neuronen auf CD24

Primäre Einzelzellkulturen von (a) DRG-Neuronen aus Wildtyp- (+/+) und TAG-1-defizienten (-/-) bzw. (b) aus Wildtyp- (+/+) und F3-defizienten (-/-) Mäusen wurden auf PLL oder PLL mit CD24 (5 µg/ml) als Substrat ausgesät und in Gegenwart von 10 µM Lewis^x bzw. Lewis^a für etwa 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelexperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit einem Stern ($p < 0,05$), zwei Sternen ($p < 0,01$) oder drei Sternen ($p < 0,001$) markiert sind, unterscheiden sich signifikant (Student t-test).

ritenlängen von TAG-1-defizienten DRG-Neuronen auf CD24-Substrat dargestellt. Ohne Zugabe von Antikörpern ist die bereits bekannte Inhibition der Neuritenlängen durch CD24 auf etwa 81 % des PLL-Niveaus zu sehen. In etwa unverändert sind die Neuritenlängen bei Zugabe von α TAG-1- oder α Caspr2-Antikörper, d. h. diese Antikörper haben auf TAG-1-defiziente DRG-Neurone keinen Einfluss. Dagegen ist sowohl der α F3- als auch der α Caspr-Antikörper in der Lage, auch noch den Resteffekt der CD24-Inhibition aufzuheben, da hierbei die Neuritenlängen bei etwa 100 %, also PLL-Niveau, liegen. Auch durch Zugabe des α L1-Antikörpers wird diese Inhibition wie erwartet vollständig aufgehoben und die mittlere Neuritenlänge beträgt etwa 100 %.

Im analogen Experiment mit F3-defizienten DRG-Neuronen (siehe Abbildung 6.18(b)) liegt die CD24-Inhibition ohne Zugabe von Antikörpern bei etwa 79 % und wird auch durch α F3- oder α Caspr-Antikörper nicht verändert. Nur in Gegenwart der α TAG-1- oder α Caspr2-Antikörper wird der CD24-Effekt vollständig aufgehoben. Die Neuritenlängen steigen hier auf etwa 100 % an, genau wie durch Zugabe des α L1-Antikörpers als Positivkontrolle.

Auf Wildtyp-DRG-Neurone (siehe Abbildung 6.18(c)) haben bis auf den α L1-Antikörper alle einzeln getesteten Antikörper den Effekt, dass sie die bereits bekannte Inhibition der Neuritenlängen durch CD24 von etwa 64 % auf etwa 80 % des PLL-Niveaus reduzieren. Nur der α L1-Antikörper hebt den CD24-Effekt wie erwartet komplett auf. Ein Teil dieses Experiments wurde bereits unter 6.4.5 dargestellt, ist jedoch zur besseren Übersichtlichkeit hier nochmals enthalten. Die Kombination von α TAG-1- und α F3-Antikörper zeigt die synergistische Wirkung dieser beiden Proteine (siehe 6.4.5). Analog dazu wurden auch α Caspr- und α Caspr2-Antikörper gemeinsam getestet. Auch hier ist zu sehen, dass die CD24-Inhibition durch Zugabe beider Antikörper vollständig aufgehoben werden kann, da die Neuritenlängen auf CD24 durch die Kombination beider Antikörper auf 100 % steigen und damit PLL-Niveau entsprechen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten Antikörper spezifisch die Funktionen des entsprechenden Antigens im CD24-abhängigen Neuritenwachstum von DRG-Neuronen blockieren können, da sie jeweils nur in einem Teil der verwendeten Genotypen einen Effekt aufweisen. Die α TAG-1- und α Caspr2-Antikörper wirken nur in Wildtyp- und F3-defizienten DRG-Neuronen, während die α F3- und α Caspr-Antikörper nur in Wildtyp- und TAG-1-defizienten DRG-Neuronen einen Effekt aufweisen. Da die erzielten Effekte mit α TAG-1- und α Caspr2-Antikörpern bzw. mit α F3- und α Caspr-Antikörpern die gleichen sind, sprechen diese Resultate dafür, dass F3 zusammen mit Caspr für die eine, und TAG-1 mit Caspr2 für die andere Hälfte des CD24-Effekts verantwortlich ist. Dies wird durch die Ergebnisse mit gleichzeitiger Anwesenheit zweier Antikörper (α TAG-1- mit α F3-Antikörper bzw. α Caspr- mit α Caspr2-Antikörper) unterstützt, die zeigen, dass sowohl TAG-1 und F3 als auch Caspr und Caspr2 synergistisch wirken.

Um diese postulierte Rolle von Caspr im CD24-abhängigen Neuritenwachstum von DRG-Neuronen näher zu untersuchen, wurden außerdem Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen aus Caspr-defizienten Mäusen wie in 5.2.1.3 beschrieben durchgeführt. Caspr-defiziente Mäuse wurden freundlicherweise von Elijor Peles (*Weizmann Institute of Science*, Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL und CD24 ausgesät. In Abbildung 6.19 ist zu sehen, dass die CD24-Inhibition analog zum Experiment mit α Caspr-Antikörper (siehe 6.18(c)) von etwa 60 % in der Wildtyp-Kontrolle auf etwa 76 % in Caspr-defizienten DRG-Neuronen reduziert ist. Dieses Ergebnis entspricht damit den Neuritenwachstumsexperimenten mit F3-defizienten DRG-Neuronen (siehe 6.4.1).

Da Caspr2-defiziente Mäuse nicht zur Verfügung standen, konnte das entsprechend analoge Experiment nicht durchgeführt werden. Für dieses Protein wurde deshalb nur wie oben beschrieben α Caspr2-Antikörper in Neuritenwachstumsexperimenten eingesetzt.

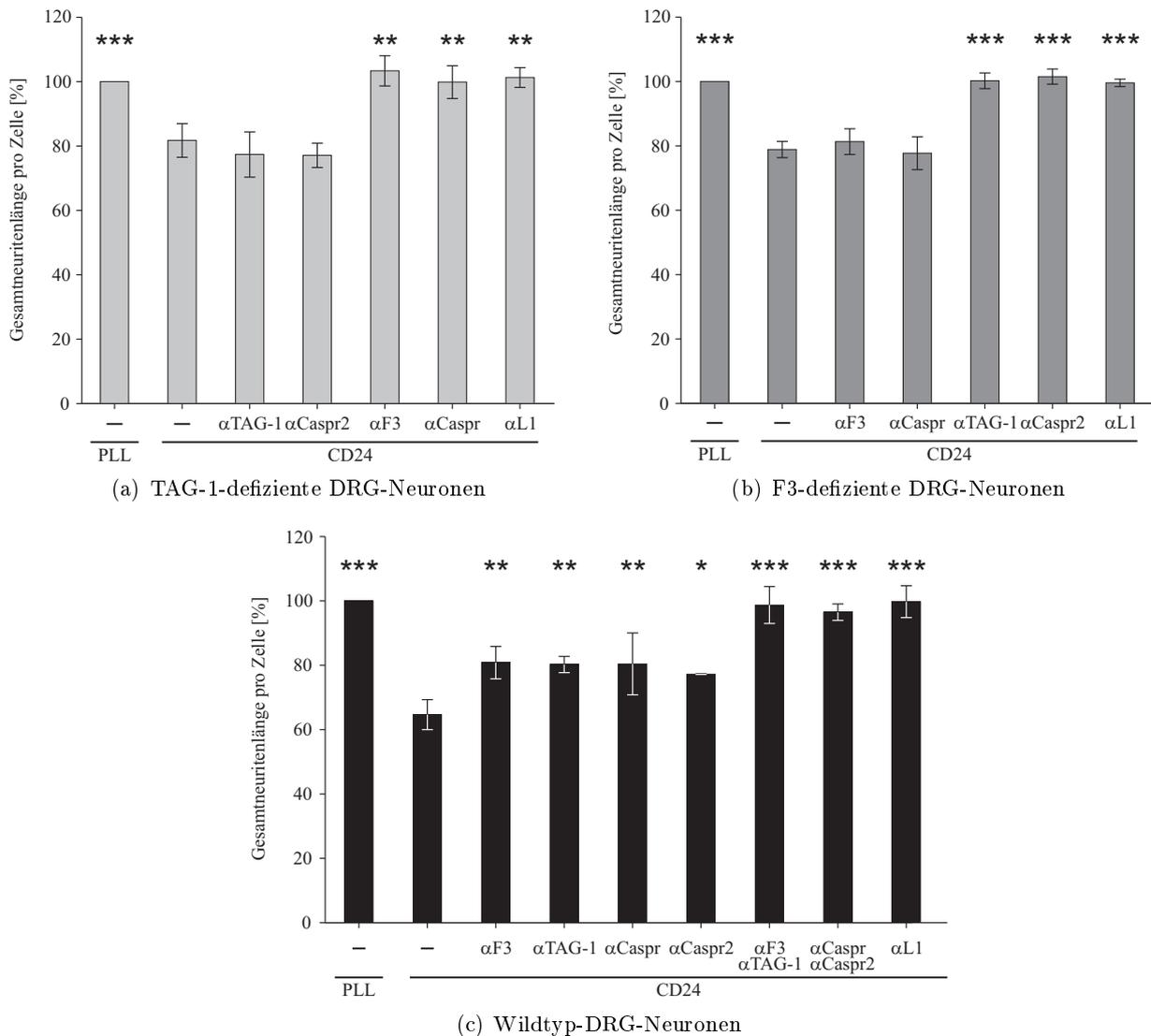


Abbildung 6.18: Caspr bzw. Caspr2 als mögliche Korezeptoren von F3 bzw. TAG-1 in DRG-Neuronen

Primäre Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen aus TAG-1-defizienten (a), F3-defizienten (b) bzw. Wildtyp-Mäusen (c) wurden auf PLL oder PLL mit CD24 (5 μ g/ml) als Substrat ausgesät und in Anwesenheit von jeweils 1:1000 verdünnten Antikörpern gegen TAG-1 (α human Contactin-2), F3 (α human Contactin-1), Caspr (N-15), Caspr2 (G-17) oder L1 (α L1 poly) für etwa 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit einem Stern ($p < 0,05$), zwei Sternen ($p < 0,01$) oder drei Sternen ($p < 0,001$) markiert sind, unterscheiden sich signifikant vom CD24-Wert ohne Antikörper (Student t-test).

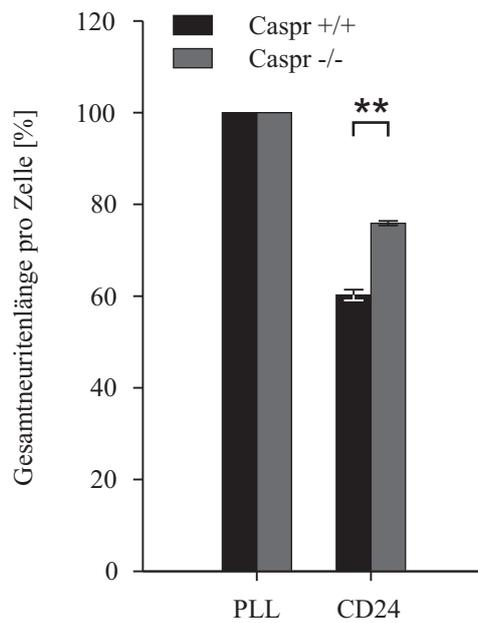


Abbildung 6.19: Funktionelle Relevanz von Caspr im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von DRG-Neuronen

Primäre Einzelzellkulturen von DRG-Neuronen aus Wildtyp- (+/+) und Caspr-defizienten (-/-) Mäusen wurden auf PLL oder PLL mit CD24 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als Substrat ausgesät. Nach etwa 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 50 bis 100 DRG-Neuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit zwei Sternen markiert sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$; Student t-test).

6.4.8 Caspr- und Caspr2-Unabhängigkeit des CD24-vermittelten Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen

Da Caspr und Caspr2 in DRG-Neuronen als Korezeptoren für F3 und TAG-1 verantwortlich sein könnten (siehe 6.4.7), wurde schließlich auch untersucht, ob Caspr und Caspr2 auch am CD24-abhängigen Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen beteiligt sind. Dazu wurden Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen wie in 5.2.1.2 beschrieben aus Wildtyp-Mäusen angefertigt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL und CD24 ausgesät. Zusätzlich wurden etwa eine Stunde nach dem Aussäen der Zellen Antikörper gegen Caspr und Caspr2 jeweils 1:1000 verdünnt zugegeben, um Funktionen dieser beiden Proteine zu blockieren. Im Gegensatz zum CD24-abhängigen Neuritenwachstum von DRG-Neuronen, an dem Caspr und Caspr2 synergistisch beteiligt sind (siehe Abbildung 6.18(c)), konnte in Kleinhirnneuronen ein solcher Effekt nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 6.20). Keiner der beiden Antikörper zeigte einen Einfluss auf PLL oder CD24. Caspr und Caspr2 scheinen demnach in Kleinhirnneuronen nicht am CD24-vermittelten Neuritenwachstum beteiligt zu sein.

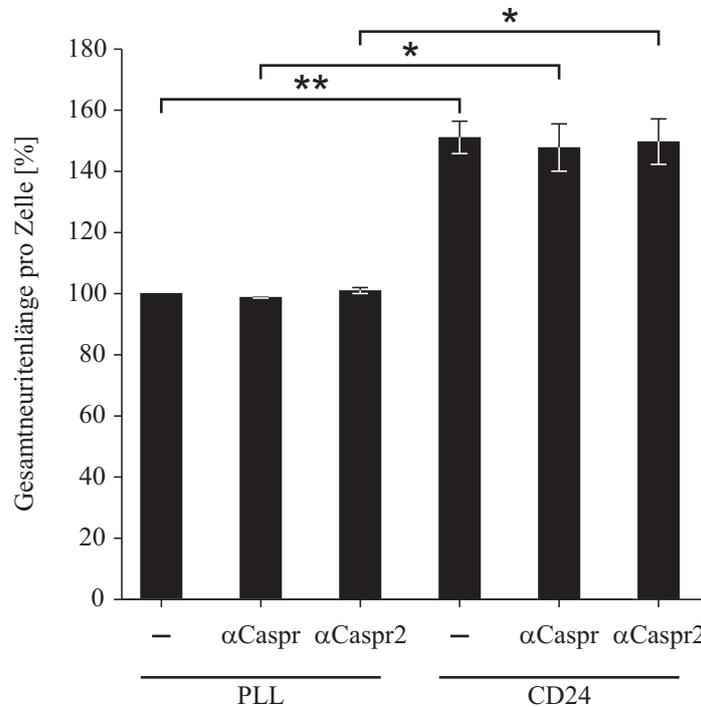


Abbildung 6.20: Caspr- und Caspr2-Unabhängigkeit des CD24-vermittelten Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen

Primäre Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen aus Wildtyp-Mäusen wurden auf PLL oder PLL mit CD24 (5 µg/ml) als Substrat ausgesät und in Anwesenheit von jeweils 1:1000 verdünnten Antikörpern gegen Caspr (N-15) oder Caspr2 (G-17) für etwa 24 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 100 Kleinhirnneuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit einem Stern ($p < 0,05$) oder zwei Sternen ($p < 0,01$) markiert sind, unterscheiden sich signifikant (Student t-test).

6.5 Effekt von CD24 auf das Neuritenwachstum verschiedener Neuronen

CD24 wirkt fördernd auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen, während es das Neuritenwachstum von DRG-Neuronen hemmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem untersucht, wie diese unterschiedlichen Funktionen von CD24 zustande kommen und durch welche molekularen Unterschiede sich die beiden Neuronentypen auszeichnen. Bei Körnerzellen des Kleinhirns handelt es sich um unmyelinisierte Neuronen des zentralen Nervensystems [Mason *et al.*, 1989], bei DRG-Neuronen dagegen um teilweise myelinisierte periphere Nerven. Während Neurone von Mechanorezeptoren und Propriozeptoren myelinisiert sind, weisen Neurone von Temperatur- und Schmerzrezeptoren keine oder nur eine geringe Myelinschicht auf [Chan *et al.*, 2004, Jones *et al.*, 1994]. Um zu analysieren, ob CD24 auf Zelltypen, die einem der beiden untersuchten Neuronentypen strukturell ähnlich sind, auch ähnliche Wirkungen hat, wurde auch das Neuritenwachstum von Hippocampus- und Motoneuronen auf CD24-Substrat untersucht. Der Hippocampus ist ebenso wie das Kleinhirn ein Teil des zentralen Nervensystems und Axone von Körnerzellen dieser Region sind ebenfalls nicht myelinisiert [Schmidt-Hieber *et al.*, 2008]. Dagegen leiten Motoneurone Signale vom zentralen ins periphere Nervensystem und besitzen wie DRG-Neurone eine Myelinscheide [Fraher, 1978].

Einzelzellkulturen von Hippocampus- und Motoneuronen aus Wildtyp-Mäusen wurden wie in 5.2.1.5 bzw. 5.2.1.4 beschrieben angefertigt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL, CD24 und Laminin ausgesät. In Abbildung 6.21(a) ist das Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten mit Hippocampusneuronen zu sehen. Im Vergleich zu PLL-Substrat ist die mittlere Neuritenlänge auf CD24 um etwa 41 % erhöht. Zwei repräsentative Zellen in Abbildung 6.21(b) zeigen diesen Effekt ebenfalls. Diese Förderung des Neuritenwachstums von hippocampalen Neuronen durch CD24 ist damit vergleichbar mit der Förderung um etwa 50 %, die bei Kleinhirnneuronen zu sehen ist (siehe 6.3).

Abbildung 6.5 zeigt das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit Motoneuronen. In 6.22(a) ist deutlich zu sehen, dass die mittlere Neuritenlänge auf CD24-Substrat im Vergleich zu PLO inhibiert wird, da sie nur etwa 67 % des PLO-Niveaus beträgt. Dies ist auch bei zwei repräsentativen Zellen in Abbildung 6.22(b) zu erkennen, die entweder auf PLO- oder CD24-Substrat ausgesät worden sind. Die Inhibition des Neuritenwachstums von Motoneuronen durch CD24 ist damit vergleichbar mit der Inhibition, die bei DRG-Neuronen zu sehen ist (siehe 6.3).

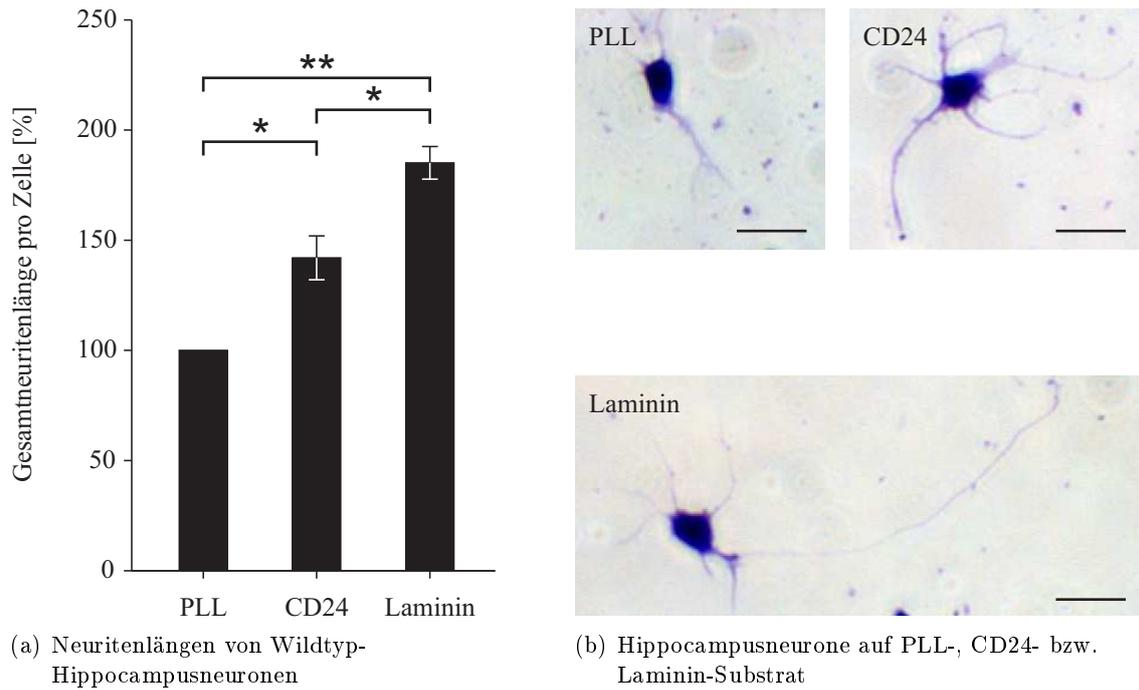


Abbildung 6.21: Förderung des Neuritenwachstums von Hippocampusneuronen durch CD24

Primäre Einzelzellkulturen von Hippocampusneuronen aus Wildtyp-Mäusen wurden auf PLL, PLL mit CD24 (5 µg/ml) oder PLL mit Laminin (10 µg/ml) als Substrat ausgesät. Nach etwa 20-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 100 Hippocampusneuronen pro Probe gemessen. (a) Mittelwerte mit Standardabweichungen von zwei unabhängigen Einzelexperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit einem ($p < 0,05$) oder zwei Sternen ($p < 0,01$) markiert sind, unterscheiden sich signifikant (Student t-test). (b) Fotografien von drei Hippocampusneuronen, die entweder auf PLL-, CD24- oder Laminin-Substrat ausgesät wurden. Die Skalierungsbalken haben jeweils eine Länge von 20 µm.

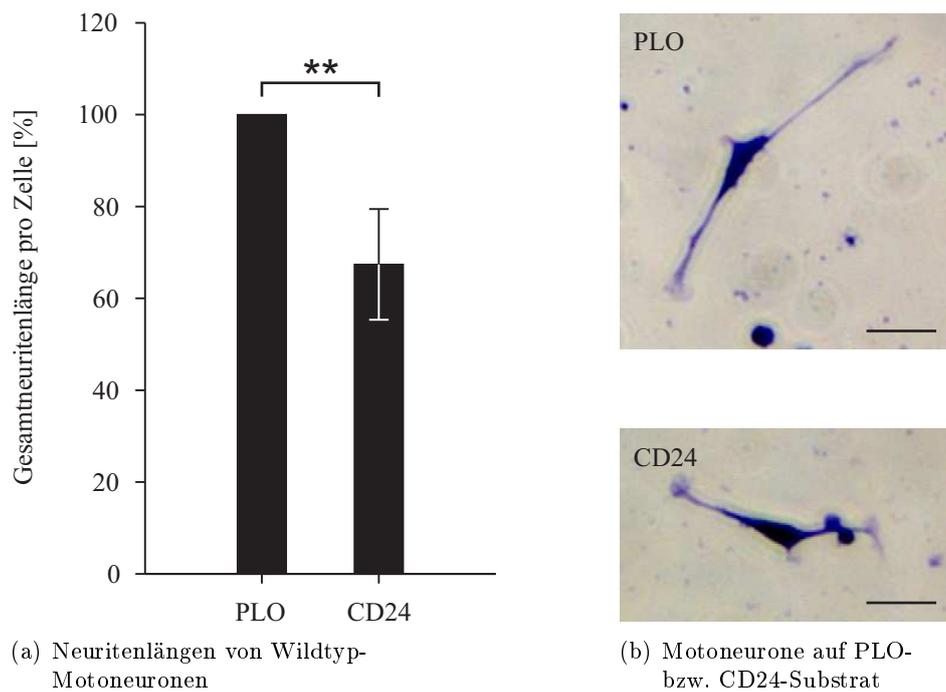


Abbildung 6.22: Inhibition des Neuritenwachstums von Motoneuronen durch CD24

Primäre Einzelzellkulturen von Motoneuronen aus Wildtyp-Mäusen wurden auf PLO oder PLO mit CD24 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als Substrat ausgesät. Nach etwa 24-stündiger Kultivierung wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 50 bis 100 Motoneuronen pro Probe gemessen. (a) Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Einzelerperimenten im Verhältnis zur PLO-Kontrolle (in %). Balken, die mit zwei Sternen markiert sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$; Student t-test). (b) Fotografien von zwei Motoneuronen, die entweder auf PLO- oder CD24-Substrat ausgesät wurden. Die Skalierungsbalken haben jeweils eine Länge von 20 μm .

6.6 Verhalten von CD24-defizienten Mäusen

Bislang gibt es keine veröffentlichten Erkenntnisse zum Verhalten von CD24-defizienten Mäusen. CD24 übt jedoch Funktionen im Kleinhirn und in Motoneuronen aus: Das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen wird durch CD24 gefördert [Kleene *et al.*, 2001], das von Motoneuronen inhibiert (siehe 6.5). Zu den Aufgaben des Kleinhirns gehören unter anderem die Koordination und Feinststeuerung von Bewegungen sowie die Regulation des Muskeltonus. Motoneurone innervieren sämtliche Muskeln und leiten so alle Signale weiter, die Muskelkontraktionen hervorrufen und damit Bewegungen verursachen. Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass das Fehlen von CD24 einen Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten von Mäusen haben könnte. CD24 trägt außerdem unter anderem das funktionell relevante Lewis^x-Epitop [Brendel, 2005]. Mäuse, denen die Fukosyltransferase fehlt, die für die Synthese von Lewis^x zuständig ist (Fut9-defiziente Mäuse), zeigen in Verhaltensstudien Eigenschaften, die mit erhöhter Angst assoziiert sind und weisen immunhistochemisch eine reduzierte Anzahl von Calbindin-positiven Neuronen in der Amygdala auf. Lewis^x könnte demnach eine Rolle in der Regulation von Interneuronen in der Amygdala und dadurch im emotionalen Verhalten der Mäuse spielen [Kudo *et al.*, 2007]. Zudem ist bekannt, dass das Kleinhirn auch an der Konditionierung bei Furchtverhalten beteiligt ist [Scelfo *et al.*, 2008, Sacchetti *et al.*, 2002]. Es ist daher möglich, dass auch CD24-defiziente Mäuse ein verändertes Angst- bzw. Furchtverhalten an den Tag legen.

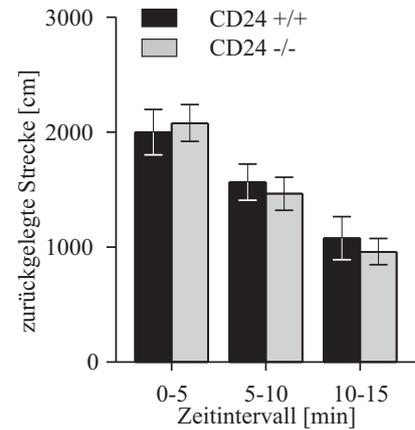
Aus diesen Gründen wurden 7 CD24-defiziente Mäuse sowie 5 Wildtyp-Geschwister (männlich, etwa 10 Wochen alt) in verschiedenen Verhaltensexperimenten getestet, die motorische und koordinatorische Fähigkeiten sowie das Furchtverhalten bestimmen können. Die Auswertung sämtlicher Verhaltensexperimente erfolgte durch Bildung von Mittelwerten innerhalb der Genotypen. In den folgenden Diagrammen sind daher Mittelwerte und ihre Standardabweichungen dargestellt.

Das Explorations- und Lokomotionsverhalten sowie das Angstverhalten der Mäuse wurde zunächst im *Open field*-Test (siehe 5.3.2.1) untersucht, indem während 15 min freier Bewegung (siehe Abbildung 6.23(a)) für jedes Tier die zurückgelegte Gesamtstrecke, die Durchschnittsgeschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Zonen sowie die Anzahl der hinterlassenen Kotpillen bestimmt wurde. Abbildung 6.23 zeigt die Ergebnisse für diese Parameter in den ersten, zweiten und dritten 5 min. Die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke waren bei CD24-defizienten und Wildtyp-Mäusen vergleichbar, da keine Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität erkennbar sind. Tendenziell hielten sich die CD24-defizienten Mäuse jedoch länger im Randbereich und kürzer im Zentrum auf als die Wildtyp-Mäuse. Wie erwartet, bewegen sich alle Mäuse aufgrund ihrer Neugier zu Beginn des Versuchs mehr als gegen Ende, wenn ihnen die Arena bereits bekannt ist. Außerdem setzten CD24-defiziente Mäuse während des Versuchs tendenziell mehr Kotpillen ab als Wildtyp-Mäuse, aufgrund der hohen Schwankung zwischen einzelnen Tieren ist dieser Unterschied jedoch nicht signifikant (Wildtyp 0,4 Kotpillen/15 min, Standardabweichung 0,9; CD24-defizient 1,7 Kotpillen/15 min, Standardabweichung 1,1). Dies kann als möglicherweise erhöhte Emotionalität der CD24-defizienten Tiere interpretiert werden. Insgesamt lässt sich damit also ein leicht erhöhtes Angstverhalten von CD24-defizienten Mäusen feststellen.

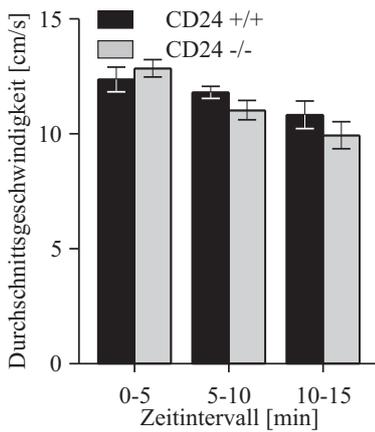
Da sich im *Open field*-Test keine Unterschiede in der groben Bewegung von CD24-defizienten und Wildtyp-Mäusen zeigten, wurde der *Pole*-Test (siehe 5.3.2.2) durchgeführt, um feinere motorische und koordinatorische Fähigkeiten der Mäuse zu testen. Die Tiere wurden dazu mit dem Kopfende nach oben auf eine vertikale Holzstange gesetzt, von der sie hinunter kletterten (siehe Abbildung 6.24(a)). Dabei wurden die Zeiten gemessen, bis sie mit allen vier Pfoten den Boden erreichten sowie ihre Fähigkeiten beobachtet, sich um 180° zu drehen. Die Abbildung 6.24(b) zeigt, dass im ersten Durchlauf alle getesteten Wildtyp-Mäuse in der Lage waren, sich im oberen Drittel um 180° zu drehen, während dies nur 5 von 7 CD24-defizienten Mäusen schafften. In den beiden nächsten



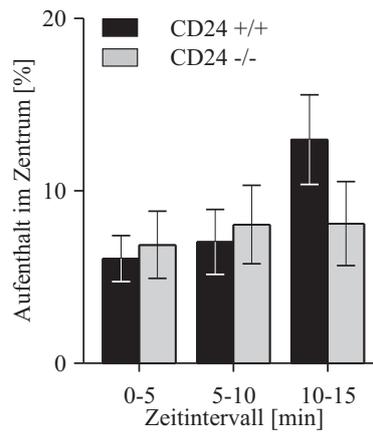
(a) Maus in der *Open field*-Arena



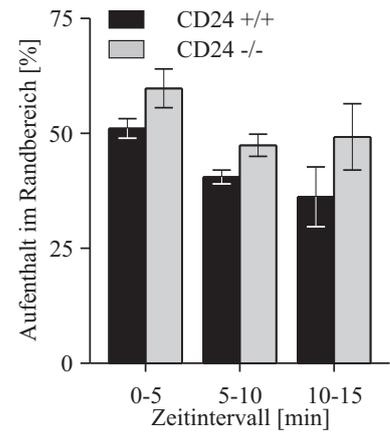
(b) Zurückgelegte Gesamtstrecke



(c) Durchschnittsgeschwindigkeit



(d) Aufenthaltsdauer im Zentrum

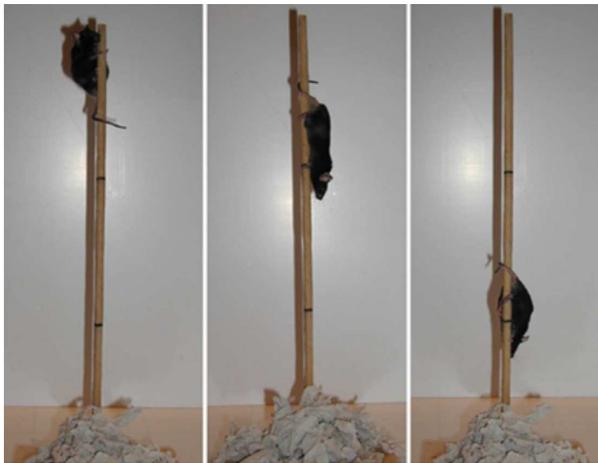


(e) Aufenthaltsdauer im Randbereich

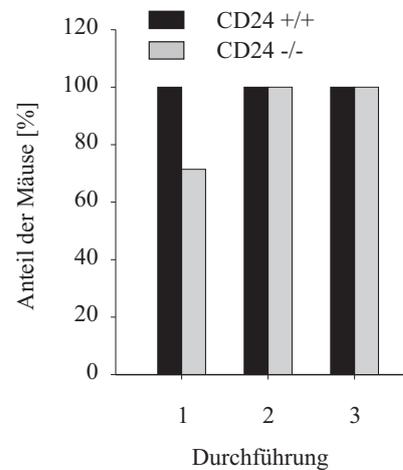
Abbildung 6.23: *Open field*-Test mit CD24-Mäusen

CD24-defiziente (-/-) und Wildtyp-Mäuse (+/+) konnten sich im *Open field*-Test für 15 min frei in einer Arena bewegen. (a) Fotografie von einer Maus, die sich in der Arena befindet. (b) Innerhalb eines Drittels der Zeit zurückgelegte Gesamtstrecke (in cm), (c) Durchschnittsgeschwindigkeit (in cm/s), (d) Aufenthaltsdauer im Zentrum (in %) und (e) im Randbereich (in %).

Versuchen waren dazu jedoch alle Tiere in der Lage. In der Dauer, bis die Mäuse den Boden erreicht haben, wurden ebenfalls keine Unterschiede gemessen (Daten nicht gezeigt).



(a) Maus beim Hinunterklettern der Holzstange mit Nistmaterial als Lockmittel



(b) Anteil der Mäuse, die sich im oberen Drittel drehen

Abbildung 6.24: *Pole-Test* mit CD24-Mäusen

CD24-defiziente (-/-) und Wildtyp-Mäuse (+/+) kletterten im *Pole-Test* eine vertikale Holzstange hinunter. (a) Fotografien von einer Maus, die sich zum Hinunterklettern bereits im oberen Drittel um 180° drehen konnte. (b) Anteil der Mäuse, die sich bereits im oberen Drittel drehen konnten im Verhältnis zur Gesamtzahl an Mäusen pro Genotyp (in %).

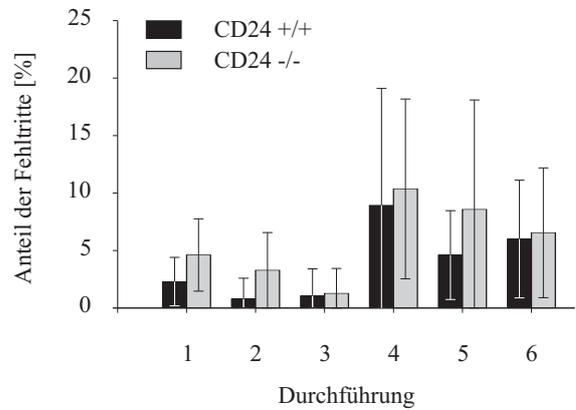
Weitere Tests für die motorische Koordinationsfähigkeit und den Gleichgewichtssinn sind der *Beam walking*- und der *Rotarod*-Test. Beim *Beam walking*-Test (siehe 5.3.2.3 und Abbildung 6.25(a)) liefen die Mäuse über unterschiedlich schmale horizontale Stäbe. Die Anzahl der Fehlritte, d. h. Abrutschen einer Hinterpfote, sowie die Zeiten, die die Mäuse zur Überquerung benötigten, wurden bestimmt. Bei der Dauer konnten keine Unterschiede zwischen CD24-defizienten und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 6.25(b) ist die Anzahl der Fehlritte im Verhältnis zur Gesamtschrittzahl dargestellt. Aufgrund der hohen Schwankungen zwischen einzelnen Tieren sind dabei keine signifikanten Unterschiede zu sehen, auch wenn CD24-defiziente Mäuse tendenziell häufiger mit ihren Pfoten abrutschen. Erwartungsgemäß ist die Zahl der Fehlritte aller Mäuse außerdem auf dem schmaleren Stab höher. Auch der Trainingseffekt ist bei allen Mäusen gut zu erkennen, da die Fehlritte sowohl auf dem breiteren als auch auf dem schmaleren Stab im Lauf von drei Wiederholungen weniger wurden.

Beim *Rotarod*-Test (siehe 5.3.2.4) wurden die Mäuse auf eine sich drehenden Walze gesetzt und entweder bei konstanter oder zunehmender Umdrehungszahl die Dauer, bis sie sich fallen ließen, bestimmt (siehe Abbildung 6.26(a)). Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.26(b) dargestellt. CD24-defiziente und Wildtyp-Mäuse können sich vergleichbar lang auf der Walze halten, da keine Unterschiede in der Dauer bis zum Kontaktverlust zu sehen sind. Außerdem ist zu erkennen, dass auch hier ein Trainingseffekt auftritt, da die Tiere mit zunehmender Wiederholung des Tests länger auf der Walze laufen können.

Nach allen Tests zur Bestimmung der motorkoordinatorischen Fähigkeiten und des Gleichgewichtssinns wurde das Furchtverhalten von CD24-defizienten und Wildtyp-Mäusen im *Fear conditioning*-Test (siehe 5.3.2.5) untersucht (siehe Abbildung 6.27(a)). Als Maß dafür wurde der zeitliche Anteil an Immobilität gemessen, also dass sie abgesehen von Atembewegungen für mindestens 1 s keine Körperbewegungen zeigten (*Freezing*). Nach der Konditionierung der Tiere durch elektrische Fußschocks



(a) Maus beim Überqueren des Stabs



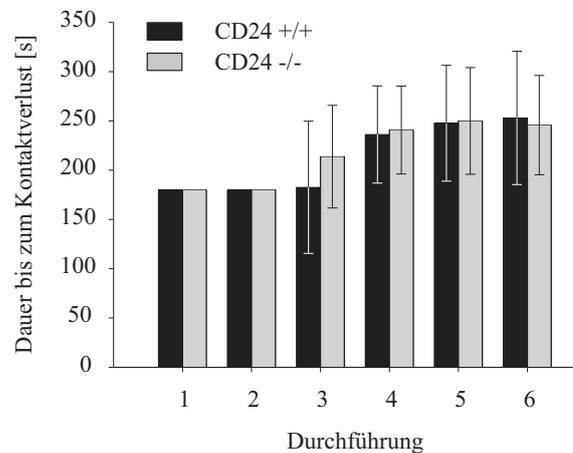
(b) Anteil der Fehlritte an der Gesamtschrittzahl

Abbildung 6.25: *Beam walking*-Test mit CD24-Mäusen

CD24-defiziente (-/-) und Wildtyp-Mäuse (+/+) überquerten im *Beam walking*-Test horizontale Stäbe. (a) Fotografie von einer Maus, die einen 1 cm breiten Stab überquert. (b) Anteil der Fehlritte an der Gesamtschrittzahl beim Überqueren der Stäbe (in %). Für die ersten drei Durchführungen wurde ein 2,5 cm breiter Stab, für die vierte bis sechste Durchführung ein 1 cm breiter Stab verwendet.



(a) Mäuse im *Rotarod*



(b) Dauer bis zum Kontaktverlust

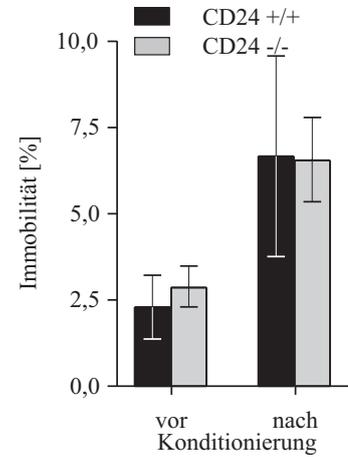
Abbildung 6.26: *Rotarod*-Test mit CD24-Mäusen

CD24-defiziente (-/-) und Wildtyp-Mäuse (+/+) liefen auf einer sich drehenden Walze (*Rotarod*). (a) Fotografie von Mäusen, die auf der sich drehenden Walze laufen. (b) Dauer bis die Mäuse den Kontakt zur Walze verloren (in s). Für die ersten beiden Durchführungen wurde eine konstante Geschwindigkeit von 4rpm, für die dritte bis fünfte Durchführung eine zunehmende Umdrehungszahl (4 bis 40 rpm innerhalb von 4 min) verwendet.

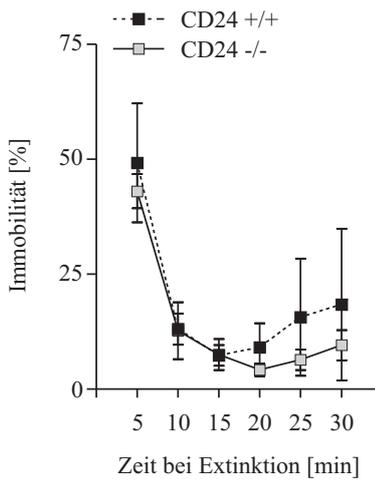
am ersten Tag wurden am zweiten Tag die Gedächtnisleistung und die Lernfähigkeit (Kurzzeit-Extinktion) sowie am dritten Tag die Langzeit-Extinktion bestimmt. Abbildung 6.27(b) zeigt die Immobilität der Mäuse vor (*Preconditioning*) und nach der Konditionierung. Wie erwartet bewegen sich die Tiere nach den Fußschocks weniger, da die Furcht zugenommen hat. Bei der prinzipiellen Ängstlichkeit vor sowie der Furcht nach der Konditionierung sind keine Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen. Der zeitliche Verlauf der Immobilität der Mäuse während des zweiten Tages (Extinktion) ist in Abbildung 6.27(c) dargestellt. Abbildung 6.27(d) stellt die drei wichtigsten Zeiträume der Extinktion noch einmal dar: die ersten 4 min des zweiten Tages kennzeichnen die Gedächtnisfähigkeit der Mäuse, die zeigt, wie sehr sie die Kammer mit Furcht assoziieren (*Recall*). Die Kurzzeit-Extinktion wird während der letzten 4 min des zweiten Tages bestimmt und steht für die Fähigkeit der Mäuse, innerhalb von 30 min neu zu erlernen, dass die Kammer keine Gefahr mehr bedeutet. Deshalb ist der Anteil an Immobilität hier geringer. Die Langzeit-Extinktion (4 min am dritten Tag) beschreibt schließlich die langfristige Lernfähigkeit. Bei allen bestimmten Parametern ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen zu erkennen. Auch die Anzahl der abgesetzten Kotpillen bei allen drei Durchläufen war vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigen CD24-defiziente und Wildtyp-Mäuse vergleichbare Lern- und Gedächtnisleistungen sowie ein sehr ähnliches Furchtverhalten.



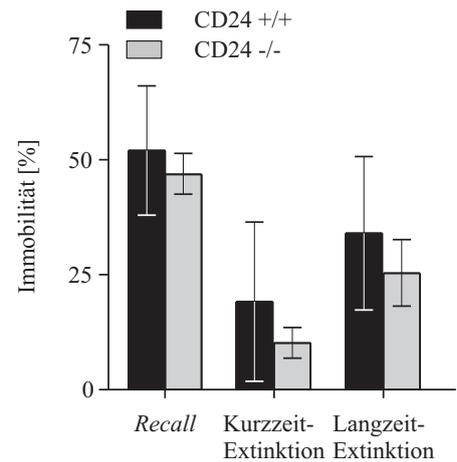
(a) Maus in der Schockkammer



(b) Konditionierung



(c) Zeitlicher Verlauf der Immobilität während der Extinktion



(d) Übersicht für Kurz- und Langzeitextinktion

Abbildung 6.27: *Fear conditioning*-Test mit CD24-Mäusen

CD24-defiziente (-/-) und Wildtyp-Mäuse (+/+) wurden im *Fear conditioning*-Test durch drei elektrische Fußschocks konditioniert. Nach 24 und 48 Stunden wurden sie erneut in die Schockkammer gesetzt ohne weitere Schocks zu erhalten. Durch Bewegungsmessung wurde der zeitliche Anteil an Immobilität (*Freezing*) in % gemessen. (b) Immobilität der Mäuse während jeweils 40 Sekunden vor (*Preconditioning*) und nach der Konditionierung am 1. Tag. (c) Immobilität der Mäuse während der Extinktion am zweiten Tag. (d) Immobilität der Mäuse während der ersten 4 min des 2. Tages (*Recall*), während der letzten 4 min des 2. Tages (Kurzzeit-Extinktion) sowie während 4 min am 3. Tag (Langzeit-Extinktion).

6.7 Lewis^x-mimikrierende organische Substanzen

Das Lewis^x-Epitop ist ein wichtiges Glykan mit vielen interessanten Funktionen (siehe auch 2.2). Im Nervensystem spielt es eine Rolle während dessen Entwicklung, bei Zell-Zell-Interaktionen, Zellmigration und der Wegfindung von Axonen [Brito *et al.*, 2007, Sajdel-Sulkowska, 1998, Gocht *et al.*, 1996, Streit *et al.*, 1996, Gocht *et al.*, 1992]. Im Fall von CD24 konnte gezeigt werden, dass Lewis^x für die Bindung an Rezeptoren und die Vermittlung der Funktionen von CD24 im Neuritenwachstum notwendig ist. TAG-1 und F3 konnten bereits als funktionelle Lewis^x-Rezeptoren charakterisiert werden (siehe 6.4). Andere Funktionen dieses Glykans liegen in der Kompaktierung von Embryos [Hakomori, 2004, 1992, Fenderson *et al.*, 1984] sowie in einer Rolle während verschiedenster Infektionen. Das Bakterium *Helicobacter pylori*, das unter anderem dafür bekannt ist, Gastritis und Darmkrebs auslösen zu können, heftet sich Lewis^x-abhängig an Darmepithelzellen [Sheu *et al.*, 2007, Lin *et al.*, 2006]. Auch im Fall von *Schistosoma mansoni* ist Lewis^x das hauptsächlich immunogene Element. Der virale Transfer des humanen Immundefizienzvirus wird durch eine Lewis^x-abhängige Interaktion des Hüllproteins gp120 mit DC-SIGN vermittelt. Interaktionen von Lewis^x mit DC-SIGN, SRCL und Wnt-1 spielen außerdem eine Rolle bei der Aggregation von Tumorzellen und der Metastasierung [Elola *et al.*, 2007, Capela und Temple, 2006].

Für viele seiner Funktionen ist Lewis^x demnach ein guter Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen. α Lewis^x-Antikörper sind bereits in der Immuntherapie einiger Tumorarten im Einsatz um Metastasierung zu verhindern und Tumorzellen zu lysieren [Elola *et al.*, 2007]. Aufgrund seiner Beteiligung an Entzündungsreaktionen könnte Lewis^x außerdem hilfreich in der Entwicklung neuer Impfstoffe und bei der Bestimmung der Allergenität einiger Proteine sein [Hsu *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2007]. Möglicherweise könnte Lewis^x auch eingesetzt werden, um die Adhäsion von *H. pylori* und damit auch seinen gastritischen Effekt zu reduzieren. Für sialyl-Lewis^x werden bereits einige synthetische Analoga in Tiermodellen auf ihre Fähigkeit getestet, die Auswirkungen von Herzinfarkt zu reduzieren und chronische Erkrankungen wie Asthma und Psoriasis zu lindern, indem selektivvermittelte Interaktionen von Neutrophilen mit Epithelzellen gehemmt werden [Kaneider *et al.*, 2006].

Für therapeutische Zwecke ist es sinnvoll, statt des Glykans mimikrierende Substanzen zu verwenden. Für das Glykan HNK-1 wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass mimikrierende Peptide eine fördernde Wirkung bei der Regeneration nach Femoralnerv-Läsionen haben [Simova *et al.*, 2006]. Auch für sialyl-Lewis^x gibt es bereits Studien, in denen nach Mimetika gesucht wird, die keine Zuckeranteile mehr tragen [Kaila *et al.*, 2005]. Diese organischen Mimetika sollen also die Glykanepitope nachahmen und aufgrund veränderter Eigenschaften gut für therapeutische Zwecke geeignet sein. So sind sie meist kleiner als die originalen Epitope, dadurch stabiler und weniger immunogen. Außerdem besteht für kleinere Moleküle die Möglichkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, und dadurch auch im Nervensystem Einsatz zu finden.

Da das Lewis^x-Glykan in der Wissenschaft ein Gegenstand aktueller Forschungen ist, könnte eine Lewis^x-mimikrierende Substanz auch für Forschungszwecke eingesetzt werden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es daher, kleine organische Mimetika für das Lewis^x-Epitop zu finden. Dazu wurde eine Bibliothek von organischen Substanzen mittels kompetitiven ELISA gescreent (siehe 6.7.1), um Substanzen zu finden, die die Bindung des α Lewis^x-Antikörpers an das als Substrat verwendete Lewis^x-Peptid hemmen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden daraufhin validiert (siehe 6.7.2) und die gefundenen Substanzen erneut getestet. Nach einigen Kontrollen (siehe 6.7.2) konnten die Substanzen schließlich auch in Zellkultur auf ihre Funktionalität getestet werden (siehe 6.7.3).

6.7.1 High Throughput Screening einer Bibliothek von organischen Substanzen

Der im Screening verwendete Test ist ein ELISA, dessen Standard-Protokoll sowie das verwendete Lewis^x-mimikrierende Peptid freundlicherweise von Nainesh Katagihallimath (ZMNH) zur Verfügung gestellt wurden. Das daraus entwickelte Protokoll des kompetitiven ELISA ist unter 5.1.13.2 beschrieben. Dabei wird die Bindung des α Lewis^x-Antikörpers 487 (L5) an das Lewis^x-mimikrierende Peptid in Anwesenheit potenziell inhibierender organischer Substanzen getestet. Wie das folgende Schema (Abbildung 6.28) zeigt, werden Vertiefungen von 384 well-Mikrotiterplatten mit Lewis^x-Peptid beschichtet. Zusammen mit dem α Lewis^x-Primärantikörper werden 40 μ M der jeweiligen organischen Verbindung mit dem Peptid inkubiert und die Menge gebundenen Antikörpers mittels des entsprechenden HRP-konjugierten α -Ratte Sekundärantikörpers und OPD-Substratlösung kolorimetrisch detektiert. Substanzen, die das Lewis^x-Epitop mimikrieren, binden dabei an den α Lewis^x-Antikörper und verhindern so dessen Bindung an das Lewis^x-Peptid. Dies resultiert in geringeren Mengen gebundenen Antikörpers und damit niedrigeren Absorptionen im ELISA.

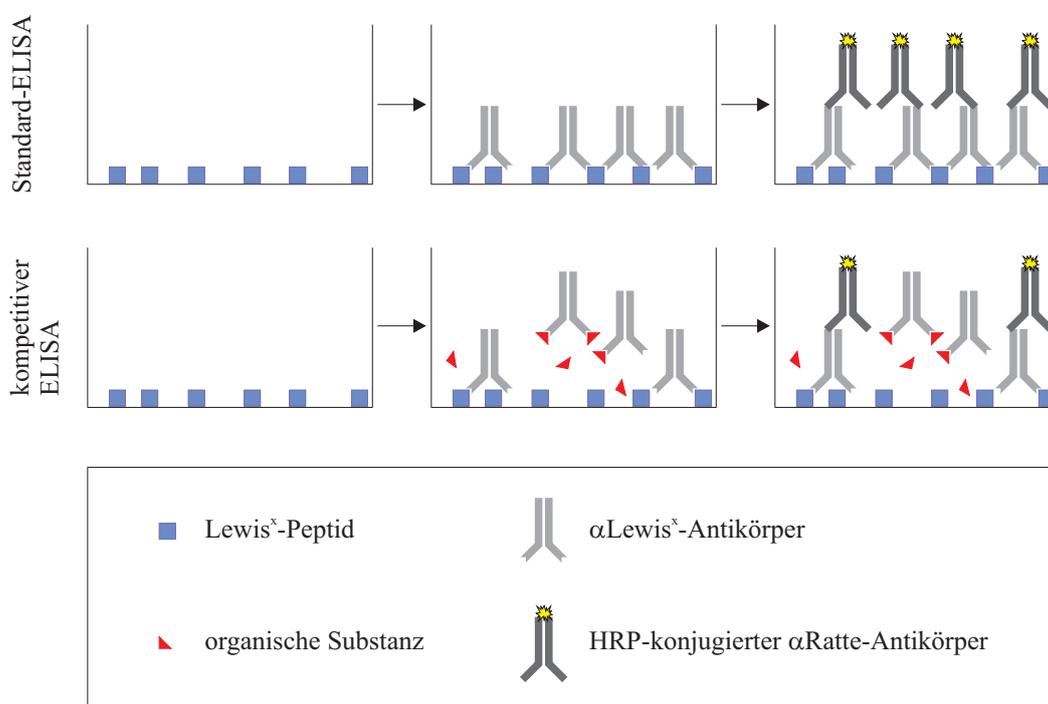


Abbildung 6.28: Schematische Darstellung des im Screen verwendeten Lewis^x-ELISA

In Kooperation mit Dr. Jens Peter von Kries (Screening Unit, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) wurde eine Bibliothek gescreent, die aus 20000 kleinen organischen Molekülen besteht (siehe Versuchsbeschreibung 5.1.14). Unter Verwendung des beschriebenen kompetitiven ELISA wurden Substanzen gesucht, die die Bindung des α Lewis^x-Antikörpers an das Lewis^x-mimikrierende Peptid um mehr als 50 % reduzieren. In Abbildung 6.29 ist als Beispiel eine der 57 verwendeten 384 well-Mikrotiterplatten aus dem Screen zu sehen. Auf jeder Platte wurden Positiv- und Negativkontrollen in der ersten und letzten Spalte mitgeführt. In den restlichen Vertiefungen erfolgte mittels Roboter der Transfer von jeweils 0,1 μ l/well (1 pmol/well, 40 μ M) einer der 20000 organischen Verbindungen aus den Bibliotheksplatten. In den meisten Fällen war die Menge an detektiertem Primärantikörper genauso hoch wie in der Positivkontrolle, d. h. es konnte keine Inhibition festgestellt werden. In einigen wells war dagegen eine schwächere Bindung detektierbar. Als Ergebnis vom Screen der kompletten Bibliothek ergaben sich etwa 380 Substanzen, die zu einer Reduktion der

Absorption um mindestens 50 % führten. Diese wurden mit Hilfe eines Clusterprogrammes (SAR-Navigator Software) analysiert, um die Menge zufälliger Fehler zu reduzieren. Dabei wurden die chemischen Strukturen der Substanzen verglichen und Verbindungen, die sich sehr ähnlich sind, in Cluster zusammengefasst. Weist eine Struktur die Fähigkeit zur Antikörperbindung auf, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch strukturell sehr ähnliche Substanzen diesen Effekt haben. Wenn allerdings eine einzelne Substanz im ELISA kompetitiv wirkt, sämtliche strukturell verwandten Verbindungen dagegen nicht, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Einzeleffekt nur ein Artefakt ist und auf einem Fehler bei der Versuchsdurchführung beruht. Abbildung 6.30 zeigt das Ergebnis der Clusteranalyse. Die Kreise stellen einzelne Cluster dar, wobei die verschiedenen Farben für verschiedene Aktivitäten im Screen stehen. Je größer ein Kreis ist, desto mehr Substanzen sind in diesem Cluster enthalten. Außerdem wurden die Cluster nach strukturellen Ähnlichkeiten positioniert, d. h. je ähnlicher sich Cluster sind, desto näher sind die Kreise zueinander angeordnet. Die als Rahmen um diese positionierten Cluster in der Mitte der Abbildung angeordneten Substanzen konnten strukturell nicht in Beziehung zu den anderen gesetzt werden und wurden deshalb nicht in bestimmten Entfernungen und Positionen eingezeichnet. Nach der Clusteranalyse der rund 380 im Screen als positiv getesteten Substanzen ergaben sich 10 relevante Cluster, die jeweils aus mindestens drei Substanzen bestehen. Nur mit Substanzen aus diesen relevanten Clustern wurde die anschließende Validierung durchgeführt (siehe 6.7.2).

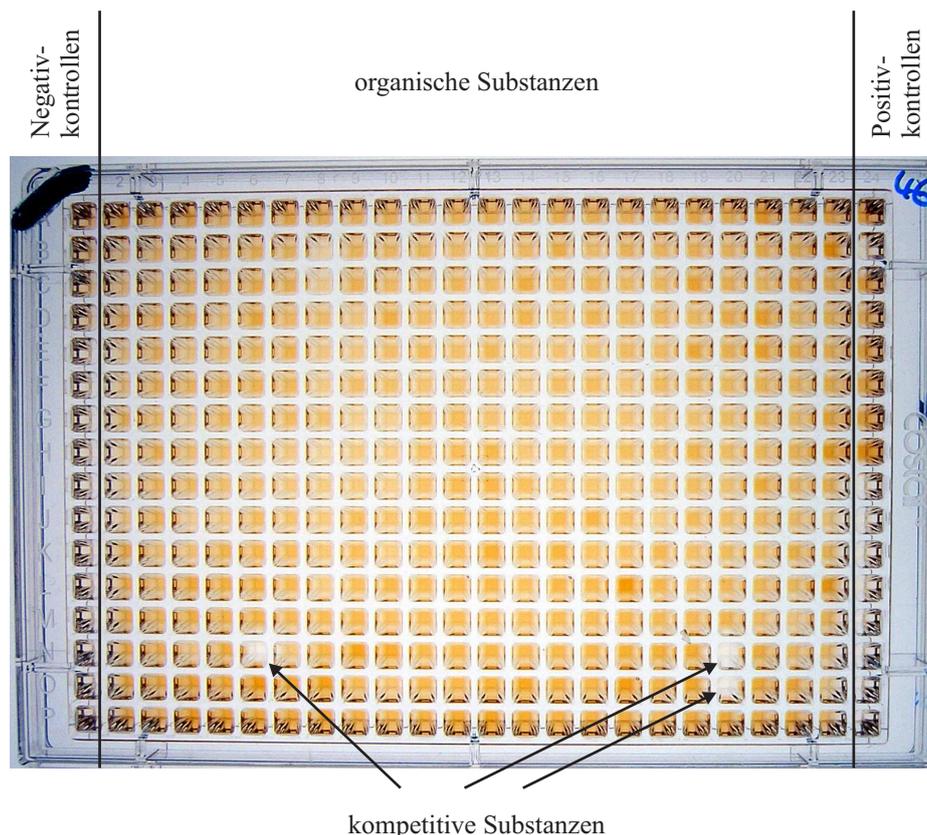


Abbildung 6.29: Beispielhafte Mikrotiterplatte aus dem Screen

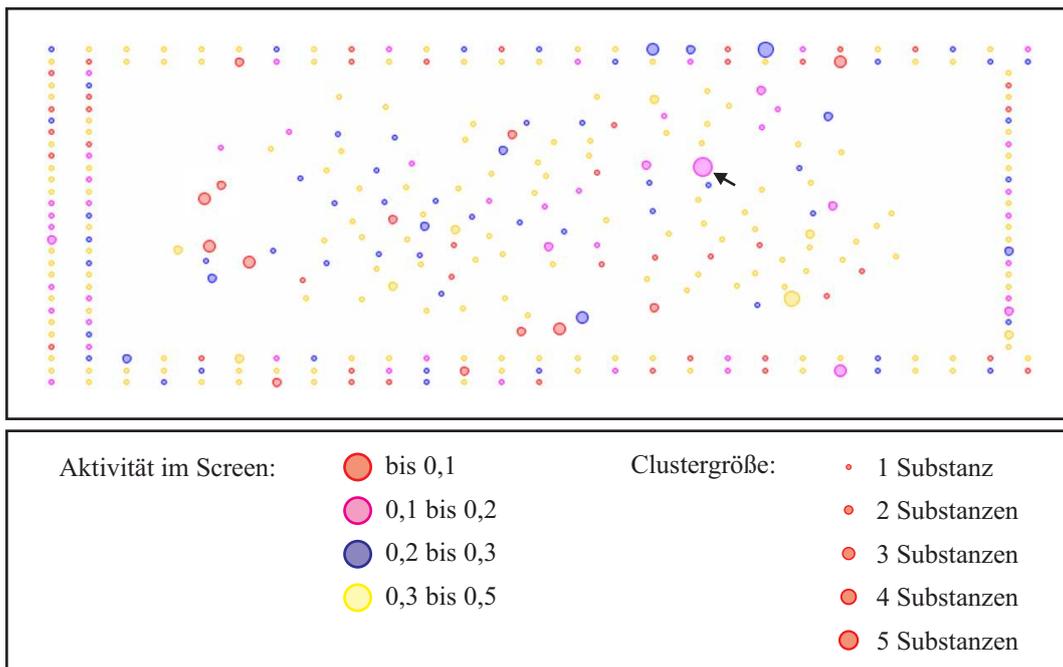
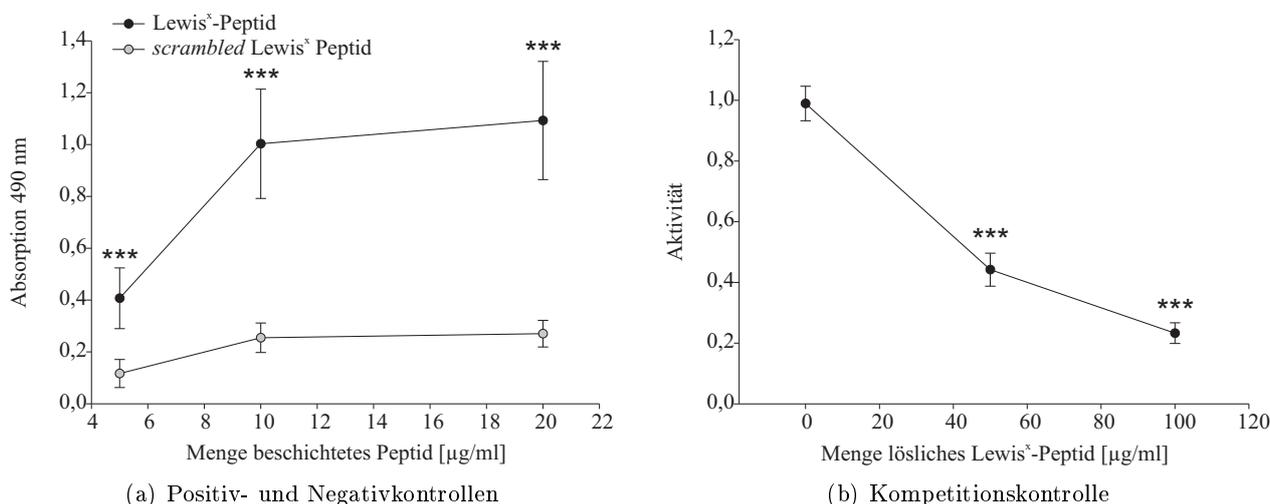


Abbildung 6.30: Ergebnis der Clusteranalyse

Die Clusteranalyse der etwa 380 Substanzen, die im Screen eine Aktivitätsreduktion um mindestens 50 % hervorgerufen haben, wurde mit Hilfe des Programmes SARNavigator durchgeführt. Einzelne Cluster sind durch Kreise dargestellt, die verschiedenen Farben stehen für unterschiedliche Aktivitäten im Screen. Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der im Cluster enthaltenen Substanzen. Die Cluster sind nach strukturellen Ähnlichkeiten positioniert, d. h. die Entfernung zweier Kreise ist geringer, je ähnlicher sich diese Cluster sind. Die als Rahmen um die positionierten Cluster angeordneten Substanzen konnten strukturell nicht in Beziehung zu den anderen gesetzt werden. Das mit einem Pfeil markierte Cluster stellt das später als relevant identifizierte Cluster dar.

6.7.2 Validierung der Ergebnisse des Screenings

Da die Messung der kompetitiven Fähigkeiten der organischen Substanzen im Screen nur auf einer Einzelbestimmung beruhte, mussten die Ergebnisse des Screens validiert werden. Dabei wurde zunächst jeweils eine Substanz aus jedem relevanten Cluster (siehe 6.7.1) auf konzentrationsabhängige Effekte im Lewis^x-ELISA (siehe 5.1.13.2) getestet. Dafür wurden drei unterschiedliche Mengen jeder der zehn zu validierenden Substanzen im kompetitiven Lewis^x-ELISA eingesetzt: 40 µM als 100 %-Wert, da diese Menge auch im Screen verwendet wurde, sowie 50 % (20 µM) und 20 % (8 µM). Abbildung 6.31 zeigt die Ergebnisse der im ELISA stets durchgeführten Kontrollen. In Abb. 6.31(a) sind die Positiv- und Negativkontrollen zu sehen. Als Positivkontrolle wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 5, 10 und 20 µg/ml Lewis^x-Peptid beschichtet, als Negativkontrolle mit 5, 10 und 20 µg/ml *scrambled* Lewis^x-Peptid. Die Differenz der gemessenen Absorptionen von Positiv- und Negativkontrolle bei 10 µg/ml Beschichtung wurde auf die Grundaktivität von 1,0 gesetzt, d. h. den Wert ohne Konkurrenz. Alle weiteren Aktivitätswerte sind im Verhältnis zu dieser Grundaktivität angegeben. Als Konkurrenzkontrolle (Abb. 6.31(b)) wurden 0, 50 bzw. 100 µg/ml Lewis^x-Peptid zum Primärantikörper zugegeben, so dass hier die Aktivität mit steigender Menge Lewis^x-Peptid abnimmt.

Abbildung 6.31: Kontrollen im Lewis^x-ELISA

(a) Für die Positivkontrolle wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 5, 10 und 20 µg/ml Lewis^x-Peptid beschichtet, für die Negativkontrolle mit 5, 10 und 20 µg/ml *scrambled* Lewis^x-Peptid. Die Detektion erfolgte ohne Konkurrenz. Die Differenz der gemessenen Absorptionen von Positiv- und Negativkontrolle bei 10 µg/ml Beschichtung wurde auf die Grundaktivität von 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten. Die Absorptionen mit Lewis^x-Peptid unterscheiden sich signifikant von denen mit *scrambled* Lewis^x-Peptid ($p < 0,001$; Student t-test). (b) Als Konkurrenzkontrollen wurden 50 bzw. 100 µg/ml Lewis^x-Peptid zum Primärantikörper zugegeben. Die gemessenen Absorptionen wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten in Aktivität dargestellt, bezogen auf die Grundaktivität ohne Konkurrenz. Werte mit drei Sternen unterscheiden sich signifikant von Werten ohne Konkurrenz ($p < 0,001$; Student t-test).

Die Validierung der zehn Substanzen aus den relevanten Clustern ist beispielhaft an zwei Substanzen in Abbildung 6.32(a) dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Substanz 16756 keinen kompetitiven Effekt aufweist, während die Verbindung 15644 konzentrationsabhängig die Bindung des Primärantikörpers inhibiert. Für die anderen acht Substanzen konnte wie für Substanz 16756 ebenfalls kein Effekt im ELISA gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung des kom-

petitiven Effekts der Substanz 15644 wurden daraufhin auch die restlichen vier Substanzen, die ebenfalls zu diesem Cluster gehören, konzentrationsabhängig getestet. Abbildung 6.32(b) zeigt, dass der kompetitive Effekt für alle fünf Substanzen 15643, 15644, 15645, 19002 und 19006 bestätigt werden konnte. Verbindung 16756 sowie zwei weitere Verbindungen (125 und 1240) wurden als Negativkontrollen verwendet, die keinen Effekt auf die Antikörperbindung aufweisen.

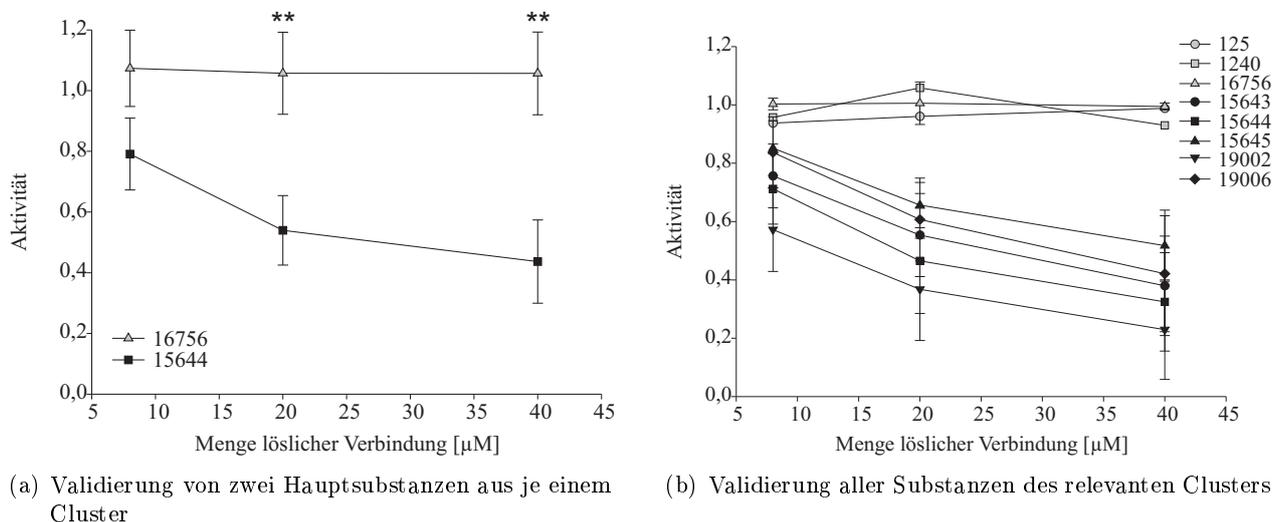


Abbildung 6.32: Validierung der Clustersubstanzen

Zur Validierung wurden organische Substanzen in Konzentrationen von 40 µM (100 %), 20 µM (50 %) und 8 µM (20 %) löslich zum Primärantikörper im ELISA zugegeben. Die gemessenen Absorptionen wurden als Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten in Aktivität dargestellt, bezogen auf die Grundaktivität ohne Konkurrenz. (a) Validierung von zwei Substanzen aus je einem Cluster. Werte mit zwei Sternen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$; Student t-test). (b) Validierung aller Substanzen des relevanten Clusters. 125, 1240 und 16756 dienten als Negativkontrollen.

Die Validierung ergab, dass von zehn relevanten Clustern nur für eines eine konzentrationsabhängige Konkurrenz im ELISA bestätigt werden konnte. In Abbildung 6.30, dem Ergebnis der Clusteranalyse, ist dieses Cluster mit einem Pfeil markiert. Die chemischen Strukturen aller fünf Substanzen, die in diesem Cluster enthalten sind, sind in Abbildung 6.33 dargestellt. Alle diese Substanzen zeigen den gewünschten Effekt.

Dieser Effekt beruht allerdings ausschließlich auf einer sichtbar geringeren Bindungsaktivität des α Lewis^x-Antikörpers im ELISA. Bisher sind unspezifische Effekte jedoch nicht auszuschließen. Es wäre einerseits möglich, dass diese organischen Substanzen eine verringerte Absorption nur dadurch hervorrufen, dass sie den Antikörper so modifizieren, dass er dadurch schlechter an das Lewis^x-Peptid binden kann. Andererseits könnte es auch sein, dass sie das vom Antikörper gebundene Epitop des Lewis^x-Peptids unspezifisch maskieren, der α Lewis^x-Antikörper daraufhin schlechter bindet und die gemessene Aktivität im ELISA deshalb geringer ist. Um diese beiden unspezifischen Effekte auszuschließen, wurden weitere Kontrollen mit allen fünf relevanten Substanzen 15643, 15644, 15645, 19002 und 19006 durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten die Substanzen 125 und 1240, sowie ein Ansatz, in dem nur Puffer ohne organische Verbindung verwendet wurde.

Als Kontrolle für eine mögliche Antikörpermodifikation wurde der α Lewis^x-Antikörper mit jeweils einer Substanz für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend mit Hilfe von Größenausschlusszentrifugation (Microcon YM-30, 30 kD Porengröße) wieder voneinander getrennt. Der Antikörper wurde daraufhin in den Standard-Lewis^x-ELISA ohne weitere Konkurrenz eingesetzt. Für den Fall, dass die Substanzen den Antikörper nicht modifizieren, sollte demnach die

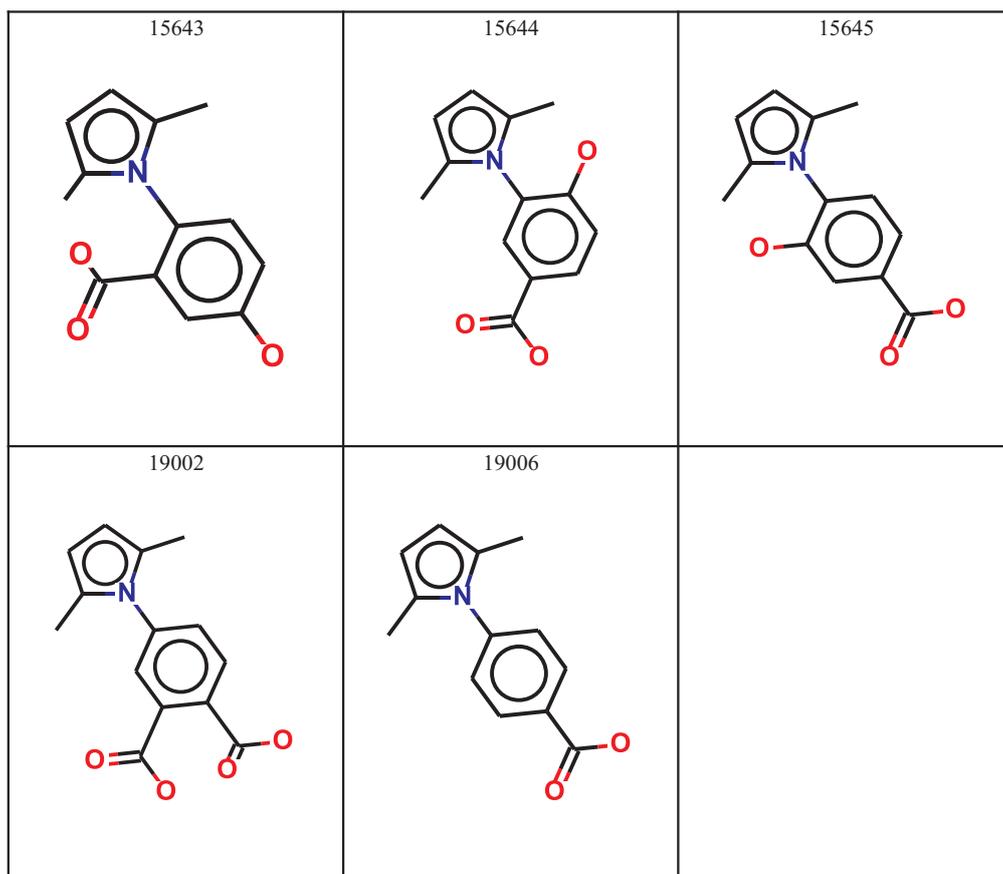


Abbildung 6.33: Chemische Strukturen der fünf im relevanten Cluster enthaltenen Substanzen

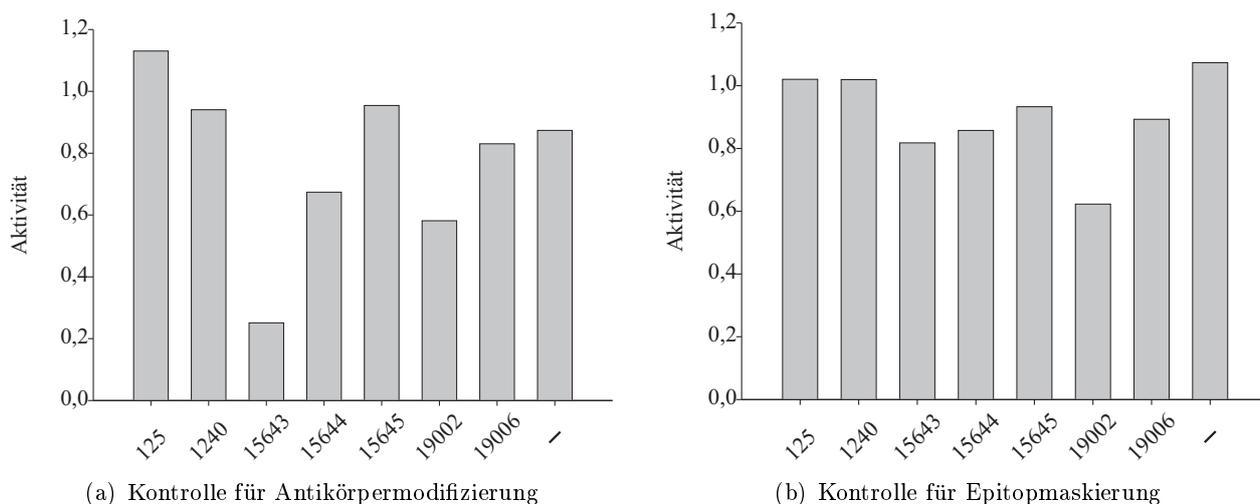


Abbildung 6.34: Kontrollen bei der Validierung der Cluster-Substanzen

(a) Zur Kontrolle für die Antikörpermodifizierung wurde der α Lewis^x-Antikörper mit jeweils einer Substanz vorinkubiert und anschließend wieder davon getrennt. Der Antikörper wurde daraufhin in den Standard-Lewis^x-ELISA ohne weitere Konkurrenz eingesetzt. (b) Zur Kontrolle für Epitopmaskierung wurden mit Lewis^x-Peptid beschichtete Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit jeweils einer Substanz vorinkubiert, anschließend gewaschen und wie im Standard-Lewis^x-ELISA ohne weitere Konkurrenz detektiert. Ansätze mit Puffer ohne organische Substanz (-) dienten als zusätzliche Negativkontrolle. Die gemessenen Absorptionen sind in Aktivität dargestellt, bezogen auf die Grundaktivität ohne Konkurrenz.

gemessene Aktivität im ELISA unbeeinträchtigt sein, während sie durch Modifikation des Antikörpers geringer wird. Zur Kontrolle für die Epitopmaskierung wurden mit Lewis^x-Peptid beschichtete Vertiefungen der Mikrotiterplatte zunächst mit jeweils einer Substanz für eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert, anschließend gewaschen und wie im Standard-Lewis^x-ELISA ohne weitere Konkurrenz mit Primär- und Sekundärantikörper detektiert. Erfolgte eine Maskierung des Peptid-epitops durch eine Substanz, ist die gemessene Absorption geringer als ohne Vorinkubation, während Substanzen, die das Epitop nicht maskieren, keinen Einfluss auf die Aktivität haben sollten.

Die Ergebnisse der beiden durchgeführten Kontrollen sind in Abbildung 6.34 dargestellt. In Abbildung 6.34(a) für die Antikörpermodifikation ist gut zu sehen, dass die Substanzen 15643, 15644 und 19002 die Aktivität im ELISA deutlich reduzieren, während die Negativkontrollen 125, 1240 und ohne Substanz keinen Einfluss auf die Aktivität haben. Auch die beiden Verbindungen 15645 und 19006 reduzieren die Aktivität nur sehr gering. In der Kontrolle für Epitopmaskierung (siehe Abbildung 6.34(b)) sind es erneut die Substanzen 15643, 15644 und 19002, die zu einer reduzierten Aktivität führen, während wieder 15645 und 19006 die geringsten negativen Effekte aufweisen. Auch hier sind die Negativkontrollen in Ordnung, da sie die Aktivität nicht beeinflussen.

Nach der Validierung der im Screen erhaltenen Substanzen sind damit noch die beiden organischen Verbindungen 15645 und 19006 übrig, die auch in allen durchgeführten Kontrollen kaum unspezifische Effekte aufweisen und konzentrationsabhängig die Bindung des α Lewis^x-Antikörpers an das Lewis^x-mimetisierende Peptid kompetieren können. Diese beiden Substanzen sind damit mögliche organische Mimetika des Lewis^x-Glykans.

6.7.3 Untersuchung des Lewis^x-mimikrierenden Effekts der organischen Substanzen auf Neuritenwachstum

Wie in 6.7.1 beschrieben, wurden durch das Screening einer Bibliothek aus organischen Substanzen einige potenziell Lewis^x-mimikrierende Verbindungen gefunden. Nach der Validierung dieses Ergebnisses, der Überprüfung auf konzentrationsabhängige Effekte sowie dem Ausschluss von unspezifischen Effekten wie Antikörpermodifizierung und Epitopmaskierung resultierten die beiden Verbindungen 15645 und 19006 als spezifische organische Mimetika. Alle bislang durchgeführten Experimente, die den mimikrierenden Effekt dieser beiden Substanzen zeigen, beruhen allerdings ausschließlich auf der Methode des ELISA. Um einer therapeutischen Anwendung der Verbindungen näher zu kommen, sollten sie im nächsten Schritt in einem *in vitro*-System mit Primärzellen getestet werden. Es ist bekannt, dass das Zelladhäsionsmolekül CD24 Lewis^x-abhängig das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert (siehe 6.4.6 und Brendel [2005]). In Neuritenwachstumsexperimenten ist es möglich, durch Zugabe des löslichen Lewis^x-Glykans diese fördernde Wirkung von CD24 zu blockieren und aufzuheben. Dieser Effekt wird hier genutzt, um analog zum Lewis^x-Glykan die beiden organischen Verbindungen in Neuritenwachstumsexperimenten zu testen. Dazu wurden Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen aus Wildtyp-Mäusen wie in 5.2.1.2 beschrieben angefertigt. Für Neuritenwachstumsexperimente (siehe 5.2.1.6) wurden die Primärzellen auf PLL und CD24 als Substrat ausgesät. Zusätzlich wurden etwa eine Stunde nach dem Aussäen der Zellen die organischen Verbindungen 15645 und 19006 in einer Endkonzentration von 40 µM zugegeben. Die Substanz 1240, die bereits für die ELISA-Experimente als Negativkontrolle verwendet wurde (siehe 6.7.1), kam auch hier zum Einsatz. Da alle organischen Substanzen in DMSO gelöst sind, wurde zusätzlich der Effekt dieses Lösungsmittels ohne organische Verbindungen überprüft. Die Glykane Lewis^x oder Lewis^a in einer Endkonzentration von 10 µM dienten als zusätzliche Positiv- und Negativkontrollen. Anschließend wurde untersucht, wie sich die Zugabe der verschiedenen Lösungen auf die Gesamtneuritenlänge auswirkt, indem diese wie beschrieben gemessen wurde (siehe 5.2.1.6).

Abbildung 6.35 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Auf PLL-Substrat hatte weder DMSO alleine, noch eine der Substanzen oder Glykane einen signifikanten Effekt auf die Gesamtneuritenlänge. Allerdings ist zu erwähnen, dass die meisten Kleinhirnneurone nach Zugabe der Verbindung 19006 stark beeinträchtigt waren und häufig überhaupt keine Neuriten aufwiesen. Auf CD24-Substrat ist die Förderung des Neuritenwachstums um etwa 50 % zu erkennen, die auch durch Zugabe von DMSO oder der Negativkontrollsubstanz 1240 nicht beeinflusst wird. Dagegen konnte die organische Verbindung 15645 ebenso wie das Lewis^x-Glykan die CD24-Förderung vollständig aufheben, da hier die mittlere Neuritenlänge auf 100 % zurückgeht. Der Zucker Lewis^a hingegen hatte diese Fähigkeit nicht. Auch auf CD24-Substrat war eine deutliche Beeinträchtigung der Zellen nur nach Zugabe der Substanz 19006 sichtbar. Daher sind toxische Effekte dieser Substanz naheliegend.

Der Test der organischen Verbindungen in einem *in vitro*-Zellsystem konnte damit zeigen, dass die Substanz 15645 den Effekt des Lewis^x-Glykans vollständig mimikrieren kann. Im Gegensatz dazu scheint die Verbindung 19006 toxisch auf die verwendeten Primärzellen zu wirken, so dass sie nicht für Anwendungen in Zellsystemen geeignet ist. Nach allen durchgeführten Kontrollen und Tests ist damit die Substanz 15645 ein organisches Mimetikum des Lewis^x-Glykans, das potenziell für therapeutische und wissenschaftliche Zwecke eingesetzt werden kann.

6.7.4 Untersuchung der organischen Substanzen auf Dimerisierung

Während der Arbeit mit den organischen Substanzen wurde festgestellt, dass sie nach dem Lösen in DMSO den beschriebenen Effekt im ELISA nicht sofort aufwiesen, sondern dafür erst einige Monate in Lösung bei -20°C gelagert werden mussten. Daher besteht die Möglichkeit, dass die aktive, Lewis^x-mimikrierende Substanz durch chemische Reaktion des Monomers entsteht und erst nach Re-

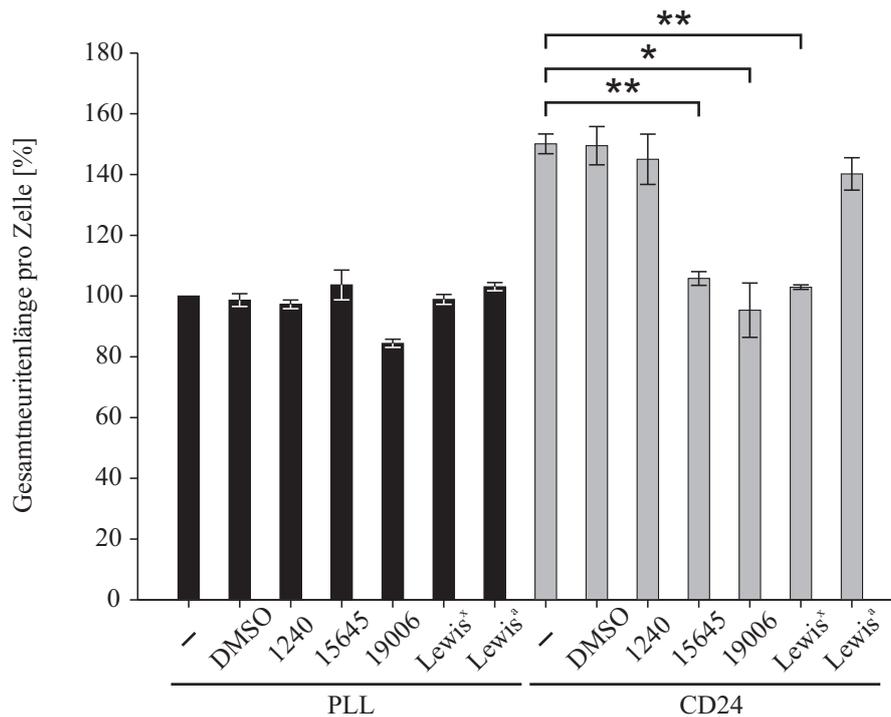


Abbildung 6.35: Test der organischen Substanzen in Neuritenwachstumsexperimenten mit Wildtyp-Kleinhirnneuronen

Primäre Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen aus Wildtyp-Mäusen wurden auf PLL oder PLL mit CD24 (5 µg/ml) als Substrat ausgesät und in Anwesenheit von 40 µM organischer Substanzen 1240, 15645 bzw. 19006, oder 10 µM Lewis^x bzw. Lewis^a für etwa 24 Stunden kultiviert. Ansätze mit DMSO ohne organische Substanzen oder ohne Zugabe einer Lösung (-) dienten als Kontrollen. Danach wurden die Zellen fixiert und die Längen aller Neuriten von mindestens 100 Kleinhirnneuronen pro Probe gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Einzelexperimenten im Verhältnis zur PLL-Kontrolle (in %). Balken, die mit einem Stern ($p < 0,05$) oder zwei Sternen ($p < 0,01$) markiert sind, unterscheiden sich signifikant (Student t-test).

aktion die gewünschten Effekte zeigt. Um eine mögliche Reaktivität der Substanzen zu untersuchen, werden massenspektrometrische und NMR-Analysen in Kooperation mit André Horatscheck und Prof. Dr. Jörg Rademann (Medizinische Chemie, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin) durchgeführt. Bislang kann jedoch nur die Aussage gemacht werden, dass die Möglichkeit der Dimerisierung besteht, der Anteil des Dimers an der Gesamtmasse jedoch relativ gering ist. Da bislang weder sicher ist, ob damit tatsächlich das Dimer die aktive Komponente darstellt noch wie die Struktur des Dimers aufgebaut ist, werden derzeit weitere Untersuchungen durchgeführt.

7 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten die neuronalen Rezeptoren für das Lewis^x-Glykan auf dem Zelladhäsionsmolekül CD24, die unter anderem für die Vermittlung der Signaltransduktionen von CD24 im Neuritenwachstum verantwortlich sind, charakterisiert werden. Da CD24 Lewis^x-abhängig das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert, das von DRG-Neuronen hingegen inhibiert, sollten zudem die molekularen Unterschiede in diesen Neuronentypen untersucht werden, die zu diesen gegenteiligen Effekten von CD24 führen.

Die beiden Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3 konnten als funktionelle neuronale Rezeptoren für Lewis^x identifiziert werden, die die beschriebenen Effekte von CD24 in Kleinhirn- und DRG-Neuronen vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass in TAG-1- bzw. F3-defizienten Neuronen die CD24-abhängige Förderung bzw. Inhibition des Neuritenwachstums völlig aufgehoben bzw. um jeweils die Hälfte beeinträchtigt ist (siehe 6.4.1). Weiterhin wurde die physiologische Assoziation mit CD24 im Kleinhirn mittels Immunpräzipitation (siehe 6.4.2) bzw. in DRG-Neuronen mittels Immunzytochemie (siehe 6.4.4) festgestellt sowie eine direkte Bindung von TAG-1 und F3 an CD24 gezeigt (siehe 6.4.3). Da neben Lewis^x auch α 2,3-Sialinsäure auf CD24 funktionell für die Neuritenwachstumseffekte verantwortlich ist, und L1 bereits in früheren Arbeiten als neuronaler Rezeptor für α 2,3-Sialinsäure auf CD24 gefunden wurde [Brendel, 2005, Kleene *et al.*, 2001], sind damit drei zuckerabhängige Rezeptoren für gliale CD24-Glykoformen bekannt. CD24 vermittelt durch diese Interaktionen die Wechselwirkung zwischen Gliazellen und Neuronen und verknüpft die Signaltransduktionen einzelner neuronaler Rezeptoren. Fehlen diese Rezeptoren (beispielsweise in defizienten Neuronen), werden ihre Funktionen durch Antikörper blockiert oder inhibieren löslich zugegebene Glykane die Zuckerbindungen, so treten die CD24-abhängige Förderung des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen bzw. Inhibition bei DRG-Neuronen nicht mehr auf. Da die CD24-Effekte auch aufgehoben sind, wenn entweder nur die α 2,3-sialinsäureabhängige oder nur die Lewis^x-abhängige Interaktion unterbrochen wird, müssen für die Neuritenwachstumseffekte von CD24 beide Glykane vorhanden sein. Es ist gut möglich, dass diese beiden Glykane von demselben CD24-Molekül getragen werden. CD24 ist also ein wichtiges Molekül, das relevante Glykane in einer Art und Weise anordnet und für Rezeptoren präsentiert, in der sie zusammen funktionell wirken können.

Sowohl für TAG-1 als auch für F3 konnte bereits in anderen Studien eine direkte Bindung an L1 gezeigt werden. TAG-1 ist dabei hufeisenförmig geformt und bindet mittels seiner vier Ig-ähnlichen Domänen an L1 [Kunz *et al.*, 1998]. Unter anderem spielt diese Interaktion für die Wegfindung von nocizeptiven Neuronen eine Rolle [Perrin *et al.*, 2001]. F3 bindet ebenfalls mit seinen Ig-ähnlichen Domänen an L1. In diesem Fall konnte die Bindung auf die ersten beiden Domänen eingegrenzt werden [Brümmendorf *et al.*, 1993]. Interessanterweise sind es auch die Ig-ähnlichen Domänen von TAG-1 und F3, die für deren Effekte auf Neuritenwachstum verantwortlich sind [Pavlou *et al.*, 2002, Brümmendorf *et al.*, 1993]. Im Fall der Modulation des Neuritenwachstums durch CD24 ist jedoch noch nicht bekannt, ob die verantwortlichen neuronalen Rezeptoren L1, TAG-1 und F3 in *cis* direkt miteinander interagieren. Erwähnenswert ist zudem, dass auch für die Bindung des Lewis^x-Glykans an TAG-1 und F3 deren Ig-ähnliche Domänen verantwortlich zu sein scheinen, da in diesen Sequenzen Homologien zu Lewis^x-bindenden Lektinen auftreten [Brendel, 2005].

CD24 tritt im Nervensystem als drei Glykoformen auf, die molekulare Massen von 27, 30 und 33 kD besitzen [Kleene *et al.*, 2001]. Die 30 und 33 kD Glykoformen enthalten auf O-Glykanen α 2,3-

Sialinsäure und Lewis^x, die 33 kD Form zusätzlich noch HNK-1. Auf der kleinen 27 kD Form sind diese Glykane nicht nachweisbar. Die Expression der unterschiedlichen CD24-Glykoformen unterscheidet sich in neuronalen und glialen Zelltypen, da in Kleinhirnneuronen vorwiegend die 27 kD Glykoform auftritt, während Astrozyten die beiden größeren 30 und 33 kD Formen enthalten [Brendel, 2005]. Außerdem werden die Effekte von CD24 auf Neuritenwachstum nur von O-Glykanen verursacht, da N-deglykosyliertes CD24 ebenfalls an L1 bindet und das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert bzw. das von DRG-Neuronen hemmt [Brendel, 2005]. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass gliale CD24-Glykoformen zuckerabhängig in *trans* mit neuronalen Rezeptoren interagieren um die Neuritenwachstumseffekte zu vermitteln.

Für die CD24-vermittelte Förderung des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen sind alle drei neuronalen Rezeptoren notwendig. In L1-defizienten [Kleene *et al.*, 2001], TAG-1- und F3-defizienten Kleinhirnneuronen (siehe 6.4.1) ist diese Förderung vollständig aufgehoben, da die Neuritenlängen auf CD24-Substrat stets denen auf PLL gleichen. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Förderung von Kleinhirnneuronen durch CD24 unabhängig von den beiden Proteinen Caspr und Caspr2 ist (siehe 6.4.8). Daher scheint für die Funktion von CD24 in der Neuritenwachstumsförderung ein neuronaler Komplex aus L1, TAG-1 und F3 verantwortlich zu sein. CD24 auf Astrozyten interagiert dabei über $\alpha 2,3$ -Sialinsäure mit L1 und über Lewis^x mit TAG-1 und F3. Es ist nicht auszuschließen, dass andere Transmembranproteine im Kleinhirn als weitere CD24-Rezeptoren oder Korezeptoren für die GPI-verankerten Proteine auftreten. Ein guter Kandidat hierfür ist NrCAM, da für dieses Protein aus der L1-Familie der IgSF bekannt ist, dass es an TAG-1 und F3 binden kann [Fitzli *et al.*, 2000, Brümmendorf und Rathjen, 1996] und dass es zusammen mit L1 das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert [Sakurai *et al.*, 2001]. Weitere Studien unterstützen die im Rahmen dieser Dissertation gewonnen Erkenntnisse. Während der Entwicklung des Kleinhirns formen Körnerzellen Axone in der prä-migratorischen Zone und sobald die Körnerzellen zu wandern beginnen, verlängern sich deren Axone und bündeln sich zu Parallelfasern [Altman, 1972]. Die Körnerzellen exprimieren bereits in der prä-migratorischen Zone eine Reihe von IgSF-Proteinen, wie z. B. L1, F3, TAG-1 und NrCAM, die bestimmte Aufgaben bei der Orientierung und dem Wachstum der Parallelfasern besitzen [Buttiglione *et al.*, 1998]. TAG-1 beispielsweise wird nur während der ersten beiden postnatalen Wochen exprimiert, also während die Axone wachsen [Bailly *et al.*, 1996]. Zudem fördert TAG-1 das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen [Furley *et al.*, 1990]. F3 hingegen wird auch nach den ersten beiden Wochen nach der Geburt noch exprimiert und wurde als inhibierend auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen identifiziert [Buttiglione *et al.*, 1996]. Für die funktionelle Interaktion zwischen TAG-1 und F3 im Kleinhirn konnte aber interessanterweise gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von F3 aufgehoben wird, wenn die beiden Proteine zusammen koexprimiert werden [Buttiglione *et al.*, 1998]. Dies könnte auch der Fall beim CD24-Effekt sein: CD24 sorgt über die Interaktionen mittels Lewis^x dafür, dass TAG-1 und F3 kolokalisiert sind, so dass sie gemeinsam zu einer Förderung des Neuritenwachstums führen. Es ist außerdem bekannt, dass F3 im Kleinhirn unabhängig von Caspr agieren kann, wie für die Morphogenese und Orientierung der Parallelfasern gezeigt werden konnte: Während die Orientierung von Parallelfasern im Kleinhirn in F3-defizienten Mäuse beeinträchtigt ist [Boyle *et al.*, 2001, Berglund *et al.*, 1999], findet sie in Caspr-defizienten Mäusen völlig normal statt [Pillai *et al.*, 2007]. Die Signaltransduktion über L1, TAG-1 und F3, die durch CD24 hervorgerufen wird und zu einer Förderung des Neuritenwachstums führt, könnte außerdem in allen ähnlichen, unmyelinisierten Neuronentypen des zentralen Nervensystems so ablaufen, da in dieser Dissertation gezeigt werden konnte, dass auch das Neuritenwachstum von Hippocampusneuronen durch CD24 gefördert wird (siehe 6.5).

Im Gegensatz zu Kleinhirnneuronen wird das Neuritenwachstum von DRG-Neuronen durch CD24 inhibiert. Für diesen Effekt ist L1 notwendig, da in L1-defizienten Neuronen keine Inhibition durch CD24 möglich ist [Kleene *et al.*, 2001]. TAG-1 und F3 sind jeweils für eine Hälfte der Inhibition

durch CD24 verantwortlich, da sowohl in TAG-1- als auch F3-defizienten Neuronen oder durch Blockierung mittels jeweils eines Antikörpers in Wildtyp-Neuronen noch eine teilweise Inhibition durch CD24 verursacht werden kann (siehe 6.4.1 und 6.4.5). Werden jedoch die Funktionen beider Proteine gleichzeitig gehemmt, indem sowohl Antikörper gegen TAG-1 als auch gegen F3 zusammen in Wildtyp-Neuronen, α TAG-1-Antikörper in F3-defizienten Neuronen oder α F3-Antikörper in TAG-1-defizienten Neuronen eingesetzt werden, so lässt sich die CD24-Inhibition komplett aufheben (siehe 6.4.5). Im Gegensatz zu L1, das immer an der durch CD24 hervorgerufenen Inhibition des Neuritenwachstums beteiligt ist, wirken TAG-1 und F3 synergistisch und vermitteln jeweils eine Hälfte dieser Inhibition. Zusätzlich zu diesen drei Proteinen konnte in DRG-Neuronen eine Beteiligung von Caspr und Caspr2 als Korezeptoren für F3 und TAG-1 festgestellt werden. Durch Einsatz von Antikörpern gegen Caspr oder Caspr2 konnten die gleichen Effekte hervorgerufen werden, wie durch Antikörper gegen F3 oder TAG-1. Außerdem ist auch in Caspr-defizienten DRG-Neuronen noch eine teilweise Inhibition durch CD24 sichtbar (siehe 6.4.7). Anhand dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass in DRG-Neuronen zwei Komplexe die CD24-abhängige Inhibition des Neuritenwachstums vermitteln: Einer besteht aus L1, F3 und Caspr, der andere aus L1, TAG-1 und Caspr2. Dabei bindet CD24 über α 2,3-Sialinsäure an L1 und über Lewis^x an TAG-1 oder F3. Die Beteiligung von Caspr und Caspr2 in DRG-Neuronen verursacht demnach den Unterschied zu Kleinhirnneuronen, in denen diese beiden Proteine keine Rolle für den CD24-Effekt spielen. So wird das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen durch CD24 gefördert, das von DRG-Neuronen hingegen inhibiert. Ein ähnliches Phänomen mit Beteiligung von L1 und TAG-1 wurde für die Repulsion von DRG-Neuronen gezeigt. TAG-1 ist bekannt dafür, dass es in der Chorda dorsalis für die Repulsion von DRG-Neuronen verantwortlich ist [Masuda *et al.*, 2004]. Dieser Effekt wird zumindest teilweise durch Assoziation von TAG-1 mit Neuropilin-1 und Semaphorin 3A verursacht. Law *et al.* [2008] konnten zeigen, dass diese Assoziation über L1 stattfindet, da TAG-1 nur an L1, aber nicht direkt an Neuropilin-1 oder Semaphorin 3A bindet und L1 wiederum mit dem Semaphorin 3A-Rezeptor Neuropilin-1 interagiert. In L1-defizienten Neuronen ist der repulsive Effekt auf DRG-Neurone noch zum Teil vorhanden, während er in TAG-1-defizienten Neuronen komplett aufgehoben ist. In diesem Fall sind TAG-1 und L1 demnach zusammen für die Neuropilin-1/Semaphorin 3A-abhängige Repulsion von DRG-Neuronen in der Chorda dorsalis verantwortlich, während TAG-1 zusätzlich noch einen Teil der Repulsion unabhängig von L1 vermittelt, wahrscheinlich über noch unbekanntes chemorepulsive Substanzen [Law *et al.*, 2008]. Auch die funktionelle Relevanz der Interaktionen von F3 und Caspr bzw. von TAG-1 und Caspr2 wurde durch zahlreiche weitere Studien belegt. Diese Interaktionen sind vor allem bei der Bildung der Ranvierschen Schnürringe wichtig, bei denen F3 mit Caspr in paranodalen Regionen und TAG-1 mit Caspr2 in juxtapanodalen Regionen auftritt (siehe 2.5.4) [Salzer, 2003]. Während die Defizienz für entweder F3 oder Caspr zu einer starken Beeinträchtigung der Organisation der paranodalen Schleifen und damit einer geringeren Reizleitungsgeschwindigkeit der peripheren Nerven führt [Bhat *et al.*, 2001, Boyle *et al.*, 2001], zeigen TAG-1- oder Caspr2-defiziente Mäuse keine großen Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften von peripheren Nerven. Allerdings ist die Anreicherung von Kaliumkanälen in juxtapanodalen Regionen in diesen defizienten Mäusen gestört [Poliak *et al.*, 2003, Traka *et al.*, 2003]. Die Signaltransduktion über L1, TAG-1 und Caspr2 bzw. L1, F3 und Caspr in DRG-Neuronen, die durch CD24 hervorgerufen wird und zu einer Inhibition des Neuritenwachstums führt, könnte außerdem in allen ähnlichen, myelinisierten Neuronentypen so ablaufen, da in dieser Dissertation gezeigt werden konnte, dass auch das Neuritenwachstum von Motoneuronen durch CD24 inhibiert wird (siehe 6.5). Zudem ist bekannt, dass CD24 auch das Neuritenwachstum von perinatalen retinalen Ganglienzellen inhibiert [Shewan *et al.*, 1996].

Eine Zusammenfassung der im Rahmen der vorliegenden Dissertation gewonnenen Erkenntnisse sowie von Ergebnissen aus vorausgegangenen Arbeiten [Brendel, 2005, Kleene *et al.*, 2001] zur Rolle von CD24 im Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen gibt Abbildung 7.1. Dieses

Modell beschreibt die unterschiedlichen Effekte von CD24 durch die zuckerabhängige Interaktion mit unterschiedlichen neuronalen Rezeptoren. Im Kleinhirn interagiert CD24 in *trans* mit einem Komplex aus L1, TAG-1 und F3 und führt durch deren Signaltransduktionen zu einer Förderung des Neuritenwachstums. Dieser Effekt ist unabhängig von Caspr oder Caspr2. In DRG-Neuronen hingegen bindet CD24 in *trans* an zwei verschiedene Komplexe aus entweder L1, TAG-1 und Caspr2 oder L1, F3 und Caspr. Diese Assoziation mit Caspr und Caspr2 führt zu Signaltransduktionen, die eine Inhibition des Neuritenwachstums durch CD24 vermitteln.

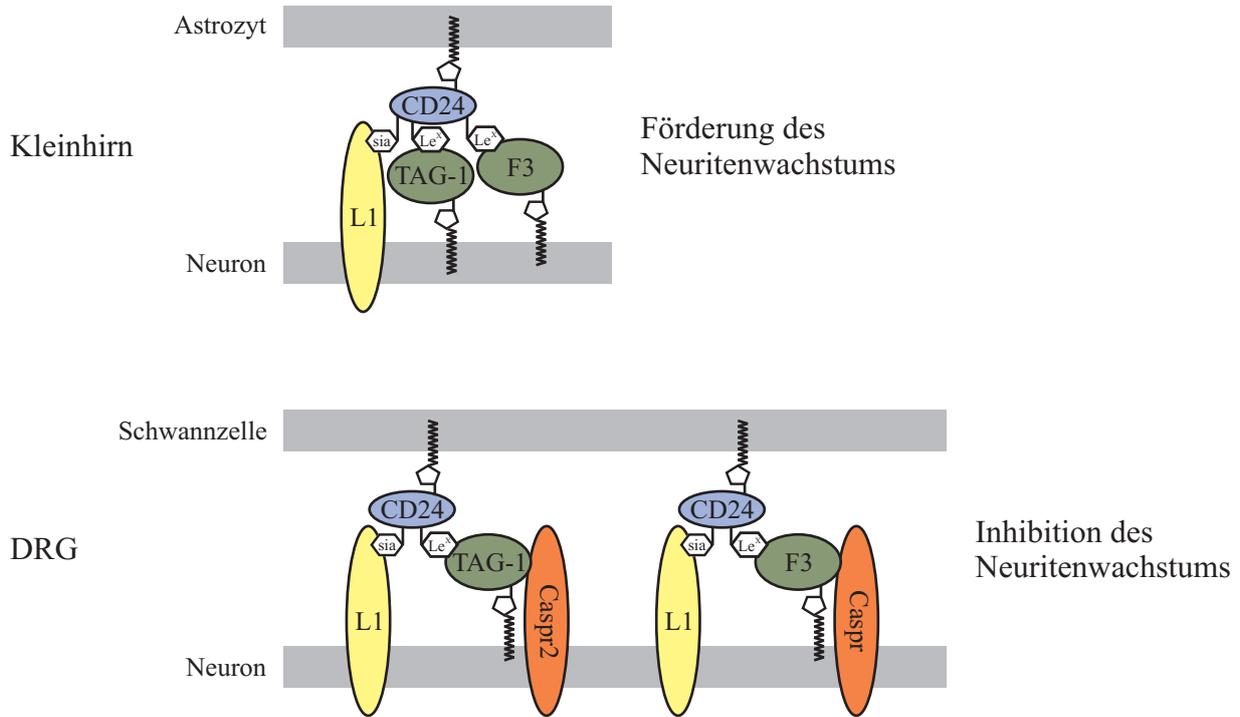


Abbildung 7.1: Aktuelles Modell für die Rolle von CD24 im Neuritenwachstum

CD24 fördert das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen durch *trans*-Interaktion über α 2,3-Sialinsäure mit L1 und über Lewis^x mit TAG-1 und F3. Diese drei neuronalen Proteine bilden einen Komplex, der möglicherweise mit weiteren Proteinen unabhängig von Caspr oder Caspr2 zu Signaltransduktionen führt, die den fördernden Effekt hervorrufen. Im Gegensatz dazu interagiert CD24 in *trans* mit zwei verschiedenen Komplexen aus entweder L1, TAG-1 und Caspr2 oder L1, F3 und Caspr in DRG-Neuronen. Auch hier finden die Bindungen über α 2,3-Sialinsäure und Lewis^x statt. Die Beteiligung von Caspr und Caspr2 führt jedoch zu Signaltransduktionen, die eine Inhibition des Neuritenwachstums durch CD24 vermitteln.

Es bleibt noch zu erforschen, ob die neuronalen Rezeptoren von CD24 auch in *cis* miteinander interagieren, und wenn ja, ob diese Interaktionen möglicherweise auch zuckerabhängig sind. Für die *cis*-Interaktion von F3 mit Caspr wurde beispielsweise bereits eine Abhängigkeit vom Glykosylierungszustand von F3 gezeigt. Nur F3 mit mannosereichen N-Glykanen ist mit Caspr assoziiert, während F3, das komplexe N-Glykane trägt, nicht an Caspr bindet [Bonnon *et al.*, 2007]. Möglicherweise unterscheiden sich also auch die Glykosylierungen der axonalen Proteine abhängig vom Zelltyp und führen so zur Interaktion mit unterschiedlichen Korezeptoren.

Auch die genauen Signaltransduktionen, die CD24 in den entsprechenden Zelltypen auslöst, sind bislang noch nicht weiter untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass CD24 mit Kinasen der Src-Familie assoziiert ist [Sammar *et al.*, 1997b, Zarn *et al.*, 1996] und dass Tyrosinkinaseinhibitoren die CD24-abhängige Aggregation von monozytischen Zellen inhibieren können [Sammar *et al.*, 1997a]. Zudem kann CD24 die Lokalisierung von β 1 Integrin in *Lipid raft*-Domänen induzieren [Runz *et al.*, 2008].

Auch L1 aktiviert in seiner Rolle im Neuritenwachstum über Integrine die p60^{Src}-Kinase und damit einen Signaltransduktionsweg über PAK1, MEK und ERK [Maness und Schachner, 2007]. Es ist daher gut möglich, dass CD24 diesen Signaltransduktionsweg von L1 nutzt. Dafür spricht auch, dass CD24 die Signaltransduktion von L1 verstärken kann [Kadmon *et al.*, 1995a]. Über Signaltransduktionen von Caspr oder Caspr2 sind bislang hingegen keine veröffentlichten Daten vorhanden, so dass hier keine Aussage über eine eventuelle Verbindung zu CD24 möglich ist.

Die immunzytochemischen Experimente, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden (siehe 6.4.4) zeigen, dass auf DRG-Axonen regelmäßige Komplexe aus L1 und F3 bzw. L1 und TAG-1 auftreten, an die CD24 in *trans* bindet. Da die verwendeten DRG-Primärzellen in Kultur nicht myelinisiert sind, könnte es sich dabei um einen molekularen Zustand handeln, der vor der Myelinisierung auftritt. L1 ist bekannt dafür, dass es von postmitotischen Neuronen exprimiert wird, diese Expression mit dem Beginn der Myelinisierung jedoch stark verringert wird. Antikörper gegen L1 können in myelinisierenden Kokulturen von Schwannzellen und DRG-Neuronen die Bildung von Myelin sowie die Ausbreitung der Schwannzelle entlang des Axons hemmen [Wood *et al.*, 1990]. Diese Autoren vermuteten bereits, dass axonales L1 in einem Komplex aus mehreren Molekülen die ersten Interaktionen mit Schwannzellen und die Reorganisation des Zytoskeletts dieser Zellen vermittelt, so dass Axone eingewickelt werden und sich Myelin bildet. Itoh *et al.* [2005] konnten zeigen, dass axonales L1 Integrine auf Schwannzellen bindet und so zur Umhüllung und Myelinisierung führt. So scheinen Zelladhäsionsmoleküle wie L1 und auch NCAM eine Rolle im frühen Stadium der Myelinisierung zu spielen, indem sie Kontakte bilden und die Erkennung zwischen Axonen und Schwannzellen vermitteln. Weitere Zelladhäsionsmoleküle wie MAG und P0 sind daraufhin für die Umhüllung und Kompaktierung des Myelin verantwortlich [Takeda *et al.*, 2001]. Diese Theorie wird auch durch Erkenntnisse gestützt, dass bei Regeneration nach Verletzungen des peripheren Nervensystems die Expression von L1 und NCAM stark erhöht wird [Martini, 1994]. Auch für die Myelinisierung von Nerven des zentralen Nervensystems wurde bereits vermutet, dass axonales L1 die Myelinisierung fördert, indem es zu einem frühen Zeitpunkt der Adhäsion von Oligodendrozyten mit einem glialen Molekül interagiert [Coman *et al.*, 2005]. Da es in Vorbereitung auf den Prozess der Myelinisierung nötig ist, das Wachsen der Axone zu verlangsamen, wäre es möglich, dass CD24 auf Schwannzellen zusammen mit axonal exprimierten Proteinen, in diesem Fall L1, TAG-1, F3, Caspr und Caspr2, das Neuritenwachstum von Neuronen im peripheren Nervensystem hemmt, um die Bildung von Myelin zu ermöglichen. Allerdings ist anzumerken, dass der hier in Primärkultur festgestellte Abstand zwischen den L1/F3- bzw. L1/TAG-1-Clustern von etwa 20 bis 25 μm nicht mit der Länge von Internodes, also den Abständen zwischen den Ranvierschen Schnürringen, übereinstimmt. Im peripheren Nervensystem liegt die Länge von reifen Internodes etwa zwischen 200 und 1000 μm [Kosowski *et al.*, 1998]. Zu Beginn der Entwicklung können Internodes jedoch noch sehr kurz sein und nur eine Länge von etwa 15 μm besitzen [Coman *et al.*, 2006], da sie während der Myelinisierung wachsen, indem Membranbestandteile in der wachsenden Myelinspirale hinzugefügt werden. Dadurch breiten sich Internodes während des Prozesses der Myelinisierung noch longitudinal aus [Pedraza *et al.*, 2001]. Es ist möglich, dass deshalb der Abstand der Cluster in den hier durchgeführten Primärkulturen noch so gering ist.

Zu den Krankheiten, bei denen die Myelinisierung beeinträchtigt ist, gehört auch die Multiple Sklerose. Es ist bekannt, dass CD24 die Anfälligkeit für Multiple Sklerose beeinflusst und am Krankheitsverlauf beteiligt ist. CD24-defiziente Mäuse scheinen resistent gegen das experimentelle Mausmodell EAE zu sein [Bai *et al.*, 2000] und beim Menschen sind Mutationen im *cd24*-Gen bekannt, die durch verstärkte Expression von CD24 zu einem erhöhten Risiko führen, an Multipler Sklerose zu erkranken. Auch der Krankheitsverlauf ist in diesen Fällen beschleunigt [Zhou *et al.*, 2003]. Eine Überexpression von CD24 in Mäusen führt ebenfalls zu einem schwereren Krankheitsverlauf mit größeren Läsionen, d. h. größeren demyelinisierten Bereichen und mehr Schäden an Axonen. Ein Teil

dieses Effektes wird wahrscheinlich dadurch hervorgerufen, dass CD24 mehr T-Zellen stimuliert, diese aggressiver macht und damit die autoimmunen Entzündungsreaktionen verstärkt [Liu *et al.*, 2007]. Es ist bekannt, dass die Lokalisierung der Proteine, die an der Bildung der Ranvierschen Schnürringe und den flankierenden Bereichen beteiligt sind, in demyelinisierten Läsionen von Multipler Sklerose-Patienten beeinträchtigt ist [Coman *et al.*, 2006]. Wenn CD24 durch seinen Einfluss auf das Neuritenwachstum möglicherweise auch daran beteiligt ist, Voraussetzungen für die Myelinisierung zu schaffen, wäre es auch denkbar, dass CD24 dadurch einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Multipler Sklerose ausübt. Deshalb müsste die Rolle von CD24 im gesunden Nervensystem, aber auch bei Demyelinisierungskrankheiten wie Multipler Sklerose, daraufhin besser untersucht werden.

Interessanterweise sind es nicht nur in der Regulation des Neuritenwachstums die glyalen CD24-Glykoformen, die CD24-abhängige Effekte vermitteln, sondern auch bei Multipler Sklerose. Transgene Mäuse, die CD24 unter dem GFAP-Promotor exprimieren, überexprimieren CD24 in Astrozyten. Wird in diesen Mäusen EAE induziert, zeigen sie den bereits erwähnten schwereren Krankheitsverlauf mit größeren Schäden an Axonen, vermehrter Produktion von proinflammatorischen Cytokinen und T-Lymphozyten. CD24 auf Astrozyten verstärkt hier also die Auswirkungen von EAE [Liu *et al.*, 2007]. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass insbesondere CD24-Glykoformen auf Gliazellen wichtige Glykane so präsentieren, dass sie funktionell sind.

Da es bislang keine veröffentlichten Erkenntnisse zum Verhalten von CD24-defizienten Mäusen gibt, CD24 jedoch Funktionen im Kleinhirn und in Motoneuronen ausübt, könnte das Fehlen von CD24 einen Einfluss auf die motorischen Fähigkeiten von Mäusen haben. Außerdem wurde gezeigt, dass das Kleinhirn auch an der Konditionierung bei Furchtverhalten beteiligt ist [Scelfo *et al.*, 2008, Sacchetti *et al.*, 2002]. Zudem trägt CD24 das funktionell relevante Lewis^x-Epitop [Brendel, 2005]. Mäuse, denen die Fukosyltransferase fehlt, die für die Synthese von Lewis^x zuständig ist (Fut9-defiziente Mäuse), zeigen in Verhaltensstudien Eigenschaften, die mit erhöhter Angst assoziiert sind [Kudo *et al.*, 2007]. Es wäre daher möglich, dass auch CD24-defiziente Mäuse ein verändertes Angst- bzw. Furchtverhalten an den Tag legen. Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Dissertation verschiedene Verhaltensexperimente mit CD24-defizienten Mäusen und deren Wildtyp-Geschwistern durchgeführt, um motorische und koordinatorische Fähigkeiten sowie das Furchtverhalten zu bestimmen. Mit der nur geringen Zahl an verwendeten Mäusen konnten jedoch in keinem der Tests signifikante Unterschiede zwischen CD24-defizienten und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden, d. h. das motorkoordinatorische Verhalten der beiden Genotypen war vergleichbar. Im *Open field*-Test zeigten CD24-defiziente Mäuse ein leicht erhöhtes Angstverhalten, jedoch konnten im *Fear conditioning*-Test keine signifikanten Unterschiede im Furchtverhalten sowie bei Lern- und Gedächtnisleistungen festgestellt werden (siehe 6.6). Auch bisherige Studien, die sich dem Immunsystem von CD24-defizienten Mäusen widmeten, zeigten in vielerlei Hinsicht, dass die CD24-Defizienz meist unauffällig ist. Die Mengen von T-Lymphozyten in der Milz und den Lymphknoten sowie von Thymozyten sind unverändert, B-Zellen werden gebildet und können sich zu antikörperproduzierenden Zellen differenzieren [Wenger *et al.*, 1995]. Auch die Immunantwort der CD24-defizienten Mäuse ist normal und es gibt keine Unterschiede bezüglich Blutwerten wie Hämatokrit oder Hämoglobin [Nielsen *et al.*, 1997]. Im Nervensystem entwickelt sich die Pyramidenbahn (Corticospinaltrakt) völlig normal [Sibbe *et al.*, 2007], jedoch treten erhöhte Zellzahlen in der subventrikulären Zone [Belvindrah *et al.*, 2002], im Hautepithel, in der Kornea sowie im embryonalen zentralen Nervensystem [Nieoullon *et al.*, 2007] auf. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass für viele Funktionen, die CD24 ausübt, Kompensationsmechanismen vorhanden sind. Geht man davon aus, dass die meisten Funktionen ohnehin durch die auf CD24 vorhandenen Glykane vermittelt werden, könnten eventuell andere Proteine, die diese Glykane ebenfalls tragen und ähnlich präsentieren, Aufgaben von CD24 übernehmen. Daher ist es weiterhin wichtig, die Glykane von CD24 und deren Funktionen zu analysieren. Auch in der Rolle von CD24 bei Multipler Sklerose oder verschiedenen Tumorarten sollte der Einfluss seiner Glykane

mehr in Betracht gezogen werden, da CD24 ein beispielhaftes Molekül darstellt, um die Wichtigkeit von Glykanen für viele biologischen Prozesse zu untersuchen.

Das Lewis^x-Glykan spielt nicht nur auf CD24 eine wichtige funktionelle Rolle, sondern auch bei der Metastasierung verschiedener Tumorarten, bei Entzündungsreaktionen sowie bei einer Vielzahl von Infektionen und ist daher ein ideales Ziel für therapeutische Anwendungen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden deshalb kleine organische Mimetika gesucht, die statt des Lewis^x-Glykans in Forschung und Medizin Einsatz finden können. Nach Screening einer Substanzbibliothek aus 20000 organischen Substanzen, der Validierung und verschiedenen Kontrollen konnte eine Substanz identifiziert werden, die auch im Primärkulturtest den gleichen Effekt wie das Lewis^x-Glykan hervorrufen kann (siehe 6.7). Für einen therapeutischen Einsatz dieser Substanz bleibt herauszufinden, ob es sich bei der aktiven Substanz um ein Dimer handelt und wie die chemische Struktur zusammengesetzt ist. Die aktive Struktur müsste weiteren Tests unterzogen werden um zu untersuchen, ob sie tatsächlich geeignet ist beispielsweise die Auswirkungen von Infektionen mit *H. pylori* oder *Schistosoma* zu lindern oder die Metastasierung von Tumoren zu hemmen.

8 Zusammenfassung

CD24 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das wichtige Glykane wie α 2,3-Sialinsäure und Lewis^x trägt. CD24 fördert das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und inhibiert das von Hinterwurzelganglienneuronen (DRG-Neuronen). Um die Mechanismen dieser gegenteiligen Effekte von CD24 zu verstehen, wurden die molekularen Unterschiede in den beiden Zelltypen untersucht. Dabei konnten die beiden Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3 als funktionelle Rezeptoren für CD24 sowohl in Kleinhirn- als auch in DRG-Neuronen identifiziert werden. Die physiologische Assoziation von TAG-1 und F3 mit CD24 sowie eine direkte Bindung konnte mittels Immunpräzipitation, Immunzytochemie und *Pulldown*-Experimenten gezeigt werden. Sowohl in Kleinhirn- als auch in DRG-Neuronen binden L1 über α 2,3-Sialinsäure sowie TAG-1 und F3 über Lewis^x in *trans* an CD24. Die CD24-abhängige Förderung des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen wird durch einen neuronalen Komplex aus L1, TAG-1 und F3 unabhängig von Caspr und Caspr2 vermittelt. Da auch das Neuritenwachstum von hippocampalen Neuronen durch CD24 gefördert wird, könnte dies einen generellen Mechanismus in allen ähnlichen, unmyelinisierten Neuronentypen des zentralen Nervensystems darstellen. Dagegen wirken TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von DRG-Neuronen synergistisch in zwei neuronalen Komplexen aus L1, TAG-1 und Caspr2 oder L1, F3 und Caspr. Die Beteiligung von Caspr und Caspr2 ist wahrscheinlich für die Inhibition des Neuritenwachstums bei DRG-Neuronen verantwortlich. Die Signaltransduktion, die dort durch CD24 hervorgerufen wird und zur Inhibition des Neuritenwachstums führt, könnte in allen ähnlichen, myelinisierten Neuronentypen auf diese Weise ablaufen, da auch für das Neuritenwachstum von Motoneuronen eine Inhibition durch CD24 gezeigt werden konnte und dieser Effekt aus früheren Arbeiten für perinatale retinale Ganglienzellen bekannt ist.

Obwohl schon seit mehr als zehn Jahren mit CD24-defizienten Mäusen gearbeitet wird gibt es bislang keine veröffentlichten Erkenntnisse zum Verhalten dieser Mäuse. CD24 übt jedoch Funktionen im Kleinhirn und in Motoneuronen aus. Außerdem wurde kürzlich in verschiedenen Studien gezeigt, dass Mäuse, die kein Lewis^x synthetisieren, in Verhaltensstudien ängstlicher reagieren und dass das Kleinhirn an der Konditionierung bei Furchtverhalten beteiligt ist. Die Defizienz von CD24 könnte demnach die motorischen Fähigkeiten und das Angst- bzw. Furchtverhalten von Mäusen beeinflussen. Im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Verhaltensexperimente mit CD24-defizienten Mäusen und deren Wildtyp-Geschwister konnten diesbezüglich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen aufweisen.

Das Lewis^x-Glykan ist nicht nur für die Funktionen von CD24 wichtig, sondern spielt auch in vielen weiteren medizinisch relevanten Prozessen wie Infektionen und Krebserkrankungen eine große Rolle. Ein Molekül, das die gleichen Eigenschaften wie das Lewis^x-Glykan besitzt und sich zudem für therapeutische Einsätze eignet, kann hilfreich bei der Behandlung solcher Krankheiten sein. Um organische Mimetika für Lewis^x zu finden, wurde ein Screening einer Bibliothek aus 20000 organischen Substanzen durchgeführt. Nach der Validierung und der Analyse in neuronalen Primärkulturen konnte eine Substanz identifiziert werden, die die gleichen Effekte wie das Lewis^x-Glykan hervorruft. Weitere Analysen und Optimierungen dieser Substanz müssen durchgeführt werden, bevor sie in Zukunft möglicherweise auch die Lewis^x-abhängigen Auswirkungen von mikrobiellen Infektionen lindern bzw. Metastasierungen von Tumoren hemmen kann.

9 Summary

CD24 is a cell adhesion molecule that carries important glycans like α 2,3-linked sialic acid and Lewis^x. It promotes neurite outgrowth of cerebellar neurons and inhibits that of dorsal root ganglion (DRG) neurons. This is why the underlying molecular mechanisms that lead to these opposing effects amongst the two cell types were investigated. In an effort to understand these mechanisms, the cell adhesion molecules TAG-1 and F3 were identified as functional Lewis^x receptors for CD24. A direct interaction of TAG-1 and F3 with CD24 was established by immunoprecipitation, immunocytochemical and pulldown experiments. In *in vitro* assays, both TAG-1 and F3 were shown to be receptors mediating CD24-dependent neurite outgrowth of cerebellar and DRG neurons.

Furthermore, the promotion of cerebellar neurite outgrowth by CD24 is mediated by a neuronal complex of L1, TAG-1 and F3 which acts independently from Caspr or Caspr2. CD24 binds in *trans* to L1 via its α 2,3-linked sialic acid and to TAG-1 and F3 via its Lewis^x. Neurites of hippocampal neurons were also promoted to grow by CD24 which is a phenomenon similar to that of cerebellar neurons. Taking all these experiments into account, it can be proposed that the promotion of neurite outgrowth by CD24 is a general mechanism in unmyelinated neurons of the central nervous system. In contrast, TAG-1 and F3 mediate the inhibition of neurite outgrowth of DRG neurons by the synergism of two neuronal complexes of L1, TAG-1 and Caspr2 or L1, F3 and Caspr. Again the formation of these complexes is mediated by α 2,3-linked sialic acid and Lewis^x with L1 and TAG-1 or F3, respectively. The involvement of Caspr and Caspr2 may explain the inhibitory effect of CD24. This inhibition may be occurring on all myelinated neurons, given that neurite outgrowth of motoneurons was inhibited also by CD24 and this inhibitory effect has been observed previously with perinatal retinal ganglion cells.

Though mice deficient for CD24 have been created more than ten years ago, there have been no studies describing the behavior of such mice. Recent studies have shown that Lewis^x deficient mice display traits of increased anxiety like behaviors and that the cerebellum is involved in fear-related memory. As CD24 is an important carrier of Lewis^x and modulates neurite outgrowth of cerebellar and motoneurons, it can be hypothesized that CD24 deficiency could lead to impaired motor-coordination or anxiety- or fear-related behavior. However, experiments performed to identify these traits in CD24 deficient mice showed no significant differences when compared to their wildtype littermates.

The Lewis^x glycan not only plays an important role for the functionality of CD24 but is also important during a multitude of clinically relevant processes of infection and cancer. A drug like molecule that behaves like the Lewis^x glycan can be useful in treating these diseases. To identify small organic compounds mimicking Lewis^x, a high throughput screening with a library of 20000 organic compounds was performed. After validation of the hits and analysis in neuronal primary cultures to test their ability to mimic Lewis^x, one compound was identified to be suitable to be a lead compound. Further analysis and optimization of this compound is to be performed before it may also prove of interest for the prevention of microbial infections and cancers involving Lewis^x molecules.

Literaturverzeichnis

- S. Aigner, Z.M. Stoeber, M. Fogel, E. Weber, J. Zarn, M. Ruppert, Y. Zeller, D. Vestweber, R. Stahl, M. Sammar und P. Altevogt. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*, 89:3385–3395, May 1997.
- A. Alavi und J.S. Axford. Sweet and sour: the impact of sugars on disease. *Rheumatology (Oxford)*, 47:760–770, Jun 2008.
- J. Altman. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer. *J. Comp. Neurol.*, 145:465–513, Aug 1972.
- P.W. Andrews, E. Gönczöl, B.A. Fenderson, E.H. Holmes, G. O'Malley, S. Hakomori und S. Plotkin. Human cytomegalovirus induces stage-specific embryonic antigen 1 in differentiating human teratocarcinoma cells and fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 169:1347–1359, Apr 1989.
- E.F. Annison und W.T. Morgan. The 'Lewis' (Lea) human blood-group substance. *Biochem. J.*, 49:xxiv, Jul 1951.
- K.W. Ashwell und J.K. Mai. A transient CD15 immunoreactive sling in the developing mouse cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 15:883–889, Nov 1997a.
- K.W. Ashwell und J.K. Mai. Transient developmental expression of CD15 in the motor and auditory cortex of the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 100:143–148, May 1997b.
- K.W. Ashwell und J.K. Mai. Developmental expression of the CD15 epitope in the hippocampus of the mouse. *Cell Tissue Res.*, 289:17–23, Jul 1997c.
- K.W. Ashwell und J.K. Mai. Developmental expression of the CD15-epitope in the brainstem and spinal cord of the mouse. *Anat. Embryol.*, 196:13–25, Jul 1997d.
- X.F. Bai, J.Q. Liu, X. Liu, Y. Guo, K. Cox, J. Wen, P. Zheng und Y. Liu. The heat-stable antigen determines pathogenicity of self-reactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.*, 105:1227–1232, May 2000.
- X.F. Bai, O. Li, Q. Zhou, H. Zhang, P.S. Joshi, X. Zheng, Y. Liu, Y. Wang, P. Zheng und Y. Liu. CD24 controls expansion and persistence of autoreactive T cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 200:447–458, Aug 2004.
- Y. Bailly, K. Kyriakopoulou, N. Delhaye-Bouchaud, J. Mariani und D. Karagogeos. Cerebellar granule cell differentiation in mutant and X-irradiated rodents revealed by the neural adhesion molecule TAG-1. *J. Comp. Neurol.*, 369:150–161, May 1996.
- D. Bartsch und J.K. Mai. Distribution of the 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine (FAL) epitope in the adult mouse brain. *Cell Tissue Res.*, 263:353–366, Feb 1991.
- P. Baumann, N. Cremers, F. Kroese, G. Orend, R. Chiquet-Ehrismann, T. Uede, H. Yagita und J.P. Sleeman. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.*, 65:10783–10793, Dec 2005.

- J.M. Belloso, I. Bache, M. Guitart, M.R. Caballin, C. Halgren, M. Kirchhoff, H.H. Ropers, N. Tommerup und Z. Tümer. Disruption of the CNTNAP2 gene in a t(7;15) translocation family without symptoms of Gilles de la Tourette syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.*, 15:711–713, Jun 2007.
- R. Belvindrah, G. Rougon und G. Chazal. Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *J. Neurosci.*, 22:3594–3607, May 2002.
- M. Berardi, C. Hindelang, J.M. Félix und M.E. Stoeckel. L1 and laminin: their expression during rat hypophysis ontogenesis and in adult neurohemal areas. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 17:121–130, Apr 1999.
- E.O. Berglund, K.K. Murai, B. Fredette, G. Sekerková, B. Marturano, L. Weber, E. Mugnaini und B. Ranscht. Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron*, 24:739–750, Nov 1999.
- M.A. Bhat, J.C. Rios, Y. Lu, G.P. Garcia-Fresco, W. Ching, M. St Martin, J. Li, S. Einheber, M. Chesler, J. Rosenbluth, J.L. Salzer und H.J. Bellen. Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron*, 30:369–383, May 2001.
- V. Bogoevska, P. Nollau, L. Lucka, D. Grunow, B. Klampe, L.M. Uotila, A. Samsen, C.G. Gahmberg und C. Wagener. DC-SIGN binds ICAM-3 isolated from peripheral human leukocytes through Lewis x residues. *Glycobiology*, 17:324–333, Mar 2007.
- C. Bonnon, C. Bel, L. Goutebroze, B. Maigret, J.A. Girault und C. Faivre-Sarrailh. PGY repeats and N-glycans govern the trafficking of paranodin and its selective association with contactin and neurofascin-155. *Mol. Biol. Cell*, 18:229–241, Jan 2007.
- M.E. Boyle, E.O. Berglund, K.K. Murai, L. Weber, E. Peles und B. Ranscht. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron*, 30:385–397, May 2001.
- F. Brendel. Untersuchungen zu der zuckerabhängigen Interaktion der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24 und ihrer funktionellen Bedeutung im Nervensystem der Maus. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg*, 2005.
- C. Brito, C. Escrevente, C.A. Reis, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski und J. Costa. Increased levels of fucosyltransferase IX and carbohydrate Lewis(x) adhesion determinant in human NT2N neurons. *J. Neurosci. Res.*, 85:1260–1270, May 2007.
- T. Brümmendorf und F.G. Rathjen. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile*, 2:963–1108, 1995.
- T. Brümmendorf und F.G. Rathjen. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6:584–593, Oct 1996.
- T. Brümmendorf, M. Hubert, U. Treubert, R. Leuschner, A. Tárnok und F.G. Rathjen. The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron*, 10:711–727, Apr 1993.
- T. Brümmendorf, S. Kenwrick und F.G. Rathjen. Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 8:87–97, Feb 1998.

- I. Brockhausen. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.*, 7:599–604, Jun 2006.
- A. Buchstaller, S. Kunz, P. Berger, B. Kunz, U. Ziegler, C. Rader und P. Sonderegger. Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion. *J. Cell Biol.*, 135:1593–1607, Dec 1996.
- M. Buttiglione, J.M. Revest, G. Rougon und C. Faivre-Sarrailh. F3 neuronal adhesion molecule controls outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cell neurites: a cell-type-specific effect mediated by the Ig-like domains. *Mol. Cell. Neurosci.*, 8:53–69, 1996.
- M. Buttiglione, J.M. Revest, O. Pavlou, D. Karageorgos, A. Furley, G. Rougon und C. Faivre-Sarrailh. 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, Sep 1998.
- V. Calaora, G. Chazal, P.J. Nielsen, G. Rougon und H. Moreau. mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience*, 73:581–594, Jul 1996.
- A. Capela und S. Temple. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron*, 35:865–875, Aug 2002.
- A. Capela und S. Temple. LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev. Biol.*, 291:300–313, Mar 2006.
- V. Castellani, A. Chédotal, M. Schachner, C. Faivre-Sarrailh und G. Rougon. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron*, 27:237–249, Aug 2000.
- J.R. Chan, T.A. Watkins, J.M. Cosgaya, C. Zhang, L. Chen, L.F. Reichardt, E.M. Shooter und B.A. Barres. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron*, 43:183–191, Jul 2004.
- E. Chatzopoulou, A. Miguez, M. Savvaki, G. Levasseur, A. Muzerelle, M.P. Muriel, O. Goureau, K. Watanabe, L. Goutebroze, P. Gaspar, B. Zalc, D. Karageorgos und J.L. Thomas. Structural requirement of TAG-1 for retinal ganglion cell axons and myelin in the mouse optic nerve. *J. Neurosci.*, 28:7624–7636, Jul 2008.
- I. Coman, G. Barbin, P. Charles, B. Zalc und C. Lubetzki. Axonal signals in central nervous system myelination, demyelination and remyelination. *J. Neurol. Sci.*, 233:67–71, Jun 2005.
- I. Coman, M.S. Aigrot, D. Seilhean, R. Reynolds, J.A. Girault, B. Zalc und C. Lubetzki. Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, 129:3186–3195, Dec 2006.
- P.J. Coombs, S.A. Graham, K. Drickamer und M.E. Taylor. Selective binding of the scavenger receptor C-type lectin to LewisX trisaccharide and related glycan ligands. *J. Biol. Chem.*, 280:22993–22999, Jun 2005.
- S. Corti, F. Locatelli, D. Papadimitriou, R. Del Bo, M. Nizzardo, M. Nardini, C. Donadoni, S. Salani, F. Fortunato, S. Strazzer, N. Bresolin und G.P. Comi. Neural stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model. *Brain*, 130:1289–1305, May 2007.

- K.L. Crossin und L.A. Krushel. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.*, 218:260–279, Jun 2000.
- M. Denaxa, O. Pavlou, P. Tsiotra, G.C. Papadopoulos, K. Liapaki, K. Theodorakis, C. Papadaki, D. Karagogeos und J. Papamatheakis. The upstream regulatory region of the gene for the human homologue of the adhesion molecule TAG-1 contains elements driving neural specific expression in vivo. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 118:91–101, Oct 2003.
- K.A. Eberhardt, A. Irintchev, A.A. Al-Majed, O. Simova, T.M. Brushart, T. Gordon und M. Schachner. BDNF/TrkB signaling regulates HNK-1 carbohydrate expression in regenerating motor nerves and promotes functional recovery after peripheral nerve repair. *Exp. Neurol.*, 198:500–510, Apr 2006.
- S. Einheber, G. Zanazzi, W. Ching, S. Scherer, T.A. Milner, E. Peles und J.L. Salzer. The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J. Cell Biol.*, 139:1495–1506, Dec 1997.
- M.T. Elola, M.I. Capurro, M.M. Barrio, P.J. Coombs, M.E. Taylor, K. Drickamer und J. Mordoh. Lewis x antigen mediates adhesion of human breast carcinoma cells to activated endothelium. Possible involvement of the endothelial scavenger receptor C-type lectin. *Breast Cancer Res. Treat.*, 101:161–174, Jan 2007.
- B. Espinosa, R. Zenteno, R. Mena, Y. Robitaille, E. Zenteno und J. Guevara. O-Glycosylation in sprouting neurons in Alzheimer disease, indicating reactive plasticity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 60:441–448, May 2001.
- B. Espinosa, J. Guevara, P. Hernández, M.C. Slomianny, A. Guzmán, S. Martínez-Cairo und E. Zenteno. Characterization of an O-glycosylated plaque-associated protein from Alzheimer disease brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 62:34–41, Jan 2003.
- C. Faivre-Sarrailh, F. Gauthier, N. Denisenko-Nehrbass, A. Le Bivic, G. Rougon und J.A. Girault. The glycosylphosphatidylinositol-anchored adhesion molecule F3/contactin is required for surface transport of paranodin/contactin-associated protein (caspr). *J. Cell Biol.*, 149:491–502, Apr 2000.
- H. Feinberg, M.E. Taylor und W.I. Weis. Scavenger receptor C-type lectin binds to the leukocyte cell surface glycan Lewis(x) by a novel mechanism. *J. Biol. Chem.*, 282:17250–17258, Jun 2007.
- B.A. Fenderson, U. Zehavi und S. Hakomori. A multivalent lacto-N-fucopentaose III-lysyllysine conjugate decompacts preimplantation mouse embryos, while the free oligosaccharide is ineffective. *J. Exp. Med.*, 160:1591–1596, Nov 1984.
- S.O. Fetissov, U. Bergström, J.E. Johansen, T. Hökfelt, M. Schalling und B. Ranscht. Alterations of arcuate nucleus neuropeptidergic development in contactin-deficient mice: comparison with anorexia and food-deprived mice. *Eur. J. Neurosci.*, 22:3217–3228, Dec 2005.
- D. Fitzli, E.T. Stoeckli, S. Kunz, K. Siribour, C. Rader, B. Kunz, S.V. Kozlov, A. Buchstaller, R.P. Lane, D.M. Suter, W.J. Dreyer und P. Sonderegger. A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons. *J. Cell Biol.*, 149:951–968, May 2000.
- N. Fox, I. Damjanov, A. Martinez-Hernandez, B.B. Knowles und D. Solter. Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev. Biol.*, 83:391–398, Apr 1981.

- N. Fox, I. Damjanov, B.B. Knowles und D. Solter. Immunohistochemical localization of the mouse stage-specific embryonic antigen 1 in human tissues and tumors. *Cancer Res.*, 43:669–678, Feb 1983.
- J.P. Fraher. Quantitative studies on the maturation of central and peripheral parts of individual ventral motoneuron axons. I. Myelin sheath and axon calibre. *J. Anat.*, 126:509–533, Aug 1978.
- E. Fransen, V. Lemmon, G. Van Camp, L. Vits, P. Coucke und P.J. Willems. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur. J. Hum. Genet.*, 3:273–284, 1995.
- F. Fukamauchi, O. Aihara, Y.J. Wang, K. Akasaka, Y. Takeda, M. Horie, H. Kawano, K. Sudo, M. Asano, K. Watanabe und Y. Iwakura. TAG-1-deficient mice have marked elevation of adenosine A1 receptors in the hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281:220–226, Feb 2001.
- A.J. Furley, S.B. Morton, D. Manalo, D. Karagogeos, J. Dodd und T.M. Jessell. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell*, 61:157–170, Apr 1990.
- C. Galustian, C.G. Park, W. Chai, M. Kiso, S.A. Bruening, Y.S. Kang, R.M. Steinman und T. Feizi. High and low affinity carbohydrate ligands revealed for murine SIGN-R1 by carbohydrate array and cell binding approaches, and differing specificities for SIGN-R3 and langerin. *Int. Immunol.*, 16:853–866, Jun 2004.
- A. Gocht, G. Zeunert, R. Laas und J. Löhler. The carbohydrate epitope 3-fucosyl-N-acetyllactosamine is developmentally regulated in the human cerebellum. *Anat. Embryol.*, 186:543–556, Dec 1992.
- A. Gocht, G. Struckhoff und J. Löhler. CD15-containing glycoconjugates in the central nervous system. *Histol. Histopathol.*, 11:1007–1028, Oct 1996.
- L. Gollan, D. Salomon, J.L. Salzer und E. Peles. Caspr regulates the processing of contactin and inhibits its binding to neurofascin. *J. Cell Biol.*, 163:1213–1218, Dec 2003.
- M. Gotz, A. Wizenmann, S. Reinhardt, A. Lumsden und J. Price. Selective adhesion of cells from different telencephalic regions. *Neuron*, 16:551–564, Mar 1996.
- M. Grumet, D.R. Friedlander und G.M. Edelman. Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes. Commun.*, 1:177–190, Sep 1993.
- J.L. Guruge, P.G. Falk, R.G. Lorenz, M. Dans, H.P. Wirth, M.J. Blaser, D.E. Berg und J.I. Gordon. Epithelial attachment alters the outcome of Helicobacter pylori infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:3925–3930, Mar 1998.
- M. Hahne, R.H. Wenger, D. Vestweber und P.J. Nielsen. The heat-stable antigen can alter very late antigen 4-mediated adhesion. *J. Exp. Med.*, 179:1391–1395, Apr 1994.
- S. Hakomori. Carbohydrate-to-carbohydrate interaction, through glycosynapse, as a basis of cell recognition and membrane organization. *Glycoconj. J.*, 21:125–137, 2004.
- S. Hakomori. Le(X) and related structures as adhesion molecules. *Histochem. J.*, 24:771–776, Nov 1992.

- P.C. Heiland, L.S. Griffith, R. Lange, M. Schachner, B. Hertlein, O. Traub und B. Schmitz. Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *Eur. J. Cell Biol.*, 75: 97–106, Feb 1998.
- R. Horstkorte, M. Schachner, J.P. Magyar, T. Vorherr und B. Schmitz. The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.*, 121:1409–1421, Jun 1993.
- E.F. Hounsell, H.C. Gooi und T. Feizi. The monoclonal antibody anti-SSEA-1 discriminates between fucosylated type 1 and type 2 blood group chains. *FEBS Lett.*, 131:279–282, Aug 1981.
- S.C. Hsu, T.H. Tsai, H. Kawasaki, C.H. Chen, B. Plunkett, R.T. Lee, Y.C. Lee und S.K. Huang. Antigen coupled with Lewis-x trisaccharides elicits potent immune responses in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119:1522–1528, Jun 2007.
- H. Hu. Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors. *J. Neurosci. Res.*, 61:480–492, Sep 2000.
- Q.D. Hu, Q.H. Ma, G. Gennarini und Z.C. Xiao. Cross-talk between F3/contactin and Notch at axoglial interface: a role in oligodendrocyte development. *Dev. Neurosci.*, 28:25–33, 2006.
- T. Imura, I. Nakano, H.I. Kornblum und M.V. Sofroniew. Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes. *Glia*, 53:277–293, Feb 2006.
- K. Itoh, S. Fushiki, H. Kamiguchi, B. Arnold, P. Altevogt und V. Lemmon. Disrupted Schwann cell-axon interactions in peripheral nerves of mice with altered L1-integrin interactions. *Mol. Cell. Neurosci.*, 30:624–629, Dec 2005.
- T.M. Jessell, M.A. Hynes und J. Dodd. Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 13:227–255, 1990.
- K.R. Jones, I. Fariñas, C. Backus und L.F. Reichardt. Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, 76: 989–999, Mar 1994.
- G. Kadmon, M. Eckert, M. Sammar, M. Schachner und P. Altevogt. Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.*, 118:1245–1258, Sep 1992.
- G. Kadmon, B.A. Imhof, P. Altevogt und M. Schachner. Adhesive hierarchy involving the cell adhesion molecules L1, CD24, and alpha 6 integrin in murine neuroblastoma N2A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214:94–101, Sep 1995a.
- G. Kadmon, F. von Bohlen und Halbach, R. Horstkorte, M. Eckert, P. Altevogt und M. Schachner. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 7:993–1004, May 1995b.
- N. Kaila, W.S. Somers, B.E. Thomas, P. Thakker, K. Janz, S. DeBernardo, S. Tam, W.J. Moore, R. Yang, W. Wrona, P.W. Bedard, D. Crommie, J.C. Keith, D.H. Tsao, J.C. Alvarez, H. Ni, E. Marchese, J.T. Patton, J.L. Magnani und R.T. Camphausen. Quinic acid derivatives as sialyl Lewis(x)-mimicking selectin inhibitors: design, synthesis, and crystal structure in complex with E-selectin. *J. Med. Chem.*, 48:4346–4357, Jun 2005.

- H. Kamiguchi und V. Lemmon. Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J. Neurosci. Res.*, 49:1–8, Jul 1997.
- H. Kamiguchi, M.L. Hlavin und V. Lemmon. Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol. Cell. Neurosci.*, 12:48–55, Sep 1998.
- N.C. Kaneider, A.J. Leger und A. Kuliopulos. Therapeutic targeting of molecules involved in leukocyte-endothelial cell interactions. *FEBS J.*, 273:4416–4424, Oct 2006.
- D. Karagogeos. Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. *Front. Biosci.*, 8:s1304–1320, Sep 2003.
- R. Kay, F. Takei und R.K. Humphries. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J. Immunol.*, 145:1952–1959, Sep 1990.
- G. Kempermann, D. Gast und F.H. Gage. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann. Neurol.*, 52:135–143, Aug 2002.
- R. Kleene und M. Schachner. Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5:195–208, Mar 2004.
- R. Kleene, H. Yang, M. Kutsche und M. Schachner. The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.*, 276:21656–21663, Jun 2001.
- A.G. Koszowski, G.C. Owens und S.R. Levinson. The effect of the mouse mutation claw paw on myelination and nodal frequency in sciatic nerves. *J. Neurosci.*, 18:5859–5868, Aug 1998.
- E. Köttgen, W. Reutter und R. Tauber. [Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine]. *Med. Klin. (Munich)*, 98:717–738, Dec 2003.
- T. Kudo, M. Kaneko, H. Iwasaki, A. Togayachi, S. Nishihara, K. Abe und H. Narimatsu. Normal embryonic and germ cell development in mice lacking alpha 1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) which show disappearance of stage-specific embryonic antigen 1. *Mol. Cell. Biol.*, 24:4221–4228, May 2004.
- T. Kudo, T. Fujii, S. Ikegami, K. Inokuchi, Y. Takayama, Y. Ikehara, S. Nishihara, A. Togayachi, S. Takahashi, K. Tachibana, S. Yuasa und H. Narimatsu. Mice lacking alpha1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors. *Glycobiology*, 17:1–9, Jan 2007.
- T.B. Kuhn, E.T. Stoeckli, M.A. Condrau, F.G. Rathjen und P. Sonderegger. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.*, 115:1113–1126, Nov 1991.
- S. Kunz, M. Spirig, C. Ginsburg, A. Buchstaller, P. Berger, R. Lanz, C. Rader, L. Vogt, B. Kunz und P. Sonderegger. Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin-1 and Ng cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.*, 143:1673–1690, Dec 1998.
- C.O. Law, R.J. Kirby, S. Aghamohammadzadeh und A.J. Furley. The neural adhesion molecule TAG-1 modulates responses of sensory axons to diffusible guidance signals. *Development*, 135:2361–2371, Jul 2008.

- J.G. Leroy. Congenital disorders of N-glycosylation including diseases associated with O- as well as N-glycosylation defects. *Pediatr. Res.*, 60:643–656, Dec 2006.
- O. Li, X. Chang, H. Zhang, E. Kocak, C. Ding, P. Zheng und Y. Liu. Massive and destructive T cell response to homeostatic cue in CD24-deficient lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.*, 203:1713–1720, Jul 2006.
- S.W. Lin, T.M. Yuan, J.R. Li und C.H. Lin. Carboxyl terminus of Helicobacter pylori alpha1,3-fucosyltransferase determines the structure and stability. *Biochemistry*, 45:8108–8116, Jul 2006.
- J.Q. Liu, J.W. Carl, P.S. Joshi, A. RayChaudhury, X.A. Pu, F.D. Shi und X.F. Bai. CD24 on the resident cells of the central nervous system enhances experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 178:6227–6235, May 2007.
- Y. Liu und M.C. Halloran. Central and peripheral axon branches from one neuron are guided differentially by Semaphorin3D and transient axonal glycoprotein-1. *J. Neurosci.*, 25:10556–10563, Nov 2005.
- Y. Liu und P. Zheng. CD24: a genetic checkpoint in T cell homeostasis and autoimmune diseases. *Trends Immunol.*, 28:315–320, Jul 2007.
- Y. Liu, B. Jones, A. Aruffo, K.M. Sullivan, P.S. Linsley und C.A. Janeway. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J. Exp. Med.*, 175:437–445, Feb 1992.
- J.B. Lowe und J.D. Marth. A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu. Rev. Biochem.*, 72:643–691, 2003.
- A. Lüthi, J.P. Laurent, A. Figurov, D. Muller und M. Schachner. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature*, 372:777–779, 1994.
- J.D. Malhotra, P. Tsiotra, D. Karagogeos und M. Hortsch. Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. *J. Biol. Chem.*, 273:33354–33359, Dec 1998.
- P.F. Maness und M. Schachner. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.*, 10:19–26, Jan 2007.
- R.K. Margolis, U. Rauch, P. Maurel und R.U. Margolis. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol*, 3:273–290, 1996.
- T. Marquardt und J. Denecke. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur. J. Pediatr.*, 162:359–379, Jun 2003.
- R. Martini. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J. Neurocytol.*, 23:1–28, Jan 1994.
- R. Martini, M. Schachner und T.M. Brushart. The L2/HNK-1 carbohydrate is preferentially expressed by previously motor axon-associated Schwann cells in reinnervated peripheral nerves. *J. Neurosci.*, 14:7180–7191, Nov 1994.
- P.W. Mason, J.W. Bigbee und G.H. DeVries. Cerebellar granule cells contain a membrane mitogen for cultured Schwann cells. *J. Cell Biol.*, 108:607–611, Feb 1989.

- T. Masuda, N. Okado und T. Shiga. The involvement of axonin-1/SC2 in mediating notochord-derived chemorepulsive activities for dorsal root ganglion neurites. *Dev. Biol.*, 224:112–121, Aug 2000.
- T. Masuda, F. Fukamauchi, Y. Takeda, H. Fujisawa, K. Watanabe, N. Okado und T. Shiga. Developmental regulation of notochord-derived repulsion for dorsal root ganglion axons. *Mol. Cell. Neurosci.*, 25:217–227, Feb 2004.
- D. Muller, L. Stoppini, C. Wang und J.Z. Kiss. A role for polysialylated neural cell adhesion molecule in lesion-induced sprouting in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience*, 61:441–445, Aug 1994.
- M.A. Naarding, A.M. Dirac, I.S. Ludwig, D. Speijer, S. Lindquist, E.L. Vestman, M.J. Stax, T.B. Geijtenbeek, G. Pollakis, O. Hernell und W.A. Paxton. Bile salt-stimulated lipase from human milk binds DC-SIGN and inhibits human immunodeficiency virus type 1 transfer to CD4+ T cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50:3367–3374, Oct 2006.
- L.K. Needham, K. Thelen und P.F. Maness. Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J. Neurosci.*, 21:1490–1500, Mar 2001.
- P.J. Nielsen, B. Lorenz, A.M. Müller, R.H. Wenger, F. Brombacher, M. Simon, T. von der Weid, W.J. Langhorne, H. Mossmann und G. Köhler. Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood*, 89:1058–1067, Feb 1997.
- V. Nieoullon, R. Belvindrah, G. Rougon und G. Chazal. Mouse CD24 is required for homeostatic cell renewal. *Cell Tissue Res.*, 329:457–467, Sep 2007.
- S. Nishihara, H. Iwasaki, K. Nakajima, A. Togayachi, Y. Ikehara, T. Kudo, Y. Kushi, A. Furuya, K. Shitara und H. Narimatsu. Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fut9) determines Lewis X expression in brain. *Glycobiology*, 13:445–455, Jun 2003.
- C. Ohl, C. Albach, P. Altevogt und B. Schmitz. N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison. *Biochimie*, 85:565–573, Jun 2003.
- S. Olive, C. Dubois, M. Schachner und G. Rougon. 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, Nov 1995.
- S.B. Oppenheimer, M. Alvarez und J. Nnoli. Carbohydrate-based experimental therapeutics for cancer, HIV/AIDS and other diseases. *Acta Histochem.*, 110:6–13, 2008.
- O. Pavlou, K. Theodorakis, J. Falk, M. Kutsche, M. Schachner, C. Faivre-Sarrailh und D. Karagogeos. Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol. Cell. Neurosci.*, 20:367–381, Jul 2002.
- L. Pedraza, J.K. Huang und D.R. Colman. Organizing principles of the axoglial apparatus. *Neuron*, 30:335–344, May 2001.
- E. Peles, M. Nativ, M. Lustig, M. Grumet, J. Schilling, R. Martinez, G.D. Plowman und J. Schlessinger. Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J.*, 16:978–988, Mar 1997.

- F.E. Perrin, F.G. Rathjen und E.T. Stoeckli. Distinct subpopulations of sensory afferents require F11 or axonin-1 for growth to their target layers within the spinal cord of the chick. *Neuron*, 30: 707–723, Jun 2001.
- A.M. Pillai, G.P. Garcia-Fresco, A.D. Sousa, J.L. Dupree, B.D. Philpot und M.A. Bhat. No effect of genetic deletion of contactin-associated protein (CASPR) on axonal orientation and synaptic plasticity. *J. Neurosci. Res.*, 85:2318–2331, Aug 2007.
- S. Poliak, L. Gollan, R. Martinez, A. Custer, S. Einheber, J.L. Salzer, J.S. Trimmer, P. Shrager und E. Peles. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*, 24:1037–1047, Dec 1999.
- S. Poliak, D. Salomon, H. Elhanany, H. Sabanay, B. Kiernan, L. Pevny, C.L. Stewart, X. Xu, S.Y. Chiu, P. Shrager, A.J. Furley und E. Peles. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J. Cell Biol.*, 162:1149–1160, Sep 2003.
- C. Poncet, V. Frances, R. Gristina, C. Scheiner, J.F. Pellissier und D. Figarella-Branger. CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. *Acta Neuropathol.*, 91:400–408, 1996.
- A.S. Powlesland, E.M. Ward, S.K. Sadhu, Y. Guo, M.E. Taylor und K. Drickamer. Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins. *J. Biol. Chem.*, 281:20440–20449, Jul 2006.
- T. Pruss, E.U. Kranz, M. Niere und H. Volkmer. A regulated switch of chick neurofascin isoforms modulates ligand recognition and neurite extension. *Mol. Cell. Neurosci.*, 31:354–365, Feb 2006.
- J.C. Rios, C.V. Melendez-Vasquez, S. Einheber, M. Lustig, M. Grumet, J. Hemperly, E. Peles und J.L. Salzer. Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J. Neurosci.*, 20:8354–8364, Nov 2000.
- S. Runz, C.T. Mierke, S. Joumaa, J. Behrens, B. Fabry und P. Altevogt. CD24 induces localization of beta1 integrin to lipid raft domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365:35–41, Jan 2008.
- U. Rutishauser und L. Landmesser. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.*, 19:422–427, Oct 1996.
- B. Sacchetti, E. Baldi, C.A. Lorenzini und C. Bucherelli. Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:8406–8411, Jun 2002.
- E. Sagiv, A. Starr, U. Rozovski, R. Khosravi, P. Altevogt, T. Wang und N. Arber. Targeting CD24 for treatment of colorectal and pancreatic cancer by monoclonal antibodies or small interfering RNA. *Cancer Res.*, 68:2803–2812, Apr 2008.
- E.M. Sajdel-Sulkowska. Immunofluorescent detection of CD15-fucosylated glycoconjugates in primary cerebellar cultures and their function in glial-neuronal adhesion in the central nervous system. *Acta Biochim. Pol.*, 45:781–790, 1998.
- T. Sakurai, M. Lustig, J. Babiarz, A.J. Furley, S. Tait, P.J. Brophy, S.A. Brown, L.Y. Brown, C.A. Mason und M. Grumet. Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J. Cell Biol.*, 154:1259–1273, Sep 2001.

- J.L. Salzer. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*, 40:297–318, Oct 2003.
- M. Sammar, S. Aigner und P. Altevogt. Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1337:287–294, Feb 1997a.
- M. Sammar, E. Gulbins, K. Hilbert, F. Lang und P. Altevogt. Mouse CD24 as a signaling molecule for integrin-mediated cell binding: functional and physical association with src-kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234:330–334, May 1997b.
- B. Scelfo, B. Sacchetti und P. Strata. Learning-related long-term potentiation of inhibitory synapses in the cerebellar cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105:769–774, Jan 2008.
- C. Schmidt-Hieber, P. Jonas und J. Bischofberger. Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons. *J. Physiol. (Lond.)*, 586:1849–1857, Apr 2008.
- V. Senner, A. Sturm, I. Baur, U.H. Schrell, L. Distel und W. Paulus. CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 58:795–802, Aug 1999.
- S.M. Sheu, B.S. Sheu, H.B. Yang, H.Y. Lei und J.J. Wu. Anti-Lewis X antibody promotes Helicobacter pylori adhesion to gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*, 75:2661–2667, Jun 2007.
- D. Shewan, V. Calaora, P. Nielsen, J. Cohen, G. Rougon und H. Moreau. mCD24, a glycoprotein transiently expressed by neurons, is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurosci.*, 16:2624–2634, Apr 1996.
- Y. Shimoda, Y. Tajima, T. Osanai, A. Katsume, M. Kohara, T. Kudo, H. Narimatsu, N. Takashima, Y. Ishii, S. Nakamura, N. Osumi und Y. Sanai. Pax6 controls the expression of Lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating alpha 1,3-fucosyltransferase IX expression. *J. Biol. Chem.*, 277:2033–2039, Jan 2002.
- T. Shirasawa, T. Akashi, K. Sakamoto, H. Takahashi, N. Maruyama und K. Hirokawa. Gene expression of CD24 core peptide molecule in developing brain and developing non-neural tissues. *Dev. Dyn.*, 198:1–13, Sep 1993.
- M. Sibbe, M. Taniguchi, M. Schachner und U. Bartsch. Development of the corticospinal tract in Semaphorin3A- and CD24-deficient mice. *Neuroscience*, 150:898–904, Dec 2007.
- M.X. Silveyra, N. Cuadrado-Corrales, A. Marcos, M.S. Barquero, A. Rábano, M. Calero und J. Sáez-Valero. Altered glycosylation of acetylcholinesterase in Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurochem.*, 96:97–104, Jan 2006.
- O. Simova, A. Irintchev, A. Mehanna, J. Liu, M. Dihné, D. Bächle, N. Sewald, G. Loers und M. Schachner. Carbohydrate mimics promote functional recovery after peripheral nerve repair. *Ann. Neurol.*, 60:430–437, Oct 2006.
- S.C. Smith, G. Oxford, Z. Wu, M.D. Nitz, M. Conaway, H.F. Frierson, G. Hampton und D. Theodorescu. The metastasis-associated gene CD24 is regulated by Ral GTPase and is a mediator of cell proliferation and survival in human cancer. *Cancer Res.*, 66:1917–1922, Feb 2006.
- S. Soares, M. Traka, Y. von Boxberg, C. Bouquet, D. Karagogeos und F. Nothias. Neuronal and glial expression of the adhesion molecule TAG-1 is regulated after peripheral nerve lesion or central neurodegeneration of adult nervous system. *Eur. J. Neurosci.*, 21:1169–1180, Mar 2005.

- D. Solter und B.B. Knowles. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:5565–5569, Nov 1978.
- T. Springer, G. Galfrè, D.S. Secher und C. Milstein. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur. J. Immunol.*, 8:539–551, Aug 1978.
- K.A. Strauss, E.G. Puffenberger, M.J. Huettelman, S. Gottlieb, S.E. Dobrin, J.M. Parod, D.A. Stephan und D.H. Morton. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N. Engl. J. Med.*, 354:1370–1377, Mar 2006.
- A. Streit, C.T. Yuen, R.W. Loveless, A.M. Lawson, J. Finne, B. Schmitz, T. Feizi und C.D. Stern. The Le(x) carbohydrate sequence is recognized by antibody to L5, a functional antigen in early neural development. *J. Neurochem.*, 66:834–844, Feb 1996.
- T. Strelakova, C.T. Wotjak und M. Schachner. Intrahippocampal administration of an antibody against the HNK-1 carbohydrate impairs memory consolidation in an inhibitory learning task in mice. *Mol. Cell. Neurosci.*, 17:1102–1113, Jun 2001.
- Y. Takeda, Y. Murakami, H. Asou und K. Uyemura. The roles of cell adhesion molecules on the formation of peripheral myelin. *Keio J Med*, 50:240–248, Dec 2001.
- D. Thomaidou, D. Coquillat, S. Meintanis, M. Noda, G. Rougon und R. Matsas. Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases zeta/beta as the putative F3 receptors on Schwann cells. *J. Neurochem.*, 78:767–778, Aug 2001.
- M. Traka, L. Goutebroze, N. Denisenko, M. Bessa, A. Nifli, S. Havaki, Y. Iwakura, F. Fukamauchi, K. Watanabe, B. Soliven, J.A. Girault und D. Karageos. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J. Cell Biol.*, 162:1161–1172, Sep 2003.
- I. van Die, S.J. van Vliet, A.K. Nyame, R.D. Cummings, C.M. Bank, B. Appelmelk, T.B. Geijtenbeek und Y. van Kooyk. The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x. *Glycobiology*, 13:471–478, Jun 2003.
- A.M. Van Roon, K.K. Van de Vijver, W. Jacobs, E.A. Van Marck, G.J. Van Dam, C.H. Hokke und A.M. Deelder. Discrimination between the anti-monomeric and the anti-multimeric Lewis X response in murine schistosomiasis. *Microbes Infect.*, 6:1125–1132, Nov 2004.
- A. Varki. Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution. *Cell*, 126:841–845, Sep 2006.
- D.E. Vaughn und P.J. Bjorkman. The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron*, 16:261–273, Feb 1996.
- A.J. Verkerk, C.A. Mathews, M. Jooisse, B.H. Eussen, P. Heutink und B.A. Oostra. CNTNAP2 is disrupted in a family with Gilles de la Tourette syndrome and obsessive compulsive disorder. *Genomics*, 82:1–9, Jul 2003.
- A.A. Vyas und R.L. Schnaar. Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration. *Biochimie*, 83:677–682, Jul 2001.

- J. Wang, Y. Zhang, J. Wei, X. Zhang, B. Zhang, Z. Zhu, W. Zou, Y. Wang, Z. Mou, B. Ni und Y. Wu. Lewis X oligosaccharides targeting to DC-SIGN enhanced antigen-specific immune response. *Immunology*, 121:174–182, Jun 2007.
- R.H. Wenger, M. Ayane, R. Bose, G. Köhler und P.J. Nielsen. The genes for a mouse hematopoietic differentiation marker called the heat-stable antigen. *Eur. J. Immunol.*, 21:1039–1046, Apr 1991.
- R.H. Wenger, J.M. Rochelle, M.F. Seldin, G. Köhler und P.J. Nielsen. The heat stable antigen (mouse CD24) gene is differentially regulated but has a housekeeping promoter. *J. Biol. Chem.*, 268:23345–23352, Nov 1993.
- R.H. Wenger, M. Kopf, L. Nitschke, M.C. Lamers, G. Köhler und P.J. Nielsen. B-cell maturation in chimaeric mice deficient for the heat stable antigen (HSA/mouse CD24). *Transgenic Res.*, 4: 173–183, May 1995.
- A.E. Wiencken-Barger, J. Mavity-Hudson, U. Bartsch, M. Schachner und V.A. Casagrande. The role of L1 in axon pathfinding and fasciculation. *Cereb. Cortex*, 14:121–131, Feb 2004.
- P.M. Wood, M. Schachner und R.P. Bunge. Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J. Neurosci.*, 10:3635–3645, Nov 1990.
- S. Wopereis, D.J. Lefeber, E. Morava und R.A. Wevers. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin. Chem.*, 52:574–600, Apr 2006.
- M. Wuhrer, C.I. Balog, M.I. Catalina, F.M. Jones, G. Schramm, H. Haas, M.J. Doenhoff, D.W. Dunne, A.M. Deelder und C.H. Hokke. IPSE/alpha-1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. *FEBS J.*, 273:2276–2292, May 2006.
- J.A. Zarn, S.M. Zimmermann, M.K. Pass, R. Waibel und R.A. Stahel. Association of CD24 with the kinase c-fgr in a small cell lung cancer cell line and with the kinase lyn in an erythroleukemia cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225:384–391, Aug 1996.
- Y. Zhao, Y. Sato, T. Isaji, T. Fukuda, A. Matsumoto, E. Miyoshi, J. Gu und N. Taniguchi. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. *FEBS J.*, 275:1939–1948, May 2008.
- Q. Zhou, K. Rammohan, S. Lin, N. Robinson, O. Li, X. Liu, X.F. Bai, L. Yin, B. Scarberry, P. Du, M. You, K. Guan, P. Zheng und Y. Liu. CD24 is a genetic modifier for risk and progression of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:15041–15046, Dec 2003.
- R.A. Zuellig, C. Rader, A. Schroeder, M.B. Kalousek, F. Von Bohlen und Halbach, T. Osterwalder, C. Inan, E.T. Stoeckli, H.U. Affolter und A. Fritz. The axonally secreted cell adhesion molecule, axonin-1. Primary structure, immunoglobulin-like and fibronectin-type-III-like domains and glycosyl-phosphatidylinositol anchorage. *Eur. J. Biochem.*, 204:453–463, Mar 1992.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Lewis-Epitope	8
2.2	Schematische Darstellung von CD24	12
2.3	Ursprüngliches Modell für die Rolle von CD24 im Neuritenwachstum	17
2.4	Schematische Darstellung der Immunglobulinsuperfamilie	18
2.5	Von L1 induzierte Signalkaskaden (nach Maness und Schachner [2007])	20
2.6	Immunhistochemische Färbung des Ranvierschen Schnürrings [Poliak <i>et al.</i> , 1999] . .	23
2.7	Schema der Morphologie des Ranvierschen Schnürrings [Salzer, 2003]	24
2.8	Molekulare Zusammensetzung der Domänen von myelinisierten Nervenfasern [Salzer, 2003]	25
	(a) Ranvierscher Schnürring	25
	(b) Paranodale Region	25
	(c) Juxtaparanodale Region	25
6.1	Test verschiedener Lösungen zur Homogenisierung der Maushirne für die CD24-Aufreinigung	66
6.2	Test verschiedener Solubilisierungsmöglichkeiten für CD24	67
	(a) Solubilisierung mit verschiedenen Detergenzien	67
	(b) Solubilisierung mit Triton X-100 bei 37°C und 95°C	67
	(c) Solubilisierung mittels Phospholipase C	67
6.3	Test verschiedener Elutionspuffer bei der affinitätschromatographischen CD24-Aufreinigung	68
	(a) Elutionstest mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen	68
	(b) Elutionstest mit unterschiedlichen Detergenzien	68
6.4	Optimierte Aufreinigung von CD24	69
	(a) Schema der optimierten Aufreinigung von CD24	69
	(b) Solubiliertes CD24	69
	(c) Aufgereinigtes CD24	69
6.5	Versuch der CD24-Glykoformentrennung durch Affinitätschromatographie	70
6.6	Versuch der CD24-Glykoformentrennung durch Gelelution	70
	(a) Gelelution von CD24 ohne PNGase F-Verdau	70
	(b) Gelelution von CD24 nach PNGase F-Verdau	70
6.7	Versuch der CD24-Glykoformentrennung durch Anionenaustauschchromatographie . .	72
6.8	Neuritenwachstumsförderung bei Kleinhirnneuronen und -inhibition bei DRG-Neuronen durch CD24	74
	(a) Neuritenlängen von Wildtyp-Kleinhirnneuronen	74
	(b) Kleinhirnneurone auf PLL-, CD24- bzw. Laminin-Substrat	74
	(c) Neuritenlängen von Wildtyp-DRG-Neuronen	74
	(d) DRG-Neurone auf PLL- bzw. CD24-Substrat	74
6.9	Neuritenanzahl von Wildtyp-DRG-Neuronen	75
6.10	Funktionelle Relevanz von TAG-1 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen	76

6.11 Funktionelle Relevanz von F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Kleinhirn- und DRG-Neuronen	77
6.12 Kontrolle der Expressionslevel der am CD24-vermittelten Neuritenwachstum beteiligten Proteine	78
6.13 Assoziation von TAG-1 und F3 mit CD24 im Kleinhirn	79
(a) Immunpräzipitation mittels α CD24-Antikörper	79
(b) Immunpräzipitation mittels α TAG-1- und α F3-Antikörper	79
6.14 Bindung von TAG-1 und F3 an CD24	80
6.15 Immunzytochemie mit kultivierten DRG-Neuronen	82
(a) Färbung von L1 und TAG-1 mit CD24- <i>Fluospheres</i>	82
(b) Färbung von L1 und F3 mit CD24- <i>Fluospheres</i>	82
(c) Überlagerungen der Färbungen von L1 und TAG-1 bzw. F3 mit ungekoppelten <i>Fluospheres</i>	82
6.16 Synergistische Wirkung von TAG-1 und F3 im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von Wildtyp-DRG-Neuronen	83
6.17 Lewis ^x -Abhängigkeit des TAG-1- und F3-vermittelten Neuritenwachstums von DRG-Neuronen auf CD24	85
(a) Wildtyp- und TAG-1-defiziente DRG-Neuronen	85
(b) Wildtyp- und F3-defiziente DRG-Neuronen	85
6.18 Caspr bzw. Caspr2 als mögliche Korezeptoren von F3 bzw. TAG-1 in DRG-Neuronen	87
(a) TAG-1-defiziente DRG-Neuronen	87
(b) F3-defiziente DRG-Neuronen	87
(c) Wildtyp-DRG-Neuronen	87
6.19 Funktionelle Relevanz von Caspr im CD24-vermittelten Neuritenwachstum von DRG-Neuronen	88
6.20 Caspr- und Caspr2-Unabhängigkeit des CD24-vermittelten Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen	89
6.21 Förderung des Neuritenwachstums von Hippocampusneuronen durch CD24	91
(a) Neuritenlängen von Wildtyp-Hippocampusneuronen	91
(b) Hippocampusneurone auf PLL-, CD24- bzw. Laminin-Substrat	91
6.22 Inhibition des Neuritenwachstums von Motoneuronen durch CD24	92
(a) Neuritenlängen von Wildtyp-Motoneuronen	92
(b) Motoneurone auf PLO- bzw. CD24-Substrat	92
6.23 <i>Open field</i> -Test mit CD24-Mäusen	94
(a) Maus in der <i>Open field</i> -Arena	94
(b) Zurückgelegte Gesamtstrecke	94
(c) Durchschnittsgeschwindigkeit	94
(d) Aufenthaltsdauer im Zentrum	94
(e) Aufenthaltsdauer im Randbereich	94
6.24 <i>Pole</i> -Test mit CD24-Mäusen	95
(a) Maus beim Hinunterklettern der Holzstange mit Nistmaterial als Lockmittel	95
(b) Anteil der Mäuse, die sich im oberen Drittel drehten	95
6.25 <i>Beam walking</i> -Test mit CD24-Mäusen	96
(a) Maus beim Überqueren des Stabs	96
(b) Anteil der Fehlritte an der Gesamtschrittzahl	96
6.26 <i>Rotarod</i> -Test mit CD24-Mäusen	96
(a) Mäuse im <i>Rotarod</i>	96
(b) Dauer bis zum Kontaktverlust	96

6.27	<i>Fear conditioning</i> -Test mit CD24-Mäusen	98
	(a) Maus in der Schockkammer	98
	(b) Konditionierung	98
	(c) Zeitlicher Verlauf der Immobilität während der Extinktion	98
	(d) Übersicht für Kurz- und Langzeitextinktion	98
6.28	Schematische Darstellung des im Screen verwendeten Lewis ^x -ELISA	100
6.29	Beispielhafte Mikrotiterplatte aus dem Screen	101
6.30	Ergebnis der Clusteranalyse	102
6.31	Kontrollen im Lewis ^x -ELISA	103
	(a) Positiv- und Negativkontrollen	103
	(b) Kompetitionskontrolle	103
6.32	Validierung der Clustersubstanzen	104
	(a) Validierung von zwei Hauptsubstanzen aus je einem Cluster	104
	(b) Validierung aller Substanzen des relevanten Clusters	104
6.33	Chemische Strukturen der fünf im relevanten Cluster enthaltenen Substanzen	105
6.34	Kontrollen bei der Validierung der Cluster-Substanzen	106
	(a) Kontrolle für Antikörpermodifizierung	106
	(b) Kontrolle für Epitopmaskierung	106
6.35	Test der organischen Substanzen in Neuritenwachstumsexperimenten mit Wildtyp-Kleinhirnneuronen	108
7.1	Aktuelles Modell für die Rolle von CD24 im Neuritenwachstum	113

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

A	Adenosin
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ApCAM	<i>Aplysia Cell Adhesion Molecule</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AUFS	<i>Absorbance Units Full Scale</i>
BCA	Bicinchonininsäure
BIG	<i>Brain-derived Ig molecule</i>
BME	<i>Basal Medium Eagle</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)
BSSL	<i>Bile Salt-Stimulated Lipase</i>
C	Cytosin
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
Caspr	<i>Contactin-associated protein</i>
CCA	<i>gut-associated Circulating Cathodic Antigen</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDFE	<i>Cortical Dysplasie-Focal Epilepsy</i>
CDG	<i>Congenital Disorders of Glycosylation</i>
CHAPS	Cholamidopropyldimethylaminiopropansulfonat
CHL1	<i>Close Homolog of L1</i>
CNTNAP2	<i>Contactin Associated Protein 2</i> (humanes Gen für Caspr2)
CRASH	<i>Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spastic paraparesis, Hydrocephylus</i>
Cy	Cyanin (Fluorochrom)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH₂O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i> (Hinterwurzelganglion)
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (experimentelles Mausmodell für Multiple Sklerose)
EDAC	Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FNIII	Fibronectin Typ III-Repeat
Fuc	Fukose
Fut	Fukosyltransferase
G	Guanin
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
gp120	Glykoprotein 120 kD
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HBS	<i>Hepes Buffered Saline</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HNK-1	<i>Human Natural Killer cell glykan-1</i>
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
HSA	<i>Heat Stable Antigen (CD24)</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulinsuperfamilie
IP	Immunpräzipitation
IPSE	<i>Interleukin-1 inducing Principle from Schistosome Eggs</i>
LTP	Langzeitpotenzierung
MAG	<i>Myelin-Associated Glycoprotein</i>
Man	Mannose
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MUC1	Mucin 1
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NCP1	Neurexin IV/Caspr/Paranodin
NeuAc	Sialinsäure (Neuraminsäure)

NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernresonanzspektroskopie)
NrCAM	<i>NgCAM related Cell Adhesion Molecule</i>
OPD	Orthophenyldiamin
OSGE	O-Sialoglykoendopeptidase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK1	p21-aktivierte Kinase 1
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline + Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDZ	<i>Post synaptic density, Discs large, Zonula occludens-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Phosphoinositid
PIPLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-Lysin
PLO	Poly-L-Ornithin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	N-Glycosidase F
PrP	Prionprotein
PrP^c	<i>cellular Prion Protein</i>
PrP^{sc}	<i>Prion Protein scrapie form</i> (pathologische Form)
PSA	Polysialinsäure
RGC	retinale Ganglienzelle
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPTP	<i>Receptor Protein Tyrosin Phosphatase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SFM	serumfreies Medium
Siglec	<i>Sialic acid binding immunoglobulin-like lectin</i>
SIGNR	<i>DC-SIGN Related molecule</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes (systemische Autoimmunerkrankung)
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SRCL	<i>Scavenger Receptor C-type Lectin</i>
SSEA-1	<i>Stage-Specific Embryonic Antigen-1</i> (Lewis ^x)
T	Thymin
TAE	Tris Essigsäure EDTA
TAG-1	<i>Transient Axonal Glycoprotein-1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thy1	Thymozytenantigen 1
TIU	<i>Trypsin Inhibitor Unit</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TPCK	Tosylphenylalanylchloromethylketon
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ü.N.	über Nacht
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett

VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen 4</i>
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wnt-1	<i>Wingless & Int-1</i> (Integration site)
Xyl	Xylose
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Einheiten und Vorsätze

A	Ampere	
D	Dalton	
g	Gramm	
g	Erdbeschleunigung	$(9,81 \frac{m}{s^2})$
h	Stunde	
l	Liter	
m	Meter	
M	Molar	
min	Minute	
mol	Mol	
p	Irrtumswahrscheinlichkeit	
s	Sekunde	
u	Unit	$(\frac{\mu mol}{s})$
V	Volt	
k	Kilo	(10^3)
c	Centi	(10^{-2})
m	Milli	(10^{-3})
μ	Mikro	(10^{-6})
n	Nano	(10^{-9})
p	Piko	(10^{-12})

Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Veröffentlichungen

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation sind auch in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

- A. Lieberoth, F. Splittstoesser, N. Katagihallimath, B. Ranscht, D. Karagogeos, M. Schachner und R. Kleene. Lewis^x and α 2,3-sialyl glycans and their receptors TAG-1, Contactin and L1 mediate CD24-dependent neurite outgrowth. Eingereicht bei *J. Neurosci.*
- C. Bleckmann, H. Geyer, V. Reinhold, A. Lieberoth, M. Schachner, R. Kleene und R. Geyer. Glycomic analysis of N-linked carbohydrate epitopes from CD24 of mouse brain. *J. Proteome Res.*, Dez 2008.
- C. Bleckmann, H. Geyer, A. Lieberoth, F. Splittstoesser, Y. Liu, T. Feizi, M. Schachner, R. Kleene, V. Reinhold und R. Geyer. O-glycosylation pattern of CD24 from mouse brain. Eingereicht bei *J. Biol. Chem.*
- A. Lieberoth, F. Brendel, M. Schachner und R. Kleene. The cell adhesion molecules TAG-1/axonin and F3/contactin mediate CD24-dependent neurite outgrowth. *FENS Abstr.*, vol. 4, 148.1, 2008. Posterpräsentation beim 6. FENS *Forum of European Neuroscience* in Genf, Schweiz, vom 12. bis 16. Juli 2008.

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Melitta Schachner bedanke ich mich dafür, dass ich meine Doktorarbeit an ihrem Institut durchführen konnte. Vielen Dank auch für die Kooperationen, die für meine Projekte in die Wege geleitet wurden sowie für all die ergiebigen Diskussionen und guten Ratschläge. Herrn Prof. Dr. Konrad Wiese danke ich dafür, dass er sich als zweiter Gutachter für meine Dissertation zur Verfügung stellte. Dr. habil. Ralf Kleene danke ich herzlich für die Betreuung meiner Arbeit. Dankeschön auch für die vielen konstruktiven Ideen und Vorschläge sowie die hilfreichen Diskussionen. Dr. Gaby Loers danke ich für die Einführung in die Primärkultur, die Präparation der Motoneurone, das häufige Ausleihen von Präparationsbesteck, den α L1-Antikörper und dafür, dass sie mir mit vielen Ratschlägen oft weiterhelfen konnte. Bei Dr. Fabio Morellini bedanke ich mich für die große Hilfe bei allen Verhaltensversuchen, bei Mira Jakovcevski für die hilf- und lehrreiche Korrektur des Verhaltensversuchsteils meiner Dissertation. Ein besonderes Dankeschön hat Nainesh Katagihallimath verdient: für die Bereitstellung der Lewis^x-Peptide, des α Lewis^x-Antikörpers, des Protokolls für den Lewis^x-ELISA, für viele hilfreiche Diskussionen und die Korrektur der englischen Zusammenfassung. Dr. Jens Peter von Kries danke ich für die Ermöglichung des Screenings sowie für seine Geduld und die vielen hilfreichen Ideen. Auch Christoph Erdmann und Ulrike Tamm halfen mir beim Screening - Dankeschön. Vielen Dank auch Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann, André Horatscheck und Viviane Uryga-Polowy für die chemische Analyse der organischen Substanzen. Für die angenehme und erfolgreiche Kooperation danke ich Prof. Dr. Rudolf Geyer, Dr. Hildegard Geyer und Christina Bleckmann. Herzlichen Dank an Christina auch für den Einblick in chemische Analysemethoden, die Hilfe beim Versuch der CD24-Glykoformtrennung und das Protokoll für den CD24-ELISA. Achim Dahlmann danke ich für die Genotypisierung der CD24-Mäuse, Peggy Putthoff für die Taq-Polymerase, Michaela Schweizer für die Einführung in den Umgang mit dem konfokalen Mikroskop, Ulrike Wolters, Tanja Stößner, Ali Derin und Eva Kronberg für die Zucht und Haltung der Mäuse. Bei Prof. Dr. Domna Karagogeos bedanke ich mich für die Bereitstellung der TAG-1-defizienten Mäuse und des α TAG-1-Antikörpers, bei Prof. Dr. Barbara Ranscht für die F3-defizienten Mäuse und bei Prof. Dr. Zhi-Cheng Xiao für die Fc-Proteine. Dr. Frauke Splittstoßer danke ich ganz besonders für die gute Vorarbeit an unserem Projekt sowie die vielen Protokolle und alles, was ich von ihr übernehmen konnte. Anna Marquart-Horstmann und Ulrike Tamm erleichterten meinen Einstieg in die Doktorarbeit erheblich. Vielen vielen Dank für die herzliche Aufnahme im Labor, die große Hilfe, die guten Ratschläge und Diskussionen. Auch bei meiner Arbeitsgruppe und allen Kollegen im Institut, die mir bei Problemen weitergeholfen und mich unterstützt haben, bedanke ich mich - allen voran bei Elisa Ramser, Doreen Westphal, Babet Baraniec und Ute Eicke-Kohlmorgen. Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und das immerwährende Interesse an meiner Arbeit. Ihnen und Stephanie Justus außerdem herzlichen Dank für die sorgfältige Korrektur meiner Dissertation. Schließlich möchte ich meine tiefste Dankbarkeit gegenüber Winfried Justus zum Ausdruck bringen. Nur durch seine liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen, bei sämtlichen Problemen und Schwierigkeiten, sein großes Verständnis, seine Hilfe bei der Korrektur und Fertigstellung der Dissertation sowie die unermüdliche Motivation wurde diese Arbeit überhaupt möglich.