



Universität Hamburg
Department Biologie



Konstruktion der Zielvektoren zur Generierung von TN-N und CHST-12 Knockout-Mäusen

und

Analyse der CHST-14 Knockout-Maus (*Mus musculus*, Linné 1758)

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rerum naturalium

des Departments Biologie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sandra Nickel

Hamburg, Dezember 2008

Gutachter

Herr Prof. Dr. K. Wiese

Frau Prof. Dr. M. Schachner

Datum der Disputation: 27.02.2009

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1. Die extrazelluläre Matrix (ECM).....	2
1.1 Kohlenhydrat-Sulfotransferasen.....	3
1.2 Die HNK1-Sulfotransferase-Familie.....	4
1.3 Biologische Relevanz der Sulfatierung.....	11
1.4 Rolle der Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs) im Nervensystem.....	12
1.5 Warum schlägt neuronale Regeneration im ZNS fehl? Ereignisse an..... der Glianarbe.	14
1.6 Tenascine.....	17
2. Gene targeting und die Herstellung von Knockout (KO)-Mäusen.....	23
3. Zielsetzung der Arbeit.....	25
II. Material.....	26
1. Laborausrüstung.....	26
2. Geräte.....	26
3. Chemikalien.....	27
4. Oligonukleotide.....	27
5. Enzyme.....	27
6. Kits.....	28
7. Antikörper.....	29
8. Längenstandards.....	29
9. Vektoren und Plasmide.....	29
10. Verschiedenes.....	30
11. Bakterienstämme und Zelllinien.....	31
12. Phagenbibliotheken.....	32
13. Puffer und Lösungen.....	32

Inhaltsverzeichnis

14.	Bakterienmedien.....	34
15.	Phagenmedien.....	34
16.	Zellkulturmedien.....	35
17.	Mauslinien.....	36
18.	Software.....	36
III. METHODEN.....		37
1.	Molekularbiologische Methoden.....	37
1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (DH5 α ; TOP10).....	37
1.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien (pML104/DH10 β)	37
1.3	Erhaltung von Bakterienstämmen (Glycerol-Stock)	38
1.4	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	38
1.5	Elektroporation kompetenter Bakterien.....	38
1.6	Plasmidisolierung aus 1,5 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen.....	38
1.7	Plasmidisolierung aus 200 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen.....	39
1.8	Restriktionsverdau von DNA.....	39
1.9	Dephosphorylierung freier DNA-Enden.....	40
1.10	poly-Adenylierung von PCR-Produkten.....	40
1.11	Glätten überhängender DNA-Enden.....	40
1.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	41
1.13	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	41
1.14	Gelelektrophorese von DNA.....	41
1.15	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	42
1.16	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	42
1.17	DNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration.....	43
1.18	DNA-Sequenzanalyse.....	43
1.19	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
1.20	Verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion (<i>nested</i> PCR).....	44
1.21	Genotypisierung mittels PCR (multiplex PCR)	44
1.22	Southern-Blot-Analyse.....	45
1.23	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit [³² P]dCTP.....	46
1.24	RNA Isolierung aus Geweben.....	46
1.25	RNA-Aufreinigung.....	46
1.26	RNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration.....	47
1.27	Reverse Transkription.....	47
1.28	Semiquantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	48

Inhaltsverzeichnis

2.	Mikrobiologische Methoden	52
2.1	Amplifikation einer Phagenbibliothek.....	52
2.2	Austitrieren einer Phagenbibliothek.....	53
2.3	Screenen einer Phagenbibliothek.....	53
3.	Kultur Embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)	55
3.1	Gelatinieren der Zellkulturschalen.....	55
3.2	Kultur von mausembryonalen Fibroblasten (MEF) Zellen.....	55
3.3	Splitten der MEF-Zellen.....	55
3.4	Inaktivierung der MEF-Zellen durch Mitomycin C (MMC)	55
3.5	Bestimmen der Zellzahl.....	56
3.6	Auftauen der ES-Zellen.....	56
3.7	Kultur der ES-Zellen.....	56
3.8	Splitten der ES-Zellen.....	57
3.9	Elektroporation und Selektion von ES-Zellen.....	57
3.10	Einfrieren von ES-Zellen.....	58
4.	Histologische Methoden	58
4.1	Herstellung von Rückenmarks-Cryoschnitten.....	58
4.2	Kernfärbung mit <i>Cresyl Violet</i> (Nissel) und Myelinfärbung mit <i>Luxol Fast...</i> <i>Blue</i>	58
4.3	Immunfluoreszenzfärbungen von Cryoschnitten.....	59
5.	Tierversuche	59
5.1	Rückenmarksläsionen	60
5.1.1	Durchführung der Läsion.....	60
5.1.2	Injektion von Chondroitinase ABC in die Läsionsstelle.....	60
5.1.3	Analyse der motorischen Funktion.....	61
5.1.4	<i>Recovery Index</i> (RI)	63
5.2.	Verhaltensmethoden	64
5.2.1	Tiere und Tierhaltung.....	64
5.2.2	<i>Open field</i>	64
5.2.3	<i>Elevated plus maze</i>	65
5.2.4	Spontane Alternation im Y-Labyrinth.....	66
5.2.5	Neues Objekt.....	66
5.2.6	<i>Resident/Intruder Test</i>	67

Inhaltsverzeichnis

5.2.7	Urin-Markierung.....	68
5.2.8	<i>Fear conditioning and extinction</i>	68
5.2.9	<i>Vertical pole Test</i>	69
5.2.10	<i>Rotarod Test</i>	70
5.2.11	<i>Tail suspension</i>	70
5.2.12	<i>One trial spatial learning</i>	71
5.2.13	Analyse der Verhaltensparameter.....	72
IV. Ergebnisse.....		73
Projekt 1		
Konstruktion der Zielvektoren zur Generierung einer konstitutiven TN-N ko Maus und einer konditionalen CHST-12^{flox/flox} Maus		73
1.	Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer TN-N KO-Maus	75
1.1	Isolierung des TN-N-Genlokus aus einer λ -ko2 Phagenbibliothek.....	76
1.2	Manipulation des TN-N homologen Bereichs.....	77
1.3	Ersetzen der Exone 2-4 durch die Neomycin/Kanamycin-Kassette.....	81
1.4	Veränderung des TN-N-Lokus in mausembryonalen Stammzellen und..... Nachweis positiver Klone über Southern-Blot-Analyse	82
2.	Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer CHST-12.... KO-Maus	86
2.1	Integration einer 5'loxP-Erkennungssequenz.....	86
2.2	Integration einer loxP-neo/kan-loxP-Kassette	89
Projekt 2		
Analyse der CHST-14^{-/-} Maus		92
1.	Phänotypische Analyse der CHST-14^{-/-} Mutanten.....	92
2.	Untersuchungen zur Beteiligung der CHST-14 an der Regeneration... des ZNS	95
2.1	Funktionelle Regeneration nach Rückenmarksläsion.....	95
2.2	Morphologische Veränderungen des Rückenmarks nach Läsion.....	98
2.2.1	Bestimmung des Rückenmarkdurchmessers.....	98

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Veränderung der Anzahl der Mikroglia im Rückenmark nach Läsion.....	99
2.2.3	Regeneration des läsierten Rückenmarks gemessen an der..... monoaminergen Re-Innervierung	100
2.2.4	Veränderung der Regenerationsfähigkeit rückenmarksläsionierter..... CHST-14 ^{-/-} Mäuse nach Chondroitinase-Behandlung	101
2.3	Differentielle Expression der HNK-1-Sulfotransferase-Familienmitglieder.. an der Läsionsstelle	102
2.3.1	Differentielle Expression der Haushaltsgene nach Rückenmarksläsion.....	102
2.3.2	Differentielle Expression der CHST-14 nach Rückenmarksläsion.....	104
2.3.3	Differentielle Expression der HNK-1-Sulfotransferase-Familie im..... Rückenmark von CHST-14 ^{-/-} und CHST-14 ^{+/+} Mäusen	105
2.3.4	Differentielle Expression der HNK-1-Sulfotransferase-Familie nach..... Rückenmarksläsion	106
3.	Verhaltensanalyse der CHST-14^{-/-} Mäuse.....	109
3.1	Explorations- und Angstverhalten.....	109
3.1.1	<i>Open field</i>	109
3.1.2	<i>Elevated plus maze</i>	110
3.1.3	Neues Objekt.....	112
3.2	Motorkoordination.....	113
3.2.1	<i>Pole Test</i>	113
3.2.2	<i>Rotarod Test</i>	114
3.3	Sozialverhalten.....	115
3.3.1	<i>Resident-Intruder Test</i>	115
3.3.1	Urin-Markierung.....	115
3.4	Lernen und Gedächtnis.....	116
3.4.1	Spontane Alternation im Y-Labyrinth.....	116
3.4.2	<i>One trial spatial learning</i>	117
3.4.3	<i>Fear conditioning and extinction</i>	119
3.5	Stress.....	121
3.5.1	<i>Tail suspension Test</i>	121
V.	Diskussion.....	122
	Projekt 1	
	Konstruktion der Zielvektoren zur Generierung einer konstitutiven..... TN-N KO-Maus und einer konditionalen CHST-12^{flox/flox} Maus	122

Inhaltsverzeichnis

1.	Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer TN-N KO-Maus.....	122	
2.	Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer CHST-12 KO- Maus....	124	
Projekt 2			
Analyse der CHST-14-/- Maus.....			125
1.	Phänotypische Analyse der CHST-14 ^{-/-} Mutanten.....	125	
2.	Untersuchungen zur Beteiligung der CHST-14 an der Regeneration..... des ZNS	126	
3.	Verhaltensanalyse der CHST-14 ^{-/-} Mäuse.....	131	
VI. Zusammenfassung.....			138
VII. Literaturverzeichnis.....			140
VIII. Anhang.....			159
Abkürzungen.....			159
Oligonukleotide.....			162
Danksagung.....			165

I. Einleitung

Die Funktion des Nervensystems basiert auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedenster Moleküle und Mechanismen. Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen spielen hierbei eine essenzielle Rolle und werden durch spezielle Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAMs) und Komponenten der extrazellulären Matrix (extracellular matrix, ECM) vermittelt (Fields und Itoh, 1996; Walsh und Doherty 1996; Schachner 1997; Benson et al., 2000). Diese CAMs und ECM Moleküle regulieren zelluläre Migrationsprozesse, sowie Wachstum und Richtungsweisung von Axonen und spielen auch bei Regenerationsprozessen im adulten Nervensystem eine wichtige Rolle (Schachner 1994; Walsh und Doherty 1996). Besonderes Interesse gilt hier den Chondroitinsulfat-Proteoglykanen, die die Regeneration im zentralen Nervensystem (ZNS) nach Läsionen supprimieren (Fawcett et al., 1989; McKeon et al., 1991, 1995; Friedlander et al., 1994). Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Sulfotransferasen, die für die Sulfatierung dieser Chondroitin- und Dermatansulfat-Glykosaminoglykane verantwortlich sind, sowie den Auswirkungen fehlender Sulfatierung *in vivo*.

Tenascine (TN) sind eine weitere, wichtige Proteinfamilie der ECM. Bisher sind sechs Mitglieder bekannt, namentlich Tenascin-C (TN-C), Tenascin-R (TN-R), Tenascin-W (TN-W), Tenascin-X (TN-X), Tenascin-Y (TN-Y) und das erst 2003 beschriebene Tenascin-W Maus-homologe Tenascin-N (TN-N). Im Gegensatz zu den meisten Proteinen der ECM vermitteln die Tenascine eher schwache Zelladhäsion.

Die Konstruktion von Knockout-Mausmodellen ist ein gängiges Mittel, um Funktion und Einfluss eines Proteins *in vivo* zu untersuchen. Die Rolle von TN-C, TN-R und TN-X bei der Entwicklung und der Funktion des Nervensystems wurde bereits mit Hilfe von Knockout-Mausmodellen ausführlich beschrieben. Um auch TN-N genauer charakterisieren zu können, beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Herstellung einer TN-N Knockout-Maus.

1. Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Molekülen, das den Raum zwischen Zellen ausfüllt. Die wichtigsten Bestandteile sind Glykosaminoglykane, die entweder an Proteine gebunden als Proteoglykane vorliegen oder ungebunden, wie z.B. Hyaluronan. Des Weiteren enthält sie fibrilläre Proteine, wie z.B. Kollagene und Elastine, adhäsive Glykoproteine, wie z.B. Laminin, Fibronectin und Tenascine, außerdem verschiedene Wachstumsfaktoren. Sie verleiht Geweben Stabilität und Form, dient aber auch als eine Art Informationseinheit, die extrazelluläre Signale mittels spezifischer Zelloberflächenrezeptoren weiterleitet und verarbeitet. Diese Interaktion zwischen ECM-Molekülen untereinander und mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren führt zu einem fein abgestimmten Zusammenspiel, das verschiedene Zellfunktionen wie Proliferation, Migration und Differenzierung koordiniert. Im Nervensystem reguliert die ECM außerdem die Wegfindung der Axone, die Bildung neuer Synapsen sowie die synaptische Plastizität. Die ECM des ZNS ist im Vergleich zur ECM anderer Organe einzigartig, da sie nur wenig fibrilläre Proteine, dafür aber große Mengen an Glykosaminoglykanen enthält.

Eine besonders spezialisierte Form der ECM des ZNS sind die perineuronalen Netze (PNN), die man in vielen Regionen des zentralen Nervensystems findet, z.B. im Cortex, Hippokampus, Thalamus, Cerebellum, im Hirnstamm und im Rückenmark. Die Hauptkomponenten der PNNs sind Chondroitinsulfat-Proteoglykane, wie die Mitglieder der Lectican-Familie (Brevican, Neurocan, Aggrecan, Versican), Phosphacan und NG2, Linker-Proteine, Hyaluronan und TN-R. Die Rolle, die die einzelnen Bestandteile in der Aufrechterhaltung der PNNs spielen, wird durch die Betrachtung von Knockout-Mutanten deutlich. $Brevican^{-/-}$ und $Neurocan^{-/-}$ Mäuse zeigen keine anatomischen oder morphologischen Veränderungen, weshalb diese Proteoglykane für die Aufrechterhaltung der PNNs nicht essentiell zu sein scheinen (Brakebusch et al., 2002; Zhou et al., 2001). Bei $TN-R^{-/-}$ Mäuse waren Immunfärbungen für Brevican, Neurocan und Hyaluronan in den PNNs reduziert und die Struktur der PNNs gestört (Brückner et al., 2000). TN-R scheint demnach eine wichtige Komponente der PNNs zu sein. Eine bedeutende Rolle scheint auch Hyaluronan zu haben, denn es konnte gezeigt werden, dass der enzymatische Verdau von Hyaluronan zu einem kompletten Verlust der PNNs führt (Köppe et al., 1997).

PNNs entstehen verhältnismäßig spät in der postnatalen Entwicklung (in Nagern 2-5 Wochen nach der Geburt), etwa zeitgleich mit der Stabilisierung synaptischer Verknüpfungen und dem Ende der kritischen Phase (Kalb et al., 1988; Hockfield et al., 1990; Brückner et al., 2000; Dityatev & Schachner, 2003). Es wird angenommen, dass PNNs an der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur (Margolis et al., 1993) und der Stabilisierung der Synapsen (Kalb et al., 1988) beteiligt sind, indem sie ungewollte Plastizität verhindern

I. Einleitung

(Corvetti und Rossi 2005). Außerdem gibt es Hinweise, dass diese spezialisierte Form der ECM bei der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts um die Neuronen eine Rolle spielt (Brückner et al., 1993, 1996; Härtig 1999).

1.1 Kohlenhydrat-Sulfotransferasen

Man unterscheidet bei den Kohlenhydrat-Sulfotransferasen drei Familien: die Heparin/Heparan-Sulfotransferasen, die Keratan-Sulfotransferasen, sowie die HNK-1-Sulfotransferasen.

Die meisten Kohlenhydrat-Sulfotransferasen sind Transmembran-Proteine vom Typ II, d.h. sie besitzen eine kurze, N-terminale cytoplasmatische Domäne, die wahrscheinlich bei der Lokalisation des Polypeptids im Golgi-Lumen und bei der Substratspezifität eine Rolle spielt. Die cytoplasmatische Domäne ist gefolgt von einer einzelnen transmembranen Domäne und einer großen C-terminalen luminalen Domäne, die die katalytische Aktivität birgt. Sie sind in Golgi-Vesikeln lokalisiert, wo sie Glykosaminoglykane und Glykolipide sulfatieren.

Wie bereits von den cytosolischen Sulfotransferasen bekannt, dient auch den Kohlenhydrat-Sulfotransferasen PAPS (3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat) als Sulfat-Donor. Obwohl die cytosolischen Sulfotransferasen und die Kohlenhydrat-Sulfotransferasen wenig Sequenzähnlichkeiten besitzen, gibt es zwei Motive, die bei beiden Gruppen hoch konserviert sind. Das 5'-PSB Motiv und das 3'-PB Motiv sind für die Bindung der 5'-Phosphosulfat-Gruppe, bzw. der 3'-Phosphatgruppe von PAPS verantwortlich (Kakuta et al., 1998). Die Sulfotransferasen übertragen das 5'Sulfat von PAPS auf eine Hydroxylgruppe eines Kohlenhydrat-Anteils in einem Glykoprotein oder Glykolipid, wobei der genaue Mechanismus des Transfers noch nicht bekannt ist.

PAPS selbst wird durch eine spezielle PAPS-Synthetase, die sowohl ATP-Sulfurylase- als auch APS-Kinase-Aktivität besitzt, aus ATP und anorganischem Sulfat synthetisiert (Schwartz et al., 1998). Durch die PAPS/PAP-Translokase, einem transmembranen Antiport Shuttle, wird PAPS im Austausch mit luminalem PAP durch die Golgimembran in das Golgi Lumen transportiert, wo es dann unter anderem den Kohlenhydrat-Sulfotransferasen als Sulfat-Donor dient.

I. Einleitung

1.2 Die HNK-1-Sulfotransferase-Familie

Bislang sind sieben Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie identifiziert. Die HNK-1-Sulfotransferase (HNK-1 ST), die auch der Namensgeber dieser Familie ist, wurde als erstes Mitglied beschrieben (Bakker et al., 1997; Ong et al., 1998). Sie sulfatiert die Hydroxylgruppe des dritten Kohlenstoffatoms (C3) in endständiger Glukuronsäure (GlcA) in der Sequenz GlcA- β 1,3-Gal- β 1,4-GlcNAc-R. Das so gebildete HNK-1-Kohlenhydrat-Epitop ist kennzeichnend für viele CAMs und ECM-Moleküle.

ST	Expressionsprofil in der Maus	sulfatierter Zucker	Epitop	Proteine
HNK-1 ST	gesamtes Gehirn, Thymus, Testis	C3 OH in endständiger GlcA	GlcA - β 1,3-Gal- β 1,4-GlcNAc-R (HNK-1)	NCAM, MAG, L1, Contactin, P0
CHST-8	gesamtes Gehirn, besonders Hypophyse und Cerebellum, Rückenmark, Uterus	C4 OH in endständiger GalNAc	GalNAc - β 1,4-GlcNAc- β 1,2-Man α -R	Lutropin, Thyrotropin, Proopiomelanocortin, Carbonic AnhydraseVI, Tamm-Horsfall-Glycoprotein, Urokinase, TN-R
CHST-9	gesamtes Gehirn, Milz, Rückenmark, Testis, Speicheldrüse, Thymus	C4 OH in endständiger GalNAc	GalNAc - β 1,4-GlcNAc- β 1,2-Man α -R	
CHST-11	ubiquitär exprimiert, mit Expressionsmaxima in Gehirn, Rückenmark, Uterus und Niere	C4 OH in interner GalNAc	(GlcA- β 1,3- GalNAc - β 1,4) _n (Chondroitin)	TN-R, Appican, Phosphacan/-Receptor-type Protein Phosphatase ζ/β (RPTP), Aggrecan, Versican, Brevican, Neurocan
CHST-12	ubiquitär exprimiert, mit Expressionsmaxima in Gehirn, Rückenmark und Lunge	C4 OH in interner GalNAc	(GlcA- β 1,3- GalNAc - β 1,4) _n (Chondroitin)	
CHST-13	ubiquitär exprimiert mit höherer Expression in Leber, Testis und Speicheldrüse	C4 OH in interner GalNAc	(GlcA- β 1,3- GalNAc - β 1,4) _n (Chondroitin)	
CHST-14	ubiquitär exprimiert mit Expressionsmaxima in Bauchspeicheldrüse, Thymus, Lunge und Testis	C4 OH in interner GalNAc	(IdoA- β 1,3- GalNAc - β 1,4) _n (Dermatan)	DSD-1, Biglycan, Decorin

Tab. 1.1: Übersicht der Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie in der Maus. Dargestellt ist das Expressionsprofil der einzelnen Sulfotransferasen in der Maus sowie ihre jeweilige Substratspezifität, wobei der sulfatierte Zuckerrest im Epitop fett hervorgehoben ist. (C3 OH, Hydroxylgruppe des dritten Kohlenstoffatoms; C4 OH, Hydroxylgruppe des vierten Kohlenstoffatoms, GlcA, Glukuronsäure; GalNAc, N-Acetylgalaktosamin; Man α , α -Mannose; IdoA, Iduronsäure).

I. Einleitung

Die restlichen Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie wurden anhand von Sequenzhomologien zur HNK-1-Sulfotransferase entdeckt. Sie transferieren die Sulfatgruppe jedoch nicht wie die HNK-1-Sulfotransferase auf GlcA, sondern auf die Hydroxylgruppe des vierten Kohlenstoffatoms (C4) in N-Acetylgalaktosamin (GalNAc). Hierbei wird noch einmal unterschieden, ob das Sulfat auf ein endständiges GalNAc übertragen wird, wie bei CHST-8 und CHST-9 oder auf internes GalNAc, wie bei CHST-11, CHST-12, CHST-13 und CHST-14. Eine Zusammenfassung der Spezifität der einzelnen Sulfotransferasen in der Maus ist in Tab. 1.1 dargestellt. Die verschiedenen Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie werden im Folgenden genauer vorgestellt.

HNK-1 ST

Zelladhäsionsmoleküle spielen nicht nur in Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle, sondern auch bei Regenerationsprozessen im ZNS und bei der Regulierung der synaptischen Effizienz. Viele dieser Moleküle tragen das HNK-1-Epitop, das erstmals mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen natürliche Killerzellen des Menschen (*human natural killer cells*, HNK) entdeckt wurde (Abo und Balch, 1981). Das HNK-1-Epitop interagiert mit unterschiedlichen Proteinen, wie zum Beispiel mit den ECM-Molekülen Laminin 1 und Laminin 2 (Hall et al., 1995, 1997), sowie mit P- und L-Selectinen (Schnaar et al., 1994) und Aggrecan (Yamaguchi, 2000). Im Nervensystem ist es an Neuron-Glia, Neuron-Neuron und Glia-Glia Adhäsion ebenso beteiligt wie am Neuritenwachstum (Keilhauer et al., 1985; Künemund et al., 1988). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das HNK-1-Epitop auf NCAM und L1 die homophile Bindung dieser Moleküle beeinträchtigt, weshalb vermutet wird, dass es synaptische Plastizität fördert (Demetriou et al., 2001).

Das HNK-1-Sulfotransferase-Gen der Maus liegt auf Chromosom 1 und besteht aus sieben Exonen, wobei Exon 1 nicht kodierend ist. Die mRNA besteht aus 3135 bp und wird in ein Protein aus 374 Aminosäuren translatiert.

In 2002 wurde die HNK-1-ST^{-/-} Maus veröffentlicht (Senn et al., 2002). Obwohl das HNK-1-Epitop in Wildtypmäusen in vielen neuronalen und nicht-neuronalen Organen nachzuweisen ist, führt das Fehlen des Epitops in der HNK-1-ST^{-/-} Maus zu einem überraschend milden Phänotyp. Die HNK-1-ST^{-/-} Maus ist fertil und weist im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern keine Unterschiede in Bezug auf Entwicklung, Körpergröße und Lebensdauer auf. Auch anatomische und histologische Untersuchungen des Gehirns, Rückenmarks, der Retina und des Femoralisnervs waren im Vergleich zum Wildtyp unauffällig, ebenso nicht-neuronale Organe wie Thymus, Niere, Lunge, Lymphknoten, Leber, Milz, Pankreas, Darm, Eierstöcke, Uterus und Skelettmuskeln. Allerdings zeigten die HNK-1-ST^{-/-} Tiere im Vergleich

I. Einleitung

zu wildtypischen Geschwistern eine erhöhte basale exzitatorische synaptische Aktivität und reduzierte Langzeit-Potenzierung (*long-term-potentiation*, LTP) der Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippokampus. *Morris water maze* Tests zeigten, dass die HNK-1-ST^{-/-} Tiere ein schlechteres Langzeitgedächtnis besitzen und auch im räumlichen Lernen deutlich schlechter abschnitten als ihre wildtypischen Geschwister.

Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung und die Notwendigkeit der Sulfatierung des HNK-1-Epitops für die synaptische Plastizität des Hippokampus.

CHST-8 und CHST-9

Sowohl CHST-8 als auch CHST-9 sulfatieren das terminale GalNAc N-verknüpfter Oligosaccharide, wie zum Beispiel bei den Glykoproteinen Lutropin (LH), Thyrotropin (TSH), Tamm-Horsfall Protein oder TN-R (Green et al., 1985; Baenziger, 1988; van Rooijen et al., 1998; Woodworth et al., 2002). Obwohl diese beiden Sulfotransferasen ähnliche Substratspezifität zeigen und sich die humanen Formen in ihrer Aminosäure-Sequenz zu 46% gleichen (vgl. Abb. 1.3), unterscheiden sie sich doch in ihrem Expressionsmuster. Für CHST-9 konnte in der Maus starke Expression im Gehirn, im Rückenmark in der Speicheldrüse, sowie in Milz und Niere nachgewiesen werden. CHST-8 ist in der Maus in verschiedenen Gehirnregionen, besonders in der Hypophyse und im Cerebellum exprimiert. Außerdem ist es im Rückenmark und im Uterus und mit geringerer Expression auch in Thymus und Niere nachweisbar (Hoffmann, 2007).

Wie schon zuvor erwähnt, sind die meisten Kohlenhydrat-Sulfotransferasen Typ II Transmembran-Proteine mit einer einzelnen transmembranen Domäne. Dies gilt auch für CHST-8 und CHST-9, jedoch wurden für diese beiden Enzyme potenzielle alternative Spleiß-Varianten beschrieben, denen die transmembrane Domäne und ein Teil der Stammregion fehlt (Xia et al., 2000; Kang et al., 2002). Nach Expression dieser Spleiß-Varianten in CHO-Zellen konnten ausschließlich in das Medium sekretierte, lösliche Formen dieser Sulfotransferasen, namentlich CHST-8(Met-119) und CHST-9(Met-86), nachgewiesen werden. Interessanterweise sind diese löslichen Sulfotransferasen, im Gegensatz zu den membrangebundenen Formen, in der Lage, auch nicht terminale GalNAc-Reste in Chondroitin und Dermatan zu sulfatieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Substratspezifität der membranständigen CHST-8 und CHST-9 durch Sequenzen N-terminal der katalytischen Domäne beeinflusst wird.

Der genomische Lokus der CHST-8 liegt auf Chromosom 7 und besteht aus vier Exonen, von denen jedoch nur drei Exone kodierend sind. Das 2105 bp große Transkript kodiert für ein 417 Aminosäuren großes Protein. CHST-9 wird auf Chromosom 18 von vier Exonen

I. Einleitung

kodiert. Die mRNA besteht aus 1369 bp und wird in ein Protein aus 413 Aminosäuren translatiert.

Anfang 2008 wurde von Mi et al. die CHST-8^{-/-} Maus veröffentlicht. Männliche CHST-8^{-/-} Mäuse weisen, im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern, erhöhte LH- und Testosteron-Level auf, besitzen größere Samenblasen und sind früher geschlechtsreif. Weibliche CHST-8^{-/-} Mäuse zeigen ebenfalls erhöhte LH-Level und auch Östrogen- und Progesteron-Level sind im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Sie werden früher geschlechtsreif, haben vergrößerte Uteri und produzieren durchschnittlich 50% mehr Nachkommen, als ihre wildtypischen Geschwister (Mi et al., 2008). Der Phänotyp dieser Mäuse wird dadurch erklärt, dass durch die fehlende Sulfatierung des N-ständigen GalNAc auf LH die Erkennung durch den Man/GalNAc-4-SO₄-Rezeptor der Endothelzellen der Leber gestört ist. Dadurch ist die Beseitigung des Glykohormons aus dem Blut nicht ausreichend gewährleistet und es kommt in Folge dessen zu einer erhöhten Produktion von Östrogen und Progesteron, bzw. Testosteron (vgl. 1.3).

In unserem Labor wurde die CHST-8^{-/-} unabhängig von Mi et al. ebenfalls hergestellt. Die Tiere zeigen bis sechs Wochen nach der Geburt keine Auffälligkeiten, nach 12 Wochen konnte man jedoch eine Gewichtszunahme der CHST-8^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern feststellen: Männchen waren durchschnittlich 7,3%, Weibchen durchschnittlich 12,2% schwerer als die wildtypischen Geschwister. Erste histologische Untersuchungen des Hippokampus zeigten eine erhöhte Anzahl an Pyramidenzellen in der CA1-Region, sowie eine verringerte Anzahl der Parvalbumin positiven Interneuronen in der CA3-Region. Im Gyrus Dentatus konnten im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern keine Veränderungen festgestellt werden (Akyüz und Schachner, unveröffentlichte Daten).

Die CHST-9^{-/-} Maus wurde noch nicht beschrieben.

CHST-11, CHST-12 und CHST13

Diese drei Chondroitin-Sulfotransferasen transferieren Sulfat an die Hydroxylgruppe des vierten Kohlenstoffatoms in N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) am nicht reduzierenden Ende von Chondroitin.

Es sind mehrere Chondroitinsulfat-Typen bekannt, die mit Chondroitinsulfat A-E und H bezeichnet werden und sich in ihrem Sulfatierungsmuster sowie in der Zusammensetzung ihrer Zuckerbausteine aus GlcA-β1,3-GalNAc-β1,4 oder IdoA-β1,3-GalNAc-β1,4 unterscheiden. Iduuronsäure (IdoA) ist das C5-Epimer der Glukuronsäure (GlcA) und Baustein

I. Einleitung

von Dermatan. Eine Zusammenstellung der einzelnen Chondroitinsulfat-Typen, ihrer Zusammensetzung und ihrem Sulfatierungsprofil ist in Abb. 1.1 dargestellt.

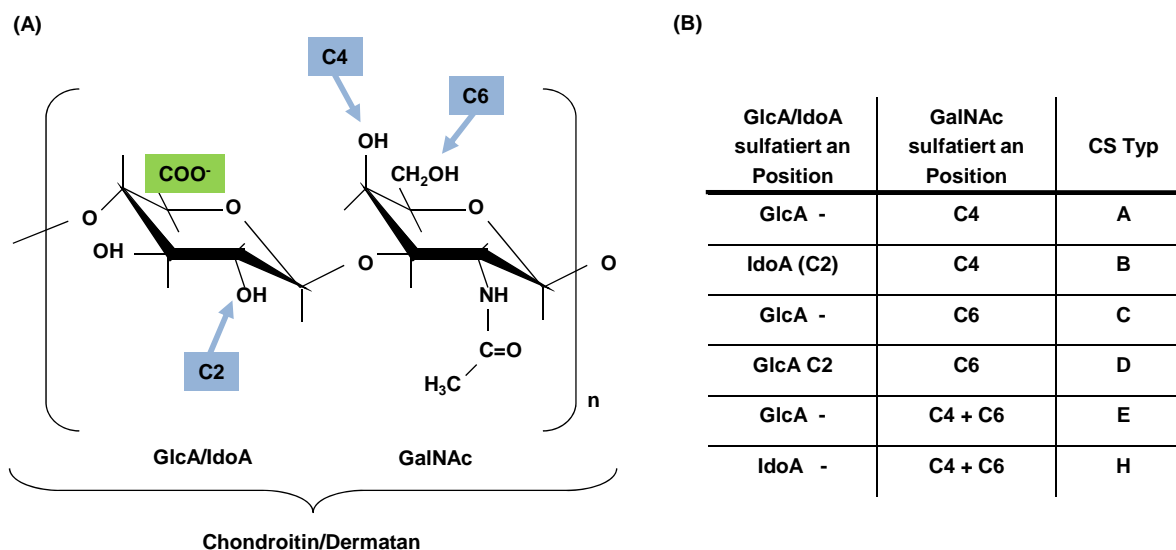


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Chondroitin- bzw. Dermatan-Disaccharids (A) sowie eine Übersicht über die verschiedenen Chondroitinsulfat-Typen (B). A: Chondroitin ist aus sich wiederholenden, β 1,3-verknüpften Glucuronsäure (GlcA) und N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) Einheiten aufgebaut. In Dermatan wird GlcA durch die C5-Glucuronyl-Epimerase in Iduonsäure (IdoA) epimerisiert. Das epimerisierte Kohlenstoffatom (C5) in GlcA ist grün, die sulfatierten Hydroxylgruppen sind blau hinterlegt. B: Zusammenstellung der unterschiedlichen Chondroitinsulfat-Typen. (GalNAc, N-Acetylgalaktosamin; GlcA, Glucuronsäure; IdoA, Iduonsäure; C6, sechstes Kohlenstoffatom; C2, zweites Kohlenstoffatom; C4 viertes Kohlenstoffatom).

Für humane CHST-11 und CHST-12 konnte gezeigt werden, dass sie sich in ihrer Aminosäure-Sequenz nur zu 41,8% gleichen (vgl. Abb. 1.3), sie aber gemeinsame Substratspezifität besitzen (Hiraoka et al., 2000). Neben Chondroitin ((GlcA- β 1,3-GalNAc- β 1,4)_n) können beide Sulfotransferasen auch desulfatiertes Dermatan ((IdoA- β 1,3-GalNAc- β 1,4)_n) sulfatieren. Während die Präferenz der CHST-11 deutlich bei Chondroitin liegt, sulfatiert CHST-12 Chondroitin und Dermatan gleichermaßen, jedoch mit geringerer Affinität (vgl. Abb. 1.2). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl CHST-11 als auch CHST-12 den Transfer des Sulfatrestes deutlich effizienter auf unsulfatiertes Chondroitin oder Dermatan katalysieren, als auf Chondroitin Typ A, C oder Dermatan.

Humane CHST-13 zeigt die größte Ähnlichkeit in der Aminosäure-Sequenz mit humaner CHST-11 (45%) (vgl. Abb. 1.3) und sulfatiert ausschließlich Chondroitin (Kang et al., 2002). Eine Besonderheit dieses Enzyms ist seine Instabilität bei 37°C, die auf eine besondere biologische Rolle dieses Enzyms *in vivo* schließen lässt.

I. Einleitung

Das Expressionsmuster der Sulfotransferasen CHST-11, CHST-12 und CHST-13 in der Maus ähnelt sich dahingehend, als dass sie alle ubiquitär exprimiert werden. CHST-11 zeigt Expressionsmaxima in Gehirn, Rückenmark, Uterus und Niere, CHST-12 in Gehirn, Rückenmark und Lunge und CHST-13 in Leber, Speicheldrüse und Testis. Jedoch lagen die gemessenen mRNA-Werte für die CHST-12, im Vergleich zu CHST-11, um eine Zehnerpotenz höher und die CHST-13 mRNA Werte lagen an der Nachweisgrenze (Hoffmann, 2007).

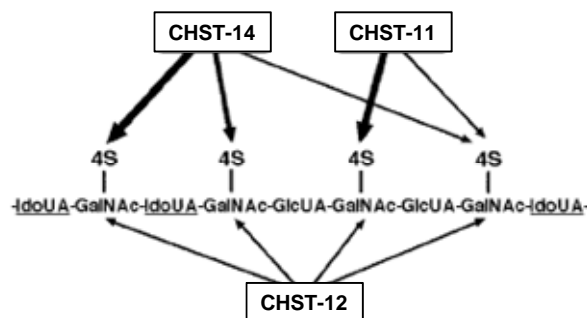


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Substratspezifität von CHST-14, CHST-11 und CHST-12 im Chondroitinsulfat-, bzw. Dermatan-sulfat-Polysaccharid. Die Pfeile zeigen die potenziellen Sulfatierungspositionen der einzelnen Sulfotransferasen in einem schematischen Disaccharid aus sich wiederholenden Chondroitinsulfat- und Dermatan-sulfat-Einheiten. Die Dicke des Pfeils repräsentiert die Präferenz der Enzyme für -IdoUA-GalNAc-IdoUA-, -IdoUA-GalNAc-GlcUA- und -GlcUA-GalNAc-IdoUA-. (IdoUA: Iduronsäure; GalNAc: N-Acetylgalaktosamin; GlcUA: Glukuronsäure; verändert nach Mikami et al., 2003).

Das CHST-11-Gen umfasst drei Exone auf Chromosom 10, die für eine 5532 bp mRNA, bzw. ein Protein aus 352 Aminosäuren kodieren. Der genomische Locus der CHST-12 besteht aus zwei Exonen auf Chromosom 5, wobei nur Exon 2 kodierend ist. Die 1802Bp mRNA wird in ein Protein aus 419 Aminosäuren umgeschrieben. Das CHST-13-Gen auf Chromosom 6 kodiert für ein 336 Aminosäuren großes Protein und besteht aus drei Exonen.

2005 wurde die CHST-11^{-/-} Maus generiert (Klüppel et al., 2005). Sie ist perinatal letal und zeigt neben Zwergwuchs schwere Chondrodysplasie, die durch eine gestörte Organisation der Knorpelwachstumszone verursacht wird. Viele Skelettstrukturen werden durch endochondrale Ossifikation gebildet, d.h., Knorpelgewebe wird nach und nach durch Knochen ersetzt. Chondrozyten durchlaufen während der Knorpelmorphogenese an der Wachstumszone ein streng reguliertes Proliferations- und Differenzierungsprogramm, in dem drei Signalwege eine besondere Rolle spielen: *Indian hedgehog* (Ihh), *transforming growth factor β* (TGFβ), sowie *bone morphogenetic protein* (BMP)-abhängige Signalwege. Klüppel und Kollegen konnten zeigen, dass reduzierte Aktivität der BMP- bei gleichzeitig erhöhter Aktivität der TGFβ-Signalwege, zu anormaler Differenzierung und Orientierung der

I. Einleitung

Chondrozyten in der Knorpelwachstumszone führt. Dies hat die schwerwiegenden Störungen in der Morphogenese der Knorpelwachstumszone und den Zwergwuchs der CHST-11^{-/-} Mäuse zur Folge.

Für CHST-12 und CHST-13 existieren noch keine Knockout-Mäuse.

CHST-13	1	-----MGRRCRRRVLAACLGAALLLCAAPRSIRPAFGNRA-----	38
HNK-1	1	-----MHHQWLLAACFVVIFFMVASKFTITLTKDPDVYSAKQEFFLT-----	45
CHST-11	1	-----MKPALLEVMRMNRICRMVLATCLGSEFLVIFYQSMLEHPVRRNP-----	45
CHST-12	1	-----MTRARLFRLWVVGSVEMILLIIVYWSAGAAHEFYLHTSESRPHTGPP-----	48
CHST-8	1	-----MTLRPGTMRACMFSSILLFGAAGLLLFISLQDPTLAPQQVPGIKFNIRPQPHHDLPPGGSQDGLKEPTERVTRDLSSG	80
CHST-9	1	-----MQPSEMVMNPKQVFLSVLIFGVAGLLLFMYLQ--VWIEQHTGRVEKRRKQKVTSGWGPVKYLRVPRIMSTEKIOEHITNQ	82
CHST-14	1	MFPRLPLTAAAPNGAEPLGRALRRAPLGRARAGLGGPPELLPSMLMFAVIVASSG-----	55
CHST-13	38	-----LGSSWLGE-----KRSP-----LQKLYDLDQDPRSTLAKVHRQ-----	72
HNK-1	45	-----TMPEVRKLPPEE-----KHIP-----EELKPTGKELPDSQLVQPLVY-----	81
CHST-11	45	-----FGVDICCRKG-----SRSP-----LQELYNPIQLELNTAVLHQM-----	80
CHST-12	48	-----LPTPGPDRDREL-----TADSD-----VDEFLDKFLSAGVKQSDLPKTEQPPAPGSMEEESVRYGDW	106
CHST-8	83	APRGRNLPAPDQPPP-----LQRTLRRLRQRRRR-----LLIKKMPAAATIPANSSDAPP-----IRPGFG	140
CHST-9	81	NPK-FHMPEDVREKKENLLNSERSTRLLTKTSHSQGGDQALSSTGSPTEKLEIKXQGAKTVFNKFSNMXWVPV-----DIHPLNK	160
CHST-14	55	-----LLLMIERGILAEKFP-----LPLHPP-----GREGTAWRGKAPKPGGLSLRAG-----	98
CHST-13	72	-----RRDLLNSAC-----SRHSRRORLLQPED-----LRHVIVDAEGLLYCVVPKVAENWKRVDLALSC-----	129
HNK-1	81	-----MELELIRNVCR-----DDALKNLSHTPVSKFV-----LDRIFVCEKKEKLEFCOTPKVGNTOWKVLLVING-----	143
CHST-11	80	-----RRDQVDTQR-----ANSATSRKRKRVLTPNDE-----LKHLLVDEDEELLYCVVPKVAENWKRVDLAVLTC-----	140
CHST-12	107	SPRDARRSPDQGRQAERRSVLRGFCANSSLAFFTKERAFDDIPNSE-----LSHLIVDDREGALYCVVPKVAENWKRVDLAVLTC-----	192
CHST-8	141	TL--DGRWVSLHRSQQERKRVMQEACAK-----YRASSSRRAVTPRH-----VSRIFVDEDRRVLYCVVPKVAENWKRVDLAVLTC-----	214
CHST-9	161	SLVKDNKWKTEETQEKRRSFLQEFCKK-----YGGVSHHQSHLFHT-----VSRIYVDEDEKLYCVVPKVAENWKRVDLAVLTC-----	236
CHST-14	98	-----DADLQVRQDVNRTLRVAGCGQ-----EGMPRPDWDLPVQQRRTLIRHILVSDRYRFLYCVVPKVAENWKRVDLAVLTC-----	171
		5'-PSB	
CHST-13	130	QAR-GDRRAISAQEAAP--GRIPSTADLS-----PAEINRRLRAYLAFLEVRPFFERLASAYENKLRAPY--SAAFORRYCARIVOR	207
HNK-1	143	--AFSSIEEIPENVVVDHEKNGIPRLSSS-----DAPLQKRLKTYKFLVVRPFFERLASAKKFKFVHNPRFEPWYRHEIAPGIIRK	224
CHST-11	141	RGKYSDEMEIPANEAVS--ANKTINQOYS-----IPEINHLKSYKFLVVRPFFERLASAYENKLRAPY--NIFSHKRYEIKIIRK	219
CHST-12	193	GAPYRDLRIIPREHVENA--SAHLTENKSWRRYKLSRHLMKVKKYKFLVVRPFFERLASAYENKLRAPY--NEEFYRKEAVPMLRL	277
CHST-8	214	--LASSTADIQHTVVEYG--SAIKRFDIISD-----RQCLHLRLSTYKFLVVRPFFERLASAYENKLRAPY--NSYHPVFEKAILAR	290
CHST-9	236	--LASSAYNISHNAVEYG--KHLKRLDSD-----LKGITRIANTYKRAVLEVRPFFERLASAYENKLRAPY--NSYHPVFEKAILAR	312
CHST-14	171	--VLDSVDVRLKMDERS--DVFVADLR-----PEEIRYRLQHYKFLVVRPFFERLASAYENKLRAPY--EYQORYCAEIVRR	244
		3'-PB	
CHST-13	208	IF-----PRRLPDRARACHDVRBAELAYLIPRTRREEP---FNEHNERAHLCHPCRIYRFLVVGKRETTLAEDMAEVLGLAGA-SLIS	287
HNK-1	225	YR-----RNRTEITRGICRETSVRYLCPNHRWLDLQFGDHIHHWYTYVELQPCGELMYSVICHHELEDDAPYIKHEAGIDHLVS	304
CHST-11	220	CR-----KNTQBELRRGLDVKREBEFVAYLIDPHTQREEP---FNEHWOTVYSLCHPCHHYDVLGKMETLEESNYFLQLAGVGSYLK	300
CHST-12	278	YANHTSLPASAREAFRAGLKVSBANFIQYLLDPHTKELAP---FNEHNRQVYRLLCHPCCHDYDEVGKRETTLEDDAQQLQLLQVDRGLR	363
CHST-8	291	YR-----ANASREALRTGSCVRFEEVQYLLVHRPVG---MDIHNDHYSRLCSPCLIDYDEVGKRETTLEDDANFEELIIRAPRNLIT	369
CHST-9	313	YR-----PNACEBALINGSVREKBEIHYLLCSHRPVG---MDIHWEKWSKLCYPCCLINDYDEVGKRETTLEDDANFEELIIRAPRNLIT	391
CHST-14	245	YR-----AGAGSPAGDIVTEPEELPYLVEDPER---MNEHMPFYHLLCPCAVHYDEVGKRETTLEDDANQVLEWVRAPPHVR	320
		III	IV
CHST-13	288	EEGPPR--PRGAAASRDLAARLRDISPFYQRRLEFDLTKMDELLFNMSAESYLRLI---	341
HNK-1	305	YETIP--PGITVYNRKVEHYELGISKRDIRRIWARFEGDFKLEGYQKEDFLN---	356
CHST-11	301	FP--TY--AKSTRITDEMTTEFQNISSHEQTLMEVKKIDFLFNMSVSYLKL---	352
CHST-12	364	FP--P--SYRNRASSWEEDASAKIPLAWRQQLKLYEADVFLFCYKPEENLLRD---	414
CHST-8	370	PPRFKDRHSQEARTTARIAHQYEAQLSALQRQRTYDFYMDYLMFNYSKFFADLY---	424
CHST-9	392	PFNFKDRHSSDERTNAQVVRQYLKDLTRTRQLTDFYMDYLMFNYSKFFADLY---	443
CHST-14	321	FPARQ---AWYRPASPESLHYHLCAPRALQDVLKPKYIIDEFSLRAMPLENVTKEACQQ	376
		V	

Abb. 1.3: Aminosäuren-Vergleich der Mitglieder der humanen HNK-1-Sulfotransferase-Familie. Identische Aminosäuren wurden schwarz, ähnliche grau unterlegt. Die putativen 5'-PSB und 3'-PB Bindestellen sowie drei weitere hoch konservierte Domänen (III, IV und V) sind eingezeichnet (verändert nach Kang et al 2002).

CHST-14

CHST-14 wird auf Chromosom 2 von einem einzigen Exon kodiert. Das 2073 bp große mRNA-Transkript wird in ein Protein aus 376 Aminosäuren translatiert.

Die Dermatan-spezifische Sulfotransferase CHST-14 sulfatiert die Hydroxylgruppe des vierten Kohlenstoffatoms von GalNAc, in der Dermatansequenz IdoA-β1,3-GalNAc-β1,4. Die

I. Einleitung

Synthese von Dermatan erfolgt durch schrittweises Anhängen von GalNAc und GlcA an das nichtreduzierende Ende einer Zuckerkette. Nach oder in enger Verbindung mit dieser Polymerisation findet die Epimerisierung von GlcA in IdoA durch die C5-Glucuronyl-Epimerase statt (Malmström, 1984). Es gibt Hinweise, dass die Sulfatierung von GalNAc in Dermatan unmittelbar nach der Epimerisierung erfolgt. Da nach der Sulfatierung von GalNAc die C5-Glucuronyl-Epimerase IdoA nicht mehr in GlcA umsetzen kann wird angenommen, dass Chondroitin durch die aufeinanderfolgenden Aktivitäten der C5-Glucuronyl-Epimerase und der CHST-14 in Dermatan umgewandelt wird.

CHST-14 ist in der Maus ubiquitär exprimiert, mit besonders hoher Expression in Lunge, Hypophyse, Thymus, Uterus und Testis (Hoffmann, 2007).

In unserem Labor wurde vor kurzem die CHST-14^{-/-} Maus hergestellt. Die Analyse dieser Maus, besonders in Hinblick auf Verhalten und funktionelle Regeneration nach Rückenmarksläsionen, ist Bestandteil dieser Arbeit.

1.3 Biologische Relevanz der Sulfatierung

Die Kohlenhydratketten in Glykoproteinen sind komplexe, mannigfaltige Strukturen, die sich in der Zusammensetzung ihrer Monosaccharide sowie in der Verzweigung ihrer Ketten unterscheiden. Durch die kovalente Verknüpfung eines Sulfatrestes an die Hydroxyl- oder seltener an die Aminogruppe eines Zuckerrestes in einem Proteoglykan, kann diese Komplexität noch weiter erhöht werden (Hooper et al., 1996). Die Verknüpfung von Sulfatresten an Kohlenhydratreste eines Glykoproteins kann ein einfaches Glykan ohne spezifischen Rezeptor in einen einzigartigen Liganden für einen Sulfat-abhängigen Rezeptor verwandeln (Bowman und Bertozzi, 1999).

Sulfatierte Kohlenhydratstrukturen spielen eine zentrale Rolle bei einer großen Anzahl molekularer Erkennungsmechanismen. Ein Beispiel ist das schon im Zusammenhang mit der CHST-8^{-/-} Maus erwähnte Glykohormon Lutropin (LH). LH gehört zu einer Familie eng verwandter Glykoproteine, den Glykoprotein Hormonen, zu denen auch das Follikel-stimulierende Hormon (FSH), das Thyroid-stimulierende Hormon (TSH) und chorionic Gonatotropin (CG) gehören. LH und CG tragen einzigartige N-verknüpfte Oligosaccharid-Reste, die mit SO₄-4-Gal-β1,4-GlcNAc enden, während die meisten anderen sekretierten Glykoproteine Sia-α2,6-Gal-β1,4-GlcNAc besitzen. Lutropin wird von der Hypophyse in das Blut sezerniert, wo es an den LH-Rezeptor der Eierstöcke bindet und so die Produktion von Östrogen bzw. Progesteron aktiviert. Die Menge des zirkulierenden LHs bestimmt somit die

I. Einleitung

Menge des produzierten Östrogens und Progesterons und muss daher streng reguliert sein. Die Halbwertszeit des Glykohormons wird durch den Man/GalNAc-4-SO₄ Rezeptor der Endothelzellen der Leber bestimmt, der das terminale GalNAc-4-SO₄ erkennt, bindet und so das Hormon aus dem Blutkreislauf entfernt (Fiete et al., 1991, 1997). Die Bedeutung einer einzigen Sulfatgruppe am N-Terminus des Glykohormons für die Bindung an den Man/GalNAc-4-SO₄ Rezeptor wird in der CHST-8^{-/-} Maus deutlich: Durch die fehlende Sulfatierung von LH wird die Bindung an den Rezeptor nicht mehr gewährleistet und die Regulation der Östrogen- und Progesteron-Produktion ist gestört, wodurch die Tiere erhöhte Östrogen-, respektive Testosteron-Level aufweisen.

Ein weiteres Beispiel für die biologische Relevanz der Sulfatierung ist die symbiotische Interaktion zwischen Pflanzen und Stickstoff-fixierenden Bakterien. Das Bakterium *Rhizobium meliloti* produziert einen Nodulations-Faktor, der aus einem Polymer β1,4-verknüpfter GlcNAc-Reste besteht, das am nichtreduzierenden Ende N-acetyliert, und am reduzierenden Ende 6O-sulfatiert ist. Dieses Lipo-Oligosaccharid ist für die wirtsspezifische Induktion der Nodulation verantwortlich. Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt, es wird jedoch vermutet, dass die Wirtspflanze einen spezifischen Rezeptor exprimiert, der das sulfatierte Oligosaccharid bindet und so die Wirtsspezifität mitbestimmt (Long, 1989).

Es gibt noch viele weitere Belege für die besondere Rolle sulfatierter Kohlenhydrate in molekularen Erkennungsprozessen, z.B. das L-Selektin vermittelte *Homing* der Lymphozyten in die Lymphknoten (Imai et al., 1991, 1993) oder die Blutgerinnung, auf die in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden soll.

1.4 Rolle der Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs) im Nervensystem

Chondroitinsulfat-Proteoglykane sind die am häufigsten vertretenen Proteoglykane im ZNS der Säugetiere. Sie fungieren hauptsächlich als Grenzen-setzende Moleküle und beeinflussen so Axonwachstum, Zell-Migration und Plastizität. Neurocan, Brevican, Versican und Aggrecan werden als Lecticane/Hyalecticane zusammengefasst, die eine N-terminale Hyaluronan-Bindedomäne und eine C-terminale Lektin-ähnliche Domäne als Gemeinsamkeit aufweisen. Lecticane/Hyalecticane sind, abgesehen von einer GPI-verankerten Brevican Spleiß-Variante (Seidenbecher et al., 1995), sekretierte Moleküle der ECM. Alternatives Spleißen erhöht die strukturelle Vielfalt der CSPGs zusätzlich. Von Versican sind 4 Spleiß-Varianten bekannt (V₀, V₁, V₂, V₃), die sich in der Anzahl und Anordnung ihrer GAG-Anheftungsdomänen unterscheiden (Fülöp et al., 1993; Shinomura et al., 1993; Zako et al., 1995), wobei V₃ keine GAG-Anheftungsdomänen besitzt und daher wahrscheinlich keine

I. Einleitung

GAG-Ketten trägt (Zako et al., 1995). Während V_0 , V_1 , und V_3 auch außerhalb des ZNS zu finden sind, ist V_2 ein ZNS spezifisches CSPG (siehe auch Tabelle 1.2). Die Anzahl der GAG-Ketten, die auf eine bestimmte Größe der GAG tragenden Domänen kommen, sind für Versican, Neurocan und Brevican nahezu konstant. V_0 besitzt 17-23 CS-Ketten, V_1 12-15, V_3 fünf bis acht CS-Ketten (Dours Zimmermann und Zimmermann, 1994). In Neurocan findet man durchschnittlich drei CS-Ketten (Rauch et al., 1991, 1992), während Brevican ein Teilzeit-Proteoglykan zu sein scheint und zwischen null und fünf CS-Ketten besitzt (Yamada et al., 1994).

NG2 und Phosphacan besitzen individuelle Strukturen. NG2 ist ein transmembranes Protein, das keine signifikanten Homologien zu anderen Proteinen aufweist (Nishiyama et al., 1991), Phosphacan stellt die extrazelluläre Domäne der transmembranen Rezeptor-Typ-Protein-Tyrosin-Phosphatase β (RPTP β) dar (Maurel et al., 1994). Die kleinen leucinreichen Proteoglykane, wie Biglycan oder Dekorin, bilden eine weitere Gruppe der CSPGs (Hocking et al., 1998).

Name	Typ	GAG-Typ	Anzahl der GAG-Ketten	zellulärer Ursprung	ZNS spezifisch?	Vorkommen außerhalb des ZNS
Brevican	ECM-PG	CS	0-5	Gliazellen/ Neuronen	ja	–
GPI-Brevican	GPI-PG	CS	0-5	Gliazellen	ja	–
Versican V_0	ECM-PG	CS	17-21	Astrozyten?	nein	Blutgefäße, Mesenchym
Versican V_1	ECM-PG	CS	15-23	Astrozyten?	nein	Blutgefäße, Mesenchym
Versican V_2	ECM-PG	CS	5-8	Oligodendrozyten	ja	–
Neurocan	ECM-PG	CS	3	Neuronen/ Astrozyten	ja	–
Aggrecan	ECM-PG	CS	?	Neuronen	nein	Knorpel, Chorda chordalis
RTPT- ζ/β	TM-PG	CS/(KS)	3-4	Gliazellen/ Neuronen	ja	–
Phosphacan	ECM-PG	CS/(KS)	3-4	Gliazellen/ Neuronen	ja	–
NG2	TM-PG	CS	0-3	Oligodendrozyten -Vorläuferzellen	nein	Knorpel, Extremitäten -knospen

Tab. 1.2: Struktur und Expression der CS-Proteoglykane im ZNS. GAG, Glykosaminoglykan; ZNS, zentrales Nervensystem; ECM, Extrazelluläre Matrix; GPI, Glykosylphosphatidylinositol; TM, transmembran; PG, Proteoglykan; CS, Chondroitinsulfat. (verändert nach Bandtlow und Zimmermann, 2000).

I. Einleitung

Die Wirkungsweise der CSPGs kann durch das Kernprotein oder die GAG-Ketten alleine vermittelt werden, meistens ist es aber ein Zusammenspiel aus beidem. Die Bindungseigenschaften der GAG-Ketten werden durch bestimmte Sulfatierungsmuster definiert, die hoch affine Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren und andere Moleküle darstellen (Bovolenta et al., 2000). Hyaluronan ist der bedeutendste ECM-Ligand der Lecticans/Hyallecticans (LeBaron et al., 1992; Rauch et al., 1991), aber auch Tenascin-R und Tenascin-C sind hoch affine Liganden dieser CSPG-Familie (Grumet et al., 1994; Aspberg et al., 1997; Milev et al., 1997, 1998). Phosphacan bindet ebenfalls an Tenascin-R und Tenascin-C (Milev et al., 1998, 1994), während NG2 Kollagen V und VI bindet (Burg et al., 1997). Diese Bindungen werden hauptsächlich durch das Kernprotein vermittelt, in geringen Maß jedoch auch durch die Glykosaminoglykan-Ketten.

Während der Embryonalentwicklung modulieren CSPGs Zellmigration und Axonwachstum. Neuronale Zellmigration wird sowohl durch stimulierende als auch hemmende Signale gesteuert und es ist bekannt, dass während der Embryonalentwicklung einige Gewebe als „Schranken“ für migrierende neuronale Zellen wirken und so das Wachstum dieser Zellen dirigieren. Da CSPGs sowohl zeitlich als auch räumlich reguliert in solchen „Schranken“-bildenden Geweben exprimiert werden, wird angenommen, dass die Chondroitinsulfat-GAGs einige dieser hemmenden Signale vermitteln (Landolt et al., 1995; Perris et al., 1991), indem sie die Zelladhäsion einiger ECM-Moleküle modulieren. Allerdings gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass die CSPGs in Bezug auf Axonwachstum nicht einfach als inhibitorische Moleküle klassifiziert werden können. *In vitro* Experimente weisen darauf hin, dass die wachstumshemmenden oder -stimulierenden Eigenschaften der CSPGs von den ECM- und Zelladhäsions-Molekülen abhängig sind, die sie als Liganden binden. Gute Beispiele für diese Vielseitigkeit der Proteoglykane sind Neurocan und Phosphacan. Für Phosphacan konnte gezeigt werden, dass es auf Fibronectin-Substraten das Neuritenwachstum corticaler Neuronen vermittelt (Maeda und Noda, 1996). Neurocan scheint in der Entwicklung des Cortex eine Rolle bei der Abgrenzung der efferenten und afferenten intracorticalen Bahnen zu spielen, indem es für die Axone nicht als Schranke, sondern als Leitlinie dient, um zwischen efferenten und afferenten Pfaden zu unterscheiden (Meyer-Puttlitz et al., 1996; Miller et al., 1995).

1.5 Warum schlägt neuronale Regeneration im ZNS fehl? Ereignisse an der Glianarbe

Die Regeneration von Nervenzellen ist ein hoch komplexer Prozess aus extrinsischen Faktoren, wie den inhibitorischen Einflüssen aus dem umliegenden Gewebe und intrinsischen Faktoren, wie den Regenerationsversuchen der Axone selbst.

I. Einleitung

Nach Läsionen des Rückenmarks folgt eine Phase, in der Zelltod und Demyelinisierungsprozesse zu sekundärer Zerstörung der Axone führen. Diese Phase führt zu wichtigen Veränderungen der Morphologie und Funktion der Gliazellen (Sandvig et al., 2004). An der Läsionsstelle kommt es zum Absterben von Neuronen und Oligodendrozyten, während Gliazellen, wie z.B. Astrozyten und Mikroglia, in der Nähe der Läsionsstelle mit verstärkter Proliferation und Migration antworten und so die Gewebearchitektur zu einer Glianarbe umbauen (Camand et al., 2004). Wenige Stunden nach der Verletzung wandern Makrophagen aus dem Blut und Mikroglia, eine spezialisierte Form der Makrophagen, in die Läsionsstelle ein. Drei bis fünf Tage später findet man große Mengen an Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cell*, OPC), eine ZNS spezifische Form von Stammzellen, in der sich bildenden Glianarbe. Auch Astrozyten wandern in die Glianarbe ein und teilen sich. Etwa zehn Tage nach der Verletzung ist die Bildung der Glianarbe, die nun einen großen Anteil reaktiver Astrozyten enthält, abgeschlossen.

Es ist bekannt, dass die Glianarbe das Haupthindernis bei der Axonregeneration darstellt. Ramon y Cajal und F. Tello konnten schon Anfang letzten Jahrhunderts zeigen, dass einige Axone nach Verletzung in der Lage waren wieder zu wachsen, dass sie aber, sobald sie mit der Glianarbe in Kontakt kamen, kollabierten (Tello, 1991; Ramon y Cajal, 1928). Die Glianarbe ist jedoch nicht nur schädlich, sie spielt auch eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke und sie schirmt das umliegende Nervengewebe vor den Entzündungsreaktionen an der Läsionsstelle ab (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004).

Ephrine, Semaphorine und Proteoglykane sind in der Glianarbe nach Läsionen des Rückenmarks stark exprimiert. Ephrine sind membranständige Proteine, die während der Entwicklung des ZNS bei der Wegfindung der Axone, der Zielerkennung und bei der Regulation der Zelladhäsion und Zellmigration eine Rolle spielen (Henkemeyer et al., 1996; Xu et al., 1999; Wang et al., 1997). Semaphorine liegen sowohl membrangebunden, als auch sekretiert vor. Sie sind an Axon-Führungs-Prozessen, an der Synapsenbildung und der Verzweigung der Synapsen beteiligt (Pasterkamp et al., 1999). Proteoglykane, insbesondere die CSPGs, wurden schon im vorherigen Kapitel vorgestellt. Ihre Rolle in der Glianarbe soll im Folgenden etwas genauer betrachtet werden.

Die Suche nach dem Initiator der Glianarben-Bildung führte unter anderem zu dem *transforming growth factor β* (TGF β). Die TGF β -Produktion der Astrozyten, Makrophagen und Endothelzellen steigt unmittelbar nach Läsionen des Gehirns oder Rückenmarks an (Lagord et al., 2002). Für TGF β 2 konnte gezeigt werden, dass es die Proteoglykan-Produktion der Astrozyten signifikant steigert (Asher et al., 2000). Fast alle Mitglieder der CSPG Familie sind nach Rückenmarksverletzungen hochreguliert, jedoch mit

I. Einleitung

unterschiedlichen räumlichen und zeitlichen Mustern. NG2 ist das am stärksten hochregulierte CSPG an der Läsionsstelle. Die NG2-Expression steigt innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Läsion stark an, hat den höchsten Wert sieben Tage nach der Läsion und bleibt noch mindestens weitere sieben Wochen erhöht (Jones et al., 2002). NG2 wird nach Verletzungen des ZNS von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, sowie von Makrophagen produziert (Dawson et al., 2000; Jones et al., 2002). Obwohl *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass Astrozyten NG2 produzieren können (Fidler et al., 1999; Hirsch und Bähr 1999), scheinen sie *in vivo*, nach Verletzungen des ZNS, keine Source für NG2 Produktion zu sein (Jones et al., 2002).

Die Expression von Neurocan, Brevican und Versican nach Verletzungen des Rückenmarks oder Gehirns ist länger anhaltend erhöht, mit den höchsten Werten zwei Wochen nach der Verletzung. Während erhöhte Expression von Neurocan und Versican bis vier Wochen nach der Läsion nachzuweisen ist, ist die Brevican-Expression auch noch zwei Monate nach der Läsion erhöht (Jones et al., 2003). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen CSPGs sinkt die Expression von Phosphacan nach der Läsion erst ab, um sich dann wieder zu erholen. Die höchsten Phosphacan-Werte wurden zwei Monate nach der Läsion gemessen (Jones et al., 2003).

Eine Vielzahl von *in vitro* Studien konnte den inhibitorischen Einfluss der CSPG auf das Axonwachstum bestätigen (Fawcett et al., 1989; McKeon et al., 1991, 1995; Dou und Levine, 1994; Friedlander et al., 1994; Smith-Thomas et al., 1994, 1995; Emerling und Lander, 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass CSPGs nach Verletzungen des ZNS hochreguliert werden (McKeon et al., 1991; Pindzola et al., 1993; Lips et al., 1995; Davies et al., 1997, 1999; Fitch und Silver, 1997; Jones et al., 2003). Der inhibitorische Effekt der CSPGs kann sowohl durch das Kernprotein oder die GAG-Ketten alleine vermittelt werden, meistens ist es aber ein Zusammenspiel aus beidem. Ein Ansatz, den negativen Einfluss der CSPGs zu verhindern oder zumindest zu verringern, besteht in der Applikation von Chondroitinase ABC (ChABC). Dieses Enzym aus *Proteus vulgaris* vereint zwei Enzymeigenschaften zum Degradieren von Chondroitinsulfaten. Zum einen eine Endoeliminase, die Chondroitinsulfat depolymerisiert, zum anderen eine Exoeliminase, die Tetra- und Hexasaccharide in Disaccharide spaltet (Hamai et al., 1997). Der kommerziell erhältlichen, proteasefreien Chondroitinase ABC (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) fehlt die Exoeliminase-Aktivität und sie produziert Tetra- und Disaccharide (Sugahara et al., 1994; Hamai et al., 1997). ChABC schneidet auch Hyluronan, jedoch mit deutlich geringerer Aktivität, während Heparan- und Keratansulfate von ihr nicht angegriffen werden (Hamai et al., 1997).

Moon et al. (2001), konnten zeigen, dass die Injektion von ChABC *in vivo* die funktionelle Erholung des nigrostriatalen Traktes nach Verletzungen begünstigte. Auch nach

I. Einleitung

Rückenmarksverletzungen konnte man bei Ratten, die ChABC in die Läsionsstelle injiziert bekamen, im Vergleich zu unbehandelten Tieren, eine verbesserte Erholung der motorischen Fähigkeiten und der Blasenfunktion feststellen (Bradbury et al., 2002; Caggiano et al., 2005; Houle et al., 2006; Cafferty et al., 2007). Allerdings ist das Enzym nach Injektion in die Läsionsstelle des Rückenmarks nur ca. vier Tage aktiv (Crespo et al. 2007). ChABC fördert nicht nur die funktionelle Regeneration im ZNS. Auch in Läsionsmodellen des PNS konnte nach ChABC-Injektion eine funktionelle Erholung der motorischen Fähigkeiten bei Ratten beobachtet werden (Galtrey et al., 2007).

Die genauen Mechanismen, die der Erholung nach Chondroitinase ABC-Injektionen zugrunde liegen sind noch nicht bekannt, aber einige Studien haben gezeigt, dass ChABC das *axonal sprouting* der Purkinje Zellen sowohl in Gewebeschnitten (Tanaka et al., 2003) als auch *in vivo* (Corvetti and Rossi, 2005) fördert, sowie das Sprießen der optischen Axone begünstigt (Tropea et al., 2003). ChABC-Behandlung von CSPG führt zwar zu einem Abbau der GAG-Ketten, die Proteinkomponente der CSPGs bleibt jedoch erhalten, ebenso wie die GAG-Stümpfe, die durch den Verdau entstehen. Außerdem hat die Injektion von Chondroitinase in die Läsionsstelle keinen Einfluss auf die Transkription, Translation oder posttranslationale Modifikationen zusätzlicher CSPG. Das Verstehen der zeitlichen und räumlichen Expression der CSPG in verschiedenen Läsionsmodellen, wird die Interpretation der Rolle dieser Glykoproteine nach Verletzungen des ZNS erleichtern und dabei helfen, Methoden zu entwickeln, den inhibitorischen Effekt der CSPG zu umgehen.

1.6 Tenascine

Die Glykoproteinfamilie der Tenascine ist Teil der ECM. Bisher sind sechs Mitglieder bekannt, namentlich Tenascin-C (TN-C), Tenascin-R (TN-R), Tenascin-W (TN-W), Tenascin-X (TN-X), Tenascin-Y (TN-Y) und das erst 2003 beschriebene Tenascin-W homologe Tenascin-N (TN-N) in der Maus.

Tenascine zeigen eine charakteristische, perlenkettenähnliche Anordnung ihrer Domänen (vgl. Abb. 1.4). N-terminal besitzen sie eine cysteinreiche Tenascin Assembly (TA)-Domäne, die drei bis vier helikale Heptad-Wiederholungen enthält und eine Oligomerisierung der Proteine in Homo-Oligomere erlaubt. Der TA-Domäne schließen sich mehrere epidermal growth factor ähnliche (EGFL)-Domänen an, wobei die erste EGFL-Wiederholung stets eine trunkierte Domäne ist. Ein Großteil der Tenascin-Polypeptide besteht aus Fibronektin-Typ-III (FN-III) Domänen, die von einer globulären C-terminalen Fibrinogen (FBG)-Domäne gefolgt sind.

I. Einleitung

Oligomerisierung von TN-C und TN-R konnte über Western Blot und *rotatory shadowing*-Analysen gezeigt werden (Erickson und Inglesias, 1984). Tenascin-C oligomerisiert über die N-terminale TA-Domäne in Hexamere, während für TN-R Tri- und Dimere Strukturen nachgewiesen werden konnten (Norenberg et al., 1992). Da die TA-Domäne, die für die Oligomerisierung von TN-C und TN-R verantwortlich ist, in allen Tenascinen gefunden wurde, ist anzunehmen, dass auch die anderen Mitglieder dieser Glykoproteinfamilie in der Lage sind, oligomere Strukturen zu bilden. Für TN-X und TN-Y wurden zumindest Dimere oder Trimere vorausgesagt (Bristow et al., 1993).

Die FN-III-Domänen bestehen aus ca. 90 Aminosäuren mit einer flexiblen Struktur aus sieben antiparallelen β -Strängen, die in zwei Blättern angeordnet sind. Die Anzahl der FN-III-Domänen variiert zwischen den einzelnen Tenascinen und diese Domänen können in TN-C, TN-R und TN-N zusätzlich alternativ gespleißt werden. Während von TN-R nur eine alternative Spleiß-Variante bekannt ist, führt das Spleißen von neun FN-III-Domänen in TN-C zu mindestens 29 verschiedenen Spleiß-Varianten (Joester und Faissner, 1999). Einige dieser Spleiß-Varianten werden bevorzugt während der Entwicklung exprimiert (Prieto et al., 1990). Die genauen Mechanismen des Spleißens der FN-III-Domänen sind jedoch noch nicht bekannt. Eine Besonderheit des adulten TN-N ist, dass es als einziges Mitglied der Tenascin Familie eine vollständig duplizierte FN-III-Domäne besitzt (Neidhardt et al., 2003).

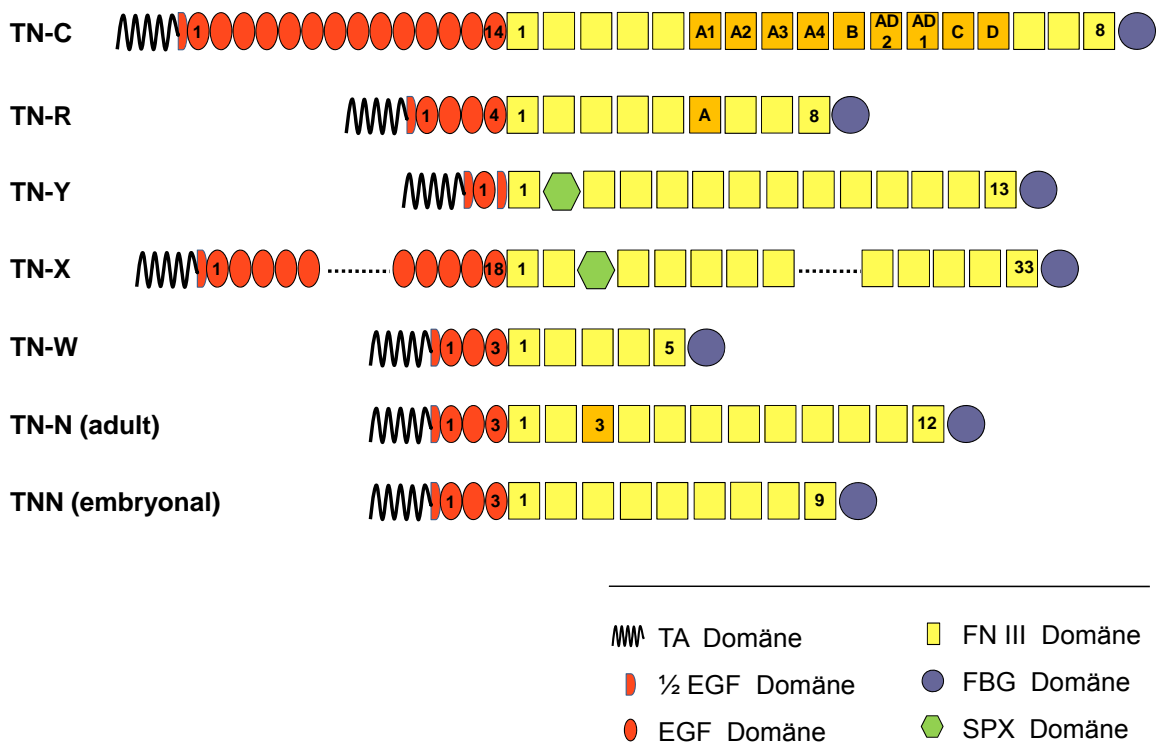


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Struktur der Tenascin Familie. Die Familie besteht aus sechs Mitgliedern, die die gleiche perlenkettenähnliche Anordnung ihrer einzelnen Domänen zeigen. Alternativ gespleißte FN-III-Domänen sind dunkelgelb hervorgehoben.

I. Einleitung

Die globuläre FBG-Domäne besteht aus Polypeptidschleifen, die durch Disulfidbrücken in der Aminosäurekette gebildet werden (Doolittle, 1948) und ist in der Lage Calcium-Ionen zu binden.

TN-X und TN-Y weisen als Besonderheit noch eine zusätzliche SPX Domäne auf. Diese serin- und prolinreiche Domäne, die aus über 100 Resten der sich wiederholenden Sequenz S-P-X bestehen kann, liegt bei TN-X zwischen der zweiten und dritten FN-III-Domäne und bei TN-Y zwischen der ersten und zweiten FN-III-Domäne. Die Funktion dieses Motivs ist noch nicht genau untersucht.

Tenascin-C

TN-C wurde von mehreren Laboren gleichzeitig entdeckt, weshalb es mehrere Namen besitzt: *glial/mesenchymal extracellular matrix protein* (GMEM) (Bourdon, 1983), *myotendinous antigen* (Chiquet und Fambrough, 1984 a, 1984b), Cytotactin (Grumet et al., 1985), J1_{220/200} (Kruse et al., 1985) und Neuronectin (Rettig et al., 1989)

TN-C wird zeitlich und räumlich streng reguliert von mehreren Zelltypen während der Embryogenese synthetisiert. Es kann sehr früh in der Entwicklung während der Gastrulation und der Bildung der Somiten und später, während der Einwanderung von Zellen aus der Neuralleiste, detektiert werden (Crossin et al., 1986; Tan et al., 1987). Das Molekül wird hauptsächlich von unreifen und reaktiven Astrozyten gebildet, sowie von einigen radialen Gliazellen (Brodkey et al., 1995; Kawano et al., 1995). TN-C Immunoreaktivität ist meist als Grenzen-setzendes Muster zu detektieren, was mit der funktionellen Unterteilung neuroanatomischer Systeme korreliert (Faissner und Steindler, 1995; O'Brien et al., 1992). Im PNS wird Tenascin-C von Schwann Zellen während der Myelinisierung der Nerven exprimiert. Außerhalb des ZNS ist TN-C bei der Morphogenese des Skelettes, des Bindegewebes und des Gefäßsystems beteiligt (Chiquet und Fambrough, 1984b).

Während Tenascin-C in der Embryogenese und Organogenese stark exprimiert wird, wird es in entwickelten Organen nicht oder nur schwach gebildet. Auch in den meisten Regionen des adulten Gehirns kann kein TN-C nachgewiesen werden, Ausnahmen sind Regionen, die sich durch hohe Plastizität auszeichnen, wie den Hypothalamus und dem olfaktorischen Bulbus. (Theodosis et al., 1997; Gonzales und Silver, 1994). Unter pathologischen Bedingungen, wie Infektionen, Entzündungsprozessen oder Tumorbildung, kann die Expression von TN-C im adulten Tier wieder ansteigen (Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). Eine weitere Besonderheit von TN-C ist, dass seine Expression durch mechanischen Stress von Zellen in Kultur oder von Geweben *in vivo* ausgelöst werden kann (Chiquet-Ehrismann et al., 1994; Flück, Tunc-Civelek und Chiquet, 2000).

I. Einleitung

Überraschenderweise zeigen TN-C^{-/-} Mäuse keine besonderen anatomischen oder morphologischen Auffälligkeiten, weder während der Entwicklung noch postnatal. Auch in Bezug auf Lebenserwartung, Fertilität und Wundheilung gibt es keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtypmäusen (Saga et al., 1992; Forsberg et al., 1996). Allerdings scheint die Struktur der neuromuskulären Endplatte verändert zu sein (Cifuentes-Diaz et al., 1998). Dieser überraschend milde Phänotyp der TN-C^{-/-} Mäuse könnte durch die Expression kompensatorischer Moleküle, wie z.B. TN-R oder TN-N, die eine teilweise überlappende Expression mit TN-C zeigen, erklärt werden.

Des Weiteren zeigten verhaltensbiologische Untersuchungen der TN-C^{-/-} Mäuse neurologische Defizite, wie beeinträchtigte sensomotorische Koordination, Hyperaktivität im *open field*, schlechtes Abschneiden im *passive avoidance learning* Test, verringertes Angstverhalten und reduzierte Neugier-induzierte Exploration (Fukamauchi et al., 1996, 1997, 1998; Fukamauchi und Kusakabe, 1997; Morellini und Schachner, 2006).

Tenascin-R

Auch Tenascin-R ist unter mehreren Namen bekannt: Restriktin, Janusin und J1_{160/180} (Fuss et al., 1991; Rathjen et al., 1991; Norenberg et al., 1992). Während Tenascin-C früh in der Entwicklung von radialen Gliazellen gebildet wird, wird TN-R erst später von Oligodendrozyten während der Myelinisierung der Axone exprimiert. TN-R galt lange als reines ZNS Tenascin, es konnte mittlerweile aber gezeigt werden, dass es auch transient im PNS exprimiert wird, wo es mit Axonwachstum und Schwann-Zell-Migration während der Innervierung der Skelettmuskulatur in Zusammenhang steht (Probstmeier et al., 2001). Dieses Glykoprotein ist an Kontaktstellen zwischen unmyelinisierten Axonen, an der Schnittstelle von Axonen und Myelinisierungsprozessen der Oligodendrozyten, in Myelinscheiben (Bartsch et al., 1993), sowie an Ranvierschen Schnürringen (Ffrench-Constant et al., 1986; Bartsch et al., 1993) zu finden. Des Weiteren ist TN-R eine wichtige Komponente der perineuronalen Netze (PNN), die Motorneuronen und inhibitorische Interneuronen, z.B. des Cortex oder des Hippokampus, umgeben (Weber et al., 1999).

TN-R^{-/-} Mäuse sind in Bezug auf Lebenserwartung, Fertilität und Gewicht unauffällig, ebenso in Bezug auf die grobe Anatomie des Gehirns und des Rückenmarks. Es konnten keine morphologischen Veränderungen der Myelinscheiden und der Ranvierschen Schnürringe festgestellt werden. Jedoch war die Expression von Phosphacan in der ECM der TN-R^{-/-} Mäuse verringert. Die PNNs in TN-R^{-/-} Mäusen sind im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant weniger entwickelt und die Weiterleitungsgeschwindigkeit des optischen Nervs ist deutlich reduziert (Weber et al., 1999). Verhaltensbiologische Untersuchungen der TN-R^{-/-}

I. Einleitung

Mäuse zeigten eine verringerte Explorationsmotivation und verstärktes Angstverhalten im *free choice open field*, im *open field* und im *elevated plus maze*. Des Weiteren ist eine Beeinträchtigung der Motorkoordination im *wire hanging* Test, sowie im *pole* und *rotarod* Test festzustellen (Freitag et al., 2003).

Tenascin-X, Tenascin-W und Tenascin-Y

TN-X ist hauptsächlich im Bindegewebe, in Herz- und Skelettmuskeln, in der Umgebung von Blutgefäßen, in Tumorgeweben und in der Haut exprimiert (Elefteriou et al., 1997; Ikuta et al., 2000; Sakai et al., 1996). Mutationen im TN-X-Gen resultieren unter anderem im Ehlers-Danlos-Syndrom, einer Bindegewebserkrankung, die durch stark überdehnbare und leicht verletzbare Haut, der Neigung zur Bildung von Hämatomen, abnorme Wundheilung und starke Überbeweglichkeit der Gelenke gekennzeichnet ist.

Tenascin-Y, das Vogel-homologe TN-X, wird in Bindegewebe, das am Wachstum von Muskelzellen beteiligt ist, sowie im Gehirn, Niere, Lunge und Haut von Vögeln exprimiert (Hagios et al., 1996; Tucker, Agios und Chiquet-Ehrismann, 1999).

Tenascin-W wurde im Zebrafisch identifiziert und wird während der Entwicklung in auswandernden Zellen der Neuralleiste und des sich entwickelnden Skeletts exprimiert, wo es mit TN-C kolokalisiert (Weber et al., 1998). Ebenso wie Zebrafisch TN-C ist TN-W hauptsächlich im Embryo und den frühen larvalen Stadien nachzuweisen, während die Expression im jungen Zebrafisch reduziert ist. TN-W konnte nicht im ZNS nachgewiesen werden.

Tenascin-N

TN-N, das Maus homologe TN-W wurde von zwei Arbeitsgruppen parallel beschrieben. 2003 veröffentlichten Neidhardt et al. die Klonierung und Charakterisierung des adulten TN-N, 2004 veröffentlichten Scherberich et al. die embryonale Form von TN-N.

Scherberich und Kollegen verwendeten eine Maus cDNA Bibliothek aus 19 Tage alten Mausembryonen. Das von ihnen als TN-W beschriebene TN-N besitzt neun FN-III-Domänen, von denen sich die Domänen 1, 2 und 9 deutlich von den mittleren FN-III-Domänen unterscheiden und sie konnten keine alternativen Spleiß-Varianten nachweisen. TN-N-Expression kann erstmals E 11,5 in den sich entwickelnden Kieferknochen nachgewiesen werden, ab E 14,5 findet man TN-N zeitlich reguliert auch in der glatten Muskulatur, im Darm, im Magen, in der Knochenhaut der Rippen, in Kiefer, Kaumuskulatur und Gaumen. Außer in der Kaumuskulatur und im Darm wurde TN-N immer mit TN-C koexprimiert. Im

I. Einleitung

adulten Tier wurde embryonales TN-N in der Niere, der Aortenklappe und der Knochenhaut der Rippen nachgewiesen, wo es mit TN-C kolokalisiert. In Magen, Darm und Cerebellum konnte kein embryonales TN-N nachgewiesen werden.

Neidhardt et al. (2003) verwendeten Gewebe aus adulten Mäusen. Sie konnten eine mRNA aus 5773 bp, mit einem offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) aus 4683 bp nachweisen. Das kodierte TN-N-Protein besteht aus 1560 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Größe von 173 kDa. Im Gegensatz zur embryonalen Form besitzt adultes TN-N 12 FN-III-Domänen und es konnten zwei Isoformen beschrieben werden, von denen der kleineren Form die dritte FN-III-Domäne fehlt. Northern Blot Analysen und *in situ* Hybridisierungen zeigten starke TN-N-Expression in der Niere, der Milz und im Gehirn. Die TN-N-Expression in der Milz ist auf die Lymphozyten-reiche weißen Pulpa begrenzt, in der Niere findet man TN-N ausschließlich in der Medulla. Sowohl in der Milz, als auch in der Niere, konnte die Expression erst in frühen adulten Tieren nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu dem von Scherberich et al. beschriebenen embryonalen TN-N, kann die Expression von adulten TN-N räumlich und zeitlich reguliert im ZNS nachgewiesen werden. Interessanterweise ist die Expression im ZNS komplementär zu der von TN-C und TN-R. Während Tenascin-C und -R hauptsächlich von Astrozyten bzw. Oligodendrozyten gebildet werden (Bartsch et al., 1996), wird TN-N von adulten Neuronen exprimiert. Betrachtet man sich die Expression von TN-C und der adulten TN-N Form während der Entwicklung, stellt man fest, dass TN-C in frühen Entwicklungsstadien zu finden ist, während TN-N eher in adulten Tieren exprimiert wird.

Wie bereits erwähnt sind zwei TN-N-Isoformen beschrieben worden. Interessanterweise zeigen die FN-III-Domänen der kürzeren Isoform *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf Neuritenwachstum und Zellmigration. *In vivo* konnte über Immunfärbungen in der CA3-Region des Hippokampus ein TN-N-Gradient, mit stärker werdenden Signal in Richtung CA2-Region, identifiziert werden. Da die meisten Mossy-Fasern postnatal von Gyrus Dentatus in die CA3-Region projizieren und somit anatomisch dem TN-N-Gradienten folgen, wird angenommen, dass TN-N in diesem Bereich des Hippokampus eine wegweisende Rolle bei der Projektion der Mossy-Fasern besitzt.

2. *Gene targeting* und die Herstellung von Knockout (KO) Mäusen

Unter *Gene targeting* versteht man die gezielte Modifikation des Mausgenoms via homologe Rekombination. Seit die homologe Rekombination 1987 in mausembryonalen Stammzellen (ES Zellen) beschrieben wurde (Thomas und Capecchi, 1987; Doetschmann et al., 1987), hat das *Gene targeting* große Bedeutung für die *in vivo* Analyse erlangt, da die Möglichkeit geschaffen wurde Mäuse zu generieren, die jeden gewünschten Genotyp besitzen.

Die *Gene targeting* Technologie bedient sich pluripotenter mausembryonaler Stammzellen, die 1981 erstmals aus Blastozysten gewonnen werden konnten (Martin, 1981; Evans und Kaufman, 1981). Auch nach extensiver Genmanipulation sind diese Zellen in der Lage, vollständig an der Embryogenese teilzunehmen, nachdem sie in isolierte Blastozysten injiziert wurden. In den so hergestellten chimären Tieren können Nachkommen der manipulierten ES-Zellen in allen Zelltypen, einschließlich der Gameten, nachgewiesen werden. Seitdem wurden zahlreiche ES-Zell-Linien hergestellt, die meist aus 129SV/J Mauslinien oder 129SV/J Hybridlinien gewonnen werden.

Erfolgreiches *Gene targeting* hängt von der Keimbahngängigkeit der ES-Zellen ab. Da differenzierte Zellen nicht keimbahngängig sind, müssen die ES-Zellen im pluripotenten Status gehalten werden. Dies wird erreicht, indem man die Zellen in Gegenwart des *Leukaemia inhibitory factors* (LIF) kultiviert, der die Differenzierung der Zellen verhindert.

Maus ES-Zellen sind zu einem wichtigen Bestandteil der Gentechnik geworden, da man mit ihrer Hilfe über homologe Rekombinationsereignisse gezielte genomische Modifikationen, wie zum Beispiel die Deletion eines Gens zur Herstellung einer Knockout-Mutante, in die Keimbahn von Mäusen einführen kann. Jedoch können nicht alle biologischen Prozesse mittels Gen-Inaktivierung untersucht werden, denn das Ausschalten eines Gens, das für die Entwicklung essentiell ist, kann zu pränataler Letalität führen. Dieses Problem kann jedoch durch die Herstellung konditionaler Knockout-Mäuse umgangen werden, bei denen ein Gen zeitlich oder gewebsspezifisch ausgeschaltet werden kann.

Zur Herstellung konditionaler Knockout-Mäuse bedient man sich meistens des Cre/loxP-Rekombinase Systems des Bakteriophagen P1. Die Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 gehört zur Superfamilie der λ -Integrasen der sequenzspezifischen Rekombinasen. Im Gegensatz zu vielen anderen Rekombinasen benötigt sie keine Cofaktoren (Argos et al., 1986). Sie erkennt und vermittelt sequenzspezifische Rekombination zwischen 34 bp Sequenzen, die als loxP-Erkennungssequenzen bezeichnet werden (loxP = *locus of crossover in P1*). Diese Erkennungssequenzen bestehen aus 13 bp langen invertierten Wiederholungen, die durch eine 8 bp lange, nicht palindromische Sequenz unterbrochen

I. Einleitung

sind. Diese 8 bp bestimmen die Orientierung der loxP-Erkennungssequenz (Hoess et al., 1982). Besitzt ein lineares DNA Molekül zwei loxP-Sequenzen gleicher Orientierung, resultiert Cre-vermittelte intramolekulare Rekombination in der Exzision der loxP-flankierten Gensequenz, wobei nur eine loxP-Erkennungssequenz erhalten bleibt. Sind die beiden loxP-Erkennungssequenzen gegensätzlich orientiert, resultiert Cre-vermittelte Rekombination in der Inversion der loxP-flankierten Gensequenz (Abremski et al., 1983).

Ein weiteres Rekombinase-System ist das FLP/FRT-System aus der Hefe, bei der spezifische FRT-Erkennungssequenzen (*FLP recognition target*) von der FLP-Rekombinase erkannt werden. Die FRT-Erkennungssequenzen bestehen aus zwei 18 bp langen invertierten Sequenzen, die durch eine 8 bp lange Kernsequenz getrennt sind. Wie auch im Cre/loxP-Rekombinase-System bestimmen diese 8 bp die Orientierung der Erkennungssequenz (Senecoff et al., 1985).

Ein wichtiger Schritt bei der Herstellung einer Knockout-Maus, ist die Generierung des Zielvektors. Dieser wird aus der genomischen Sequenz des Gens von Interesse hergestellt und zwei zum Genlokus homologen Regionen. Diese als langer und kurzer homologer Arm bezeichneten Sequenzen flankieren den ausgewählten Genlokus, sowie eine Selektionskassette. Meist wird hierfür das bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase-Gen (neo) verwendet. Diese neo-Kassette ermöglicht, nach Transfektion von ES-Zellen, die Selektion nach zufällig integrierten und homolog rekombinierten Klonen. Die neo-Kassette wird beim konventionellen *Gene targeting* aber auch oft verwendet, um Teile des Zielgens zu ersetzen und so die Expression des Gens zu verhindern.

3. Zielsetzung der Arbeit

Chondroitinsulfat-Proteoglykane sind Bestandteile der ECM und spielen eine wichtige Rolle bei Wachstumsprozessen und der Richtungsweisung von Neuronen im Nervensystem. Besonders nach Läsionen des ZNS werden CSPGs hochreguliert und sind hauptverantwortlich für die schlechte Regeneration der Nervenzellen. Dieser inhibitorische Effekt wird unter anderem von den mit Sulfatresten modifizierten Glykosaminoglykan-Seitenketten der CSPGs vermittelt. Kohlenhydrat-Sulfotransferasen katalysieren den Transfer der Sulfatreste an diese Proteoglykane. Um die Rolle dieser Sulfate in der Entwicklung und bei Regenerationsprozessen des Nervensystems zu untersuchen, bedient man sich Knockout-Mausmodellen, die für die zu untersuchende Sulfotransferase defizient sind.

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Analyse der kürzlich generierten CHST-14^{-/-} Maus. Die Auswirkungen des Fehlens der CHST-14 sollte in Bezug auf Verhalten und Regeneration des Rückenmarks nach Läsion untersucht werden.

Außerdem sollte auf Grundlage der homologen Rekombination in Bakterien, ein Zielvektor kloniert werden, der die Herstellung einer konditionellen CHST-12^{-/-} Maus ermöglicht.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit Tenascin-N. Für dieses Tenascin konnte gezeigt werden, dass es sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Tier in vielen Regionen und Organen mit Tenascin-C kolokalisiert. Eine mögliche Erklärung für den überraschend milden Phänotyp der TN-C^{-/-} Maus könnte sein, dass TN-N kompensatorisch wirkt und Aufgaben von TN-C übernimmt. Um dies genauer untersuchen zu können, sollte im Rahmen dieser Arbeit, auf Basis der homologen Rekombination, ein Zielvektor zur Herstellung einer TN-N^{-/-} Maus kloniert werden.

II. Material

1. Laborausrüstung

Allgemeines Labormaterial wurde bei Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Nunc (Roskilde, Dänemark) und Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg, Deutschland) bestellt.

Die Materialien für die Zellkultur wurden bei den Firmen Nunc (Roskilde, Dänemark) und Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland) bestellt.

2. Geräte

Zentrifugen wurden je nach Probenvolumen ausgewählt: Eppendorf Tischzentrifuge (Hamburg, Deutschland) 5415D und 5417R für Volumina < 2 ml, 5403 für Volumina < 50 ml und Sorvall Ultrazentrifuge RC 5C Plus (Langensfeld, Deutschland) für Volumina > 50 ml.

<i>Analysenwaage LC80 1P</i>	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
<i>Analysenfeinwaage PR1203</i>	Mettler Toledo (Schweiz)
<i>Brutschränke</i>	Nuaire (Plymouth, Maine, USA)
<i>Cryostat</i>	Leica (Bensheim, Deutschland)
<i>Geldokumentationssystem Easy. R.H.</i>	Herolab GmbH (Wiesloch, Deutschland)
<i>Gene Pulser® mit Pulse Controller</i>	Biorad (München, Deutschland)
<i>MOUSE-E-MOTION® Mikroprozessor</i>	INFRA-E-MOTION GmbH (Hamburg, Deutschland)
<i>Panasonic NV-DS12 Kamera</i>	Panasonic (Hamburg, Deutschland)
<i>PCR Maschinen MJ Research PTC-200</i>	Biorad (München, Deutschland)
<i>Phosphoimager TLA 3000</i>	Fuji Film (Japan)
<i>Photometer Biospec Mini</i>	Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg, Deutschland)
<i>Real-Time-PCR-Cycler 7900HT</i>	Biorad (München, Deutschland)

II. Material

<i>Spektrometer Untrospec 3000</i>	Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
<i>Sterilhood (SterilGard Class II)</i>	The Baker Company (Sanford, Maine, USA)
<i>Szintillationszähler Wallac 1409</i>	Wallac analyt. Dienstleistungs GmbH (Freiburg, Deutschland)
<i>UV-Crosslinker</i>	Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
<i>Videorekorder SVL-SE 830</i>	Sony (Köln, Deutschland)

3. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien in p.A. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deishofen, Deutschland).

4. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bei Metabion (München, Deutschland) bestellt. Alle verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet.

5. Enzyme

Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot; Deutschland) bezogen.

DNA Polymerasen

<i>AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>iProof™ High-Fidelity™ DNA Polymerase</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
<i>KOD XL DNA Polymerase</i>	Novagen/Merck Biosciences Ltd. (Nottingham, England)
<i>KOD HiFi DNA Polymerase</i>	Novagen/Merck Biosciences Ltd. (Nottingham, England)
<i>Pfu DNA Polymerase</i>	Promega (Mannheim, Deutschland)

II. Material

<i>Taq DNA Polymerase</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase</i>	Finnzymes (Espoo, Finnland)
<i>Taq DNA Polymerase</i>	ZMNH, Peggy Putthoff (Hamburg, Deutschland)
<u>Verschiedenes</u>	
<i>Chondroitinase ABC</i>	Seikagaku Corporation (Japan)
<i>Klenow-Enzyme</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<i>N-Glycosidase F, rekombinant</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<i>³²P Nukleotide</i>	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Deutschland)
<i>RNAse A</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<i>RNAse Out</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
<i>Superscript II Reverse Transkriptase</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>T4 DNA Ligase</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)
 6. Kits	
<i>DNA Ligation Kit (Mighty Mix)</i>	Takara Bio Inc. (Gennevilliers, Frankreich)
<i>GFX™ Micro Plasmid Prep Kit</i>	Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
<i>MiniElute™ Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>MiniElute™ PCR Purification Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>pGEM® -T Easy Vector System I</i>	Promega (Mannheim, Deutschland)
<i>QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>QIAquick™ Nucleotide RemovalKit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>QIAquick™ Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>QIAquick™ PCR Purification Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche (Mannheim, Deutschland)

II. Material

<i>Ready-To-Go DNA labelling beads (-dCTP)</i>	Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
<i>RNase-Free Dnase Set</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>Rneasy® Mini Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)

7. Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Firma
<i>α-Iba1</i>	Kaninchen	1:1000	Wako Chemicals GmbH (Neuss, Deutschland)
<i>α-Tyrosinhydroxylase</i>	Kaninchen	1:800	Chemicon, (Temecula, CA, USA)

8. Längenstandards

<i>Ready Load1 kb Plus DNA Ladder</i>	20 Banden von 100 bis 12000 bp; 8 Banden von 100 bp bis 1650 bp ab 100 bp in 1000 bp Schritten Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>100 bp DNA Ladder</i>	5 Banden von 100 bis 1500 bp in 100 bp Schritten und einem zusätzlichen 2072bp Fragment Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>1kb DNA Extension Ladder</i>	13 Banden von 1000 bis 40000 bp; von 1000 bis 8000 in 1000 bp Schritten mit einer zusätzlichen 1636 bp Bande; sowie Banden bei 10000, 15000, 20000 und 40000 bp Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

9. Vektoren und Plasmide

<u><i>pBlueScript II SK/KS</i></u>	Klonierungsvektor; T7 Promotor, mcs im LacZ Gen zur Blau-Weiss- Selektion Amp ^R	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
------------------------------------	---	---

II. Material

<u>pGEM[®]-T Easy</u>	TA Klonierungsvektor; T7 und SP6 Promotor, flankiert von mcs im lacZ Gen zur Blau-Weiß-Selektion Amp ^R	Promega (Mannheim, Deutschland)
<u>pML179</u>	enthält eine einzelne PmeI Restriktionsstelle, die vonI-SceI Restriktionsstelle flankiert ist, um DNA-Fragmente auszuschneiden. Cam ^R	Dr. Elledge, (Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA)
<u>pBCm1B8II</u>	8,18 kb Fragment des CHST-12 Locus, das homolog zu Exon 2 sowie 2523 Bp 5' von Exon 2 und 3960 Bp 3' von Exon 2 ist, im pBC SK+ Vektor Cam ^R	Peggy Putthoff (ZMNH, Hamburg, Deutschland)
<u>ploxP-tet-loxP</u>	loxP flankierte Tetrazyklin-Resistenzkassette Amp ^R und Tet ^R	Dr. Elledge, (Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA)
<u>pGEM-TE/pM3 neo-kan</u>	loxP flankierte Neomycin/Kanamycin Resistenzkassette, die 5' und 3' CHST-8 homologe Gensequenzen besitzt; im pGEM-TE Vektor	Dr. Nuray Akyüz (ZMNH Hamburg, Deutschland)
<u>pGEM-TE/M5 5'loxP tet</u>	pGEM-TE Vektor, enthält die Tetrazyklinsequenz, der 5' eine loxP Erkennungssequenz vorgeschaltet ist Amp ^R	Dr. Nuray Akyüz (ZMNH Hamburg, Deutschland)
<u>pGEM-TE/TNN</u>	370 Bp genomischer Bereich, der homolog zur Intronregion 3' von Exon 4 des TN-N Locus ist, im pGEM-TE Vektor Amp ^R	Dr. Nuray Akyüz (ZMNH Hamburg, Deutschland)

10. Verschiedenes

<i>Elektroporationsküvetten</i>	Biorad (München, Deutschland)
<i>Entellan</i>	Merck (Darmstadt, Deutschland)
<i>Geneticin (G418)</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

II. Material

<i>Hybond-X- Membran</i>	Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
<i>Pellet paint</i>	Novagen/Merck Biosciences Ltd. (Nottingham, England)
<i>Phase lock Gel Heavy, 1,5 ml</i>	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
<i>RNAse-freies Wasser</i>	Applied Biosystem (Darmstadt, Deutschland)
<i>Tissue TEK® O.C.T.</i>	Sakura Finetek (Zoeterwonde, Niederlande)
<i>Whatman-Filterpapier</i>	Whatman BIOMETRA (Göttingen, Deutschland)

11. Bakterienstämme und Zelllinien

<u><i>E. coli DH5</i></u>	α <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (-mk+), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , (<i>lacZYA-argFV169</i>), ϕ 80/ <i>lacZM15</i> , F ⁻	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<u><i>E. coli TOP-10</i></u>	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>araleu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<u><i>SCRN-10</i></u>	Δ <i>attB</i> -ParaBAD-I-Sce, <i>thi</i> Rif ^R , Δ <i>araBAD</i> _{AH33} , Δ (<i>lac-pro</i>) _{XIII} , F' <i>pro</i> ⁺ , <i>lacI33-lacZ</i> , +pML104 (P _{lac} Y β _{exo} Ts ori Sp ^R); wachsen in LB ^{Spec50} bei 0°3C	Dr. Elledge, (Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA)
<u><i>LE392</i></u>	F(-) <i>hsdR514</i> (r(-)k, m(-)k) <i>supE44</i> <i>supF58</i> <i>lacY1</i> <i>galK2</i> <i>galT22</i> <i>metB1</i> <i>trpR55</i> λ bd(-)	Dr. Elledge, (Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA)
<u><i>pML104/DH10β</i></u>	P _{lac} Y β _{exo} Ts ori Spec ^R in DH10 β Stamm; wachsen in LB ^{Spec50} bei 30°C	Dr. Elledge, (Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA)
<u><i>MEF-Zellen</i></u>	Maus Embryonale Fibroblasten isoliert aus einer C57black/6J neo transgenen Mauslinie (FV-Neo) am Embryonaltag14 (E.14)	Dr. Michael Boesl (ZMNH, Hamburg, Deutschland)

II. Material

IDG32 ES-Zellen Unveröffentlichte F1 Zelllinie (aus der F1- Generation 129SV x C57BL/6). Diese Zellen weisen im Gegensatz zu anderen embryonalen Stammzellen eine erhöhte Rekombinationseffizienz und eine erhöhte Keimbahngängigkeit auf Dr. Ralf Kühn (GSF, München, Deutschland)

12. Phagenbibliothek

λ ko2 Maus genomische Bibliothek amplifiziert in LE 392 Bakterien zur Herstellung siehe Zhang et. al 2002 Dr. Elledge, (Howard Hughes Medical Institute, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA)

13. Puffer und Lösungen

soweit nicht anders erwähnt, wurden diese mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

Anästhetikum 20% Ketanest® (25 mg/ml) (Pfizer, Karlsruhe, Deutschland)
8% Rompun® (2 % solution) (Bayer, Leverkusen, Deutschland)
in 0,9 % NaCl (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

Bostonpuffer 0,45% NP-40
0,45% Tween 20
0,1 mg/ml Proteinase K

Cacodylatpuffer (0,2M) 0,2 M Natrium Cacodylat
0,2 M HCl Lösung

Cresyl Violet-Lösung 0,5 g Cresyl Violet Acetat
in 100 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 8

Cresyl Violet-Differenzierungslösung 10% Chloroform
3 Tropfen Eisessig
ad 95% Ethanol

DNA-Probenpuffer 50% (v/v) Glycerol in TAE Puffer
100 mg/ml Orange G

dNTP Stocklösung (PCR) 20 mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Ethidiumbromid Färbelösung (DNA Gele) 10 μ g/ml Ethidiumbromid in 1xTAE (DNA-Gele)

II. Material

<i>Luxol Fast Blue Lösung</i>	0,1% Luxolechtblau 5 ml 10% Essigsäure in 96% Ethanol
<i>PBS 137mM NaCl</i>	2,7 mM KCl 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
<i>4% PFA</i>	40 g/l PFA 500 ml/l 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,3 mit 1 M NaOH
<i>Speed Hybridisierungspuffer (Southern Blot)</i>	7% SDS 10% PEG 6000 1,5 x SSPE (20x)
<i>SSPE (20 x)</i>	3 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,02 M EDTA
<i>Strip-Puffer (Western Blot)</i>	0.5 M NaCl 0.5 M Essigsäure
<i>50 x TAE</i>	M Tris-Acetat pH 8 100 mM EDTA
<i>10 x TE</i>	0,1 M Tris-HCl pH 7.5 10 mM EDTA
<i>5 x TBE</i>	0,5 mM Tris pH 8 0,5 M Borsäure 12,5 mM EDTA
<i>TBS</i>	50 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl
<i>TBST</i>	0.1 % Tween 20 in TBS
<i>TNE-Puffer</i>	25 mM Tris 150 mM NaCl 5 mM EDTA
<i>TFB I-Puffer</i>	30 mM K-Acetat 50 mM MnCl 100 mM RbCl 10 mM CaCl 15 % Glycerin 0,2 N HAc, pH 5,8

II. Material

<i>TFB II-Puffer</i>	10 mM Na-MOPS 75 mM CaCl 10 mM RbCl 15 % Glycerin, pH 7 mit NaOH
----------------------	---

14. Bakterienmedien

Die Medien wurden autoklaviert und vor Zugabe der Antibiotika auf unter 50°C abgekühlt.

Folgende Antibiotika wurden je nach Bedarf zugesetzt (1000-fache Stocklösungen): 100 mg/l Ampicillin (LB^{amp}), 25 mg/l Tetracyclin (LB^{tet}), 100 mg/l Spectinomycin (LB^{spec}), 25 mg/l Kanamycin (LB^{kan}) und 25 mg/ml Chloramphenicol (LB^{cam}). X-Gal (20 mg/l) wurde zur blau-weiss-Selektion zugegeben (LB^{XGal}).

<i>LB-Agar</i>	10 g/l Bacto-Trypton pH 7.4 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt 20 g/l Agar
<i>LB-Medium</i>	10 g/l Bacto-Trypton pH 7.4 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt
<i>SOB-Medium</i>	20 g/l Bacto-Trypton pH 7.4 0,5 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt → autoklavieren vor Gebrauch: 10 ml/l 1M MgCl ₂ 10 ml/l 1M MgSO ₄ → steril filtrieren
<i>SOC-Medium</i>	100ml SOB-Medium 2 ml 20% Glukose (filtersterilisiert) → steril filtrieren

15. Phagenmedien

Alle Medien wurden autoklaviert.

<i>λ-broth Medium</i>	10 g/l Bacto-Trypton pH 7.4 2,5 g/l NaCl
<i>λ-Agar</i>	10 g/l Bacto-Trypton pH 7.4 2,5 g/l NaCl 10 g/l Agar

II. Material

λ-Top-Agar 10 g/l Bacto-Trypton pH 7.4
2,5 g/l NaCl
7 g/l Agar

SM-Medium 5,8 g/l NaCl
2 g/l MgSO₄ * 7 H₂O
50 ml 1M Tris pH 7,5
0,01% Gelatine (Difco)

16. Zellkulturmedien

ES-Zellmedium Dulbecco's MEM (DMEM, 4.5 g/l D-Glucose, 25mM HEPES, 0.58 g/l L-glutamine, ohne Natriumpyruvat)
supplementiert mit
15 % (v/v) Fetal calf serum (FCS, ES quality, (PAA, Cölbe, Deutschland)
2 mM L-glutamine
1 × MEM non-essential amino acids
1 mM Natriumpyruvat
1 × Nucleoside mix (je 3 mM Adenosin, Cytidine, Guanosin, Uracil und Thymidin in PBS)
0.1 mM 2-Mercaptoethanol
50 U/ml Penicillin
1,000 U/ml ESGRO™ LIF (Murine leukemia inhibitory factor; (Chemicon, Temecula, CA, USA)

ES-Zell-Selektionsmedium ES-Zellmedium supplementiert mit
200-300 µg/ml G418 (Geneticin; Invitrogen)

2x ES-Zell-Einfriermedium 80% FCS
20% DMSO
(1:1 mit Zellsuspension mischen)

MEF-Medium DMEM (4.5 g/l D-Glucose, mit Glutamax™ I, ohne Pyruvate)
supplementiert mit
9 % FCS
1 × MEM non-essential amino acids
50 U/ml Penicillin

PBS/EDTA 0,1 g EDTA x 4Na in 1 x PBS

II. Material

17. Mauslinien

Durch Manipulation der ES-Zellen (129SvJ) wurde der CHST-14-Genlocus so verändert, dass die CHST-14-Gensequenz im Bereich der Positionen -30 bis +2576 (bezogen auf den Translationsstart) durch eine einzelne loxP-Erkennungssequenz und ein dsRed-express-Gen mit Polyadenylierungssignal ersetzt wurde. Dadurch wurde erreicht, dass kein funktionelles CHST-14-Protein gebildet wird und das dsRed-express-Gen unter der Kontrolle des endogenen CHST-14-Promotors exprimiert wird. Die Deletion im CHST-14-Genlocus wurde indirekt über Southern- und Northern-Blot-Analysen bestätigt.

Die Linie M5-CB2-KO wurde einmal, die Linie M5-CB2-KO/F zweimal auf C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt (Akyüz, Schachner, unveröffentlicht).

18. verwendete Software

ABI PRISM SDS 2.1 Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)	Analyse der Real Time Rohdaten
VirtualDub Software (frei zugängliche Software; erhältlich unter http://virtualdub.org)	Analyse der funktionellen Regeneration nach Rückenmarkläsion
Image Tool 2.0 Software (University of Texas, San Antonio, TX; http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/)	Analyse der funktionellen Regeneration nach Rückenmarkläsion
EthoVision (Noldus, Wageningen, Niederlande)	Analyse der Verhaltensdaten
The Observer Programmes (Noldus, Wageningen, Niederlande)	Analyse der Verhaltensdaten
GraphPad Prism 3.0	Statistik
NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Sequenzanalyse und Literaturrecherche

III. Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (DH5 α ; TOP10)

(Inoue et al., 1990)

Eine Bakterienkolonie wurde auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde von einem Klon eine 10 ml ÜN-Kultur in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. 1 ml dieser ÜN-Kultur wurden mit 100 ml LB-Medium versetzt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,3-0,4 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gekühlt, anschließend 5 min bei 5000 upm und 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 30 ml TFB I-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und erneut 5 min bei 5000 upm und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 4 ml TFB II-Puffer resuspendiert, erneut 10 min auf Eis inkubiert und anschließend in 100 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien (pML104/DH10 β)

Eine Bakterienkolonie wurde auf einer LB^{spec25}-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde von einem Klon eine 5 ml ÜN-Kultur in LB^{spec25}-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C kultiviert. 2,5 ml dieser ÜN-Kultur wurden mit 500 ml LB^{spec50/0,4mIPTG}-Medium versetzt und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,3–0,4 kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gekühlt, anschließend 20 min bei 4200 upm abzentrifugiert, das Pellet 2 x mit 500 ml eiskaltem Wasser gewaschen und 20 min bei 4200 upm abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 40 ml eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pelletvolumen wurde geschätzt, im gleichen Volumen eiskaltem 10% Glycerol resuspendiert und in 50 μ l Aliquots bei -80°C eingefroren.

III. Methoden

1.3 Erhaltung von Bakterienstämmen (Glycerol-Stock)

Ausgewählte Bakterienstämme wurden in Flüssigkultur (OD_{600} 0,5-0,6) 1:1 mit 100% Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

1.4 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

100 μl Bakteriensuspension wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA (10 μg -10 ng) oder einem Ligationsansatz (50 ng Vektor-DNA) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C wurden 500 μl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde, bei einer für die Bakterien optimalen Temperatur, geschüttelt. 100 μl Transformationsansatz wurden auf eine, der restliche Ansatz auf eine zweite LB-Agar-Platte (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei der für die Bakterien optimalen Temperatur kultiviert.

1.5 Elektroporation kompetenter Bakterien

50 μl elektrokompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 1 μl Plasmid-DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt und vorsichtig gemischt. Die Bakterienlösung wurde luftblasenfrei in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Küvette sorgfältig getrocknet. Anschließend wurde die Küvette in den Elektroporationsapparat eingesetzt und ein elektrischer Impuls von 2,5 kV, 25 μF (Pulskontroller 200-400 Ohm) ausgelöst, bis ein Signalton ertönte. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem SOC-Medium und einstündiger Inkubation bei einer für die Bakterien optimalen Temperatur, wurden je 100 μl und der restliche Ansatz auf LB-Agar-Platten (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei der für die Bakterien optimalen Temperatur kultiviert.

1.6 Plasmidisolierung aus 1,5 ml *E. coli* Bakterienkulturen

(GFX Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Biosciences)

2 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien 1 min bei 13000 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 μl Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 150 μl Lösung II und 10-15maliges Invertieren lysiert. Das Lysat wurde durch Zugabe von 300 μl Lösung III (10-15 x invertieren) neutralisiert. Anschließend wurde der Ansatz 5 min zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu präzipitieren. Der Überstand wurde auf eine GFX-Säule pipettiert, 1 min bei 13000 upm zentrifugiert, der Durchlauf

III. Methoden

verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl PE-Puffer gewaschen. Nach einminütiger Zentrifugation wurde der Durchlauf wieder verworfen und die Säule erneut für 1 min zentrifugiert, um alle Ethanolrückstände zu entfernen. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 50 µl TE-Puffer in die Mitte der Säule pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei RT wurde die Säule 1 Minute zentrifugiert, um die Plasmid-DNA zu eluieren.

1.7 Plasmidisolierung aus 200 ml *E. coli* Bakterienkulturen

(Plasmid Maxi Kit, Qiagen)

Zur Isolierung großer Mengen DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet.

200 ml Übernachtskultur (mit entsprechendem Antibiotika versetzt) wurde durch Zentrifugation bei 6000 upm für 15 min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml Resuspensionspuffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml Puffer P2, fünfmaligen Invertieren und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde 10 ml Neutralisationspuffer P3 zupipettiert, 6 x invertiert und das Lysat in eine QIAfilter Spritze, die unten verschlossen wurde, überführt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde der Überstand auf eine Qiagen Säule gespritzt, die vorher mit 10 ml Puffer-QBT äquilibriert wurde. Nachdem die Lösung durchgelaufen war, wurde zweimal mit jeweils 30 ml Puffer-QC gewaschen, und die DNA mit 15 ml Puffer-QF in ein 30 ml Corex-Glasröhrchen eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und anschließender 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10000 x g gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (10000 x g; 15 min; 4°C) in 100-300 µl TE-Puffer gelöst.

1.8 Restriktionsverdau von DNA

(Sambrook et al., 1989)

Für die Reaktionen wurden die vom Enzym-Hersteller empfohlenen Puffer benutzt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen, wurden die vom Hersteller vorgeschlagenen Pufferbedingungen gewählt. Bei Inkompatibilität wurde ein sequentieller Verdau durchgeführt und das zuerst eingesetzte Enzym durch Hitze (20 min bei 65°C) inaktiviert. Das Volumen der eingesetzten Enzymlösung betrug maximal 1/10 des Gesamtrestriktionsvolumens.

Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden 50-500 ng DNA mit 1 µl 10 x Restriktionspuffer, 1 µl 10 x BSA und 1-5 U Enzym in einem Gesamtrestriktionsansatz von 10 µl vereint, bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 30-60 min inkubiert und die Fragmente gelelektrophoretisch analysiert (vgl. 1.14).

III. Methoden

Für einen präparativen Restriktionsansatz wurden 1-7 µg DNA mit 5-20 U Enzym und dem Gesamtvolumen von 30-50 µl entsprechenden Mengen 10 x Puffer und 10 x BSA versetzt. Der Restriktionsansatz wurde bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 2-3 Stunden inkubiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung (vgl. 1.14) aus dem Gel eluiert (vgl. 1.15).

1.9 Dephosphorylierung freier DNA-Enden

(Sambrook et al., 1989)

Um die Religation eines Vektors zu verhindern, wurden die freien 5'-Phosphatgruppen linearisierter Plasmid-DNA mit Hilfe alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline Phosphatase*, SAP) entfernt.

Hierzu wurden 50 ng DNA mit 10 x SAP-Puffer und 1 U alkalischer Phosphatase versetzt. Glatte DNA-Enden wurden anschließend für 30 min, überhängende DNA-Enden für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde für 15 min bei 65°C inaktiviert und die dephosphorylierte DNA in der Ligation (vgl. 1.12) eingesetzt.

1.10 poly-Adenylierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte mit glatten Enden wurden poly-adenyliert, bevor sie für die Ligation im pGEM-T Easy-System (Promega) eingesetzt wurden. Die PCR-Produkte wurden über eine Qiagen-Säule aufgereinigt (vgl. 1.13). 7 µl gereinigtes PCR-Produkt (300-500 ng) wurden mit 1 µl 10 x Taq-Puffer, 1 µl dATP (2 mM), 0,3 µl 50 mM MgCl₂ und 1 µl Taq-DNA-Polymerase versetzt. Der Ansatz wurde bei 70°C für 30 min inkubiert und anschließend direkt für die Ligation (vgl. 1.12) eingesetzt.

1.11 Glätten überhängender DNA-Enden

(Sambrook et al., 1989)

Nichtkompatible 5'-überhängende DNA-Enden wurden vor einer Ligation mit Hilfe von Klenow-Enzym aufgefüllt. Hierzu wurden die über eine Säule aufgereinigten DNA-Fragmente (vgl. 1.13) mit 10 x Klenow-Puffer, 125 µM dNTPs (each) und 1 U Klenow-Enzym versetzt und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 15minütiger Inaktivierung des Enzyms bei 65°C konnte der Ansatz direkt für die Ligation (vgl. 1.12) verwendet werden.

1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

(Sambrook et al., 1989)

Ligationen wurden entweder mittels T4-DNA-Ligase (Roche), dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) oder mit dem pGEM-T Easy Kit (Promega) durchgeführt.

In einem 10 µl Ligationsansatz wurden 50 ng dephosphorylierte Vektor-DNA mit dem 5-10fachen molaren Überschuss an Insert-DNA, 1 µl 10 x T4 Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ansatz wurde entweder für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Bei Benutzung des Rapid DNA Ligation Kits wurden Insert und Plasmid im molaren Verhältnis 3:1-10:1 eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers 5-15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei Verwendung des pGEM-T-Easy-Systems (Promega) wurde 1 µl (50 ng) pGEM-T-Easy-Vektor im molaren Verhältnis 1:1-1:8 mit dem PCR-Fragment nach Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 10 µl angesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

5 µl der Ligationsansätze wurden im Anschluss direkt für die Transformation (vgl. 1.4) eingesetzt.

1.13 Aufreinigung von PCR-Produkten

(MiniElute™ PCR Purification Kit, Qiagen)

Der PCR-Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen PB-Puffer und mit dem einfachen Volumen Isopropanol versetzt, anschließend auf ein QIAQuick-Säulchen überführt und 1 Minute bei 13000 upm zentrifugiert. Die auf der Säule gebundene DNA wurde mit 500 µl PE-Puffer gewaschen, zentrifugiert und nachdem der Durchlauf verworfen wurde, erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 30 µl TE-Puffer oder H₂O in die Mitte der Säule pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (1 min, 13.000 x g, RT) eluiert.

1.14 Gelelektrophorese von DNA

(Sambrook et al., 1989)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele in 1 x TAE-Puffer gefahren. Je nach Fragmentgrößen wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Die DNA wurde mit der entsprechenden Menge 5 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein angemessener Längenstandard mit aufgetragen. Je nach Anwendung und Gelgröße wurde die Elektrophorese bei 80-120 Volt durchgeführt. Die Laufzeit wurde entsprechend der erwarteten DNA-Fragmente angepasst.

III. Methoden

Anschließend wurden die Gele 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in 1 x TAE-Puffer) gefärbt und die DNA-Banden mit Hilfe eines Dokumentationssystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB) unter UV-Licht sichtbar gemacht und photographiert.

1.15 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

(MiniElute™ Gel Extraction Kit, Qiagen)

Nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung (vgl. 1.14) wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht (360 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wurde bei 50°C in dreifachen Volumen Gelsolubilisierungspuffer-QG für 10 min aufgelöst, anschließend mit einfachem Volumen Isopropanol versetzt und auf eine MinElute-Säule pipettiert. Die Säule wurde bei RT bei 13000 upm für 1 Minute zentrifugiert und mit 700 µl PE-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen und der restliche Puffer durch erneute Zentrifugation (1 Minute, 13000 upm, RT) entfernt. Die Säule wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 30 µl TE-Puffer in die Mitte pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (1 min, 13000 upm, RT) eluiert.

1.16 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die Präparationen wurden mit dem einfachen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Gemisches (25:24:1) versetzt und gevortext. Das Gemisch wurde 5 min bei 13000 upm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe des einfachen Volumens Chloroform wurde erneut 5 min zentrifugiert und die obere Phase wieder in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Es wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (bei genomischer DNA 1/10 Volumen 3 M LiCl₂) und das 2,5fache Volumen Ethanol (abs.) zupipettiert, gut gemischt und der Ansatz 30 min bis über Nacht bei -20°C gefällt. Genomische DNA wurde 1 h bei 4°C gefällt. Anschließend wurde 30 min bei 13000 upm zentrifugiert und das DNA-Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 upm wurde die DNA getrocknet und in angemessenem Volumen TE-Puffer oder H₂O gelöst.

1.17 DNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration

(Sambrook et al., 1989)

Die Reinheit und Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. Die DNA-Lösung wurde je nach Bedarf 1:50-1:200 in Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) gegen Wasser als Referenz bestimmt. Für doppelsträngige DNA gilt folgender Richtwert:

$OD_{260} \times 0,05 \times \text{Verdünnung}$ entspricht der DNA Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Ein Quotient von OD_{260} zu OD_{280} von 1,8 zeigt an, dass die isolierte DNA frei von Proteinen ist.

1.18 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte in der Sequenzierabteilung des ZMNH. Hierzu wurde 0,6-1 μg DNA in 6 μl ddH₂O oder Tris (pH 8) gelöst, mit 2 μl des entsprechenden Sequenzierprimers (5 pM) versetzt und an die Sequenzierabteilung weitergegeben.

1.19 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis et al., 1986)

Die Amplifikation von DNA wurde in 50 μl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurden die folgenden Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert und die DNA je nach Anwendung entweder mit Hilfe von *Taq DNA Polymerase* (Life Technologies), *Pfu Turbo DNA Polymerase* (Stratagene) oder *Phusion Hot Start DNA Polymerase* (Finnzymes) vervielfältigt.

Ansatz:

x μl DNA (5-10 ng)

5 μl Primer 1 (5 pM)

5 μl Primer 2 (5 pM)

5 μl dNTPs (je 2 mM)

5 μl PCR-Puffer (10fach)

0,5-2,5 U Polymerase

ddH₂O auf 50 μl

Temperatur-Programm:

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte entsprechend der verwendeten Polymerase nach folgendem reaktionsspezifischen Temperaturprofil:

III. Methoden

- | | |
|-------------------------|---|
| 1.) 94-98°C | 30 sec-5 min |
| 2.) 94-98°C | 30 sec (Denaturierung des Doppelstranges) |
| 3.) X°C | 30 sec-1 min (Hybridisierungs-Temperatur der Primer) |
| 4.) 68-72°C | 30 sec-1 min/1000 Basenpaare des Amplikons (Verlängerung) |
| 5.) zurück zu Schritt 2 | 25-35 Zyklen |
| 6.) 68-72°C | 10 min (Auffüllung) |
| 7.) 4°C | (Kühlung) |

Bei Verwendung von Primern mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen (T_m) wurde die PCR bei der niedrigeren $T_{m-5^\circ\text{C}}$ durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (vgl. 1.14) und entweder per Gelelektion (vgl. 1.15) oder mit Hilfe eines PCR-Aufreinigungskits (vgl. 1.13) isoliert.

1.20 Verschachtelte Polymerase-Kettenreaktion (*nested PCR*)

Mit Hilfe verschachtelter Polymerase-Kettenreaktionen können Ausbeute und Spezifität von Standard-Polymerase-Kettenreaktionen erhöht werden. Dazu führt man zwei aufeinander folgende Amplifikationen durch, wobei das PCR-Produkt der ersten Reaktion als Template für die zweite PCR eingesetzt wird. Das Primerpaar der zweiten PCR (innere Primer) liegt dabei zwischen den Primern der ersten Reaktion (äußere Primer), wodurch falsche Amplifikationen der ersten PCR ausgesondert werden.

Es wurde eine Standard-PCR mit den außenliegenden Primern durchgeführt. Anschließend setzte man 1/10 des ersten Reaktionsansatzes als Template-DNA für eine zweite Standard-PCR mit den innenliegenden Primern ein.

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (vgl. 1.14) und per Gelelektion (vgl. 1.15) isoliert.

1.21 Genotypisierung mittels PCR (*multiplex PCR*)

Um zwischen verschiedenen Genotypen der Mäuse unterscheiden zu können, wurden Schwanzbiopsien (ca. 0,2-0,5 cm) genommen und diese ÜN bei 55°C in 100 µl Boston-Puffer verdaut.

1 µl genomische DNA wurde für eine Standard-PCR (vgl. 1.19) eingesetzt. Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass sie die mutierte Region flankieren, wodurch man nach Gelelektrophorese unterschiedlich große PCR-Produkte für KO und wt, sowie eine Doppelbande für den heterozygoten Genotyp nachweisen konnte.

1.22 Southern-Blot-Analyse

(Southern et al. 1975)

Mit Hilfe der Southern-Blot-Analyse kann man aus einem komplexen DNA-Gemisch, nach Verdau mit spezifischen Restriktionsendonukleasen, eine ganz bestimmte DNA-Sequenz ermitteln. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um die Veränderung eines bestimmten Locus in ES-Zellen nach homologer oder Cre-induzierter Rekombination zu analysieren.

Von jedem zu analysierenden ES-Zellklon wurde die genomische DNA isoliert und gefällt (vgl. 1.16). 10 µg genomische DNA wurden mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease (50 U) über Nacht geschnitten und in einem 0,8%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in EtBr gefärbt und um die Auftrennung der DNA zu dokumentieren, mit einem Lineal photographiert. Die DNA wurde im Gel 10 min in 0,25 M HCl bei Raumtemperatur depurinieren, dann 30 min in 0,4 M NaOH denaturiert. Anschließend wurde die DNA mittels der Kapillarblotmethode über Nacht an eine Hybond-XL-Membran gebunden. Zum Aufbau des Blots vgl. Abb. 3.1.

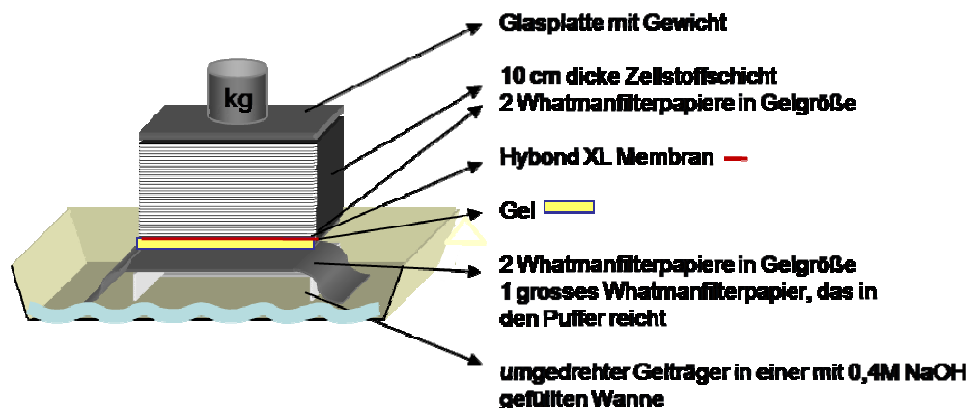


Abb. 3.1. Schematischer Aufbau des Southern-Blots.

Die Membran wurde am nächsten Morgen für 90 sec bei $700 \times 100 \text{ mJ/cm}^2$ im UV Crosslinker gebacken und anschließend mindestens zwei Stunden bei 60°C in 20 ml Hybridisierungspuffer vorhybridisiert. Die genomische DNA wurde über Nacht mit einer radioaktiv markierten Sonde (vgl. 1.23) in 20 ml Hybridisierungspuffer bei $60\text{--}68^\circ\text{C}$ hybridisiert. Nicht hybridisierte Sonde wurde durch mehrere Waschschrte bei $60\text{--}68^\circ\text{C}$ ($2 \times 5 \text{ min}$ in $2 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$; $2 \times 10 \text{ min}$ in $1 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$; $2 \times 10 \text{ min}$ in $0,5 \times \text{SSC}/0,1\% \text{ SDS}$) entfernt, bis die Radioaktivität der Membran bei unter 100 cpm lag.

Um das Signal zu detektieren, wurde zwei Stunden bis ÜN eine Phosphoimager-Platte belichtet und anschließend im Phosphoimager (TLA 3000 Fuji Film, Japan) ausgewertet.

1.23 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit [³²P]dCTP

Zur radioaktiven Markierung der DNA-Sonden wurden Ready-To-Go DNA-Labeling-Beads -CTP von GE Healthcare (UK) verwendet.

Die Sonden-DNA wurde über PCR amplifiziert (vgl. 1.19), über ein präparatives Gel aufgereinigt (vgl. 1.15) und mit PCI gefällt (vgl. 1.16). 30 ng dieser Sonden-DNA wurden mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe eines Ready-To-Go DNA-Labeling-Beads und 50 µCi [³²P] dCTP wurde der Ansatz sorgfältig resuspendiert und 10 min bei 30°C inkubiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit einem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers entfernt und die markierte Sonde in 100 µl Elutionspuffer eluiert.

Die Markierungseffizienz wurde nach der Cerenkov-Methode mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Wallac analyt. Dienstleistungs-GmbH; Freiburg, Deutschland) bestimmt und lag zwischen 2x10⁴ und 1x10⁶ cpm/µl. Es wurde der gesamte Sonden-Ansatz für die Hybridisierungsreaktion im Southern-Blot (vgl. 1.22) verwendet.

1.24 RNA Isolierung aus Geweben

50-100 mg gefrorenes Gewebe wurden mit 1 ml Trizol (Invitrogen) versetzt und mit einem Homogenisator sorgfältig zerkleinert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform/1 ml Trizol zugegeben, der Ansatz gevortext, 2-3 Minuten bei RT inkubiert und 15 min bei 11000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol/1 ml Trizol versetzt, gevortext, 10 min bei RT inkubiert und 10 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet direkt in 100 µl RNase freiem H₂O (Ambion) gelöst. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

1.25 RNA Aufreinigung

(RNeasy Mini Kit, QIAGEN)

100 µl RNA wurden mit 350 µl Puffer-RLT gemischt, 250 µl 100% Ethanol zugegeben, der Ansatz durch auf- und abpipettieren gemischt und auf eine RNeasy Mini Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation bei 11000 upm für 30 sec wurde der Durchlauf verworfen und die an die Säule gebundene DNA in der Säule verdaut. Hierfür wurden 10 µl DNase-Stock (30 U) mit 70 µl RDD-Puffer gemischt und auf die Silica-Membran der Säule pipettiert, die zuvor einmal mit 350 µl Puffer-RW1 gewaschen wurde. Der DNase-Verdau wurde nach 15 min durch Zugabe von 350 µl Puffer-RW1 gestoppt und der Ansatz bei 11000 upm für 30 sec zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 µl RPE-Puffer

III. Methoden

gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde für 2 min bei 11000 upm zentrifugiert, um die Säulenmembran vollständig zu trocknen. Die Säule wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA mit 30-50 µl RNase freiem Wasser, nach einminütiger Inkubation bei RT, durch Zentrifugation bei 11000 upm für 1 min eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde das Eluat erneut auf die Säule aufgetragen, 1 min bei RT inkubiert und nochmals zentrifugiert. Nach Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung (vgl. 1.26), wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

1.26 RNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration

(Sambrook et al., 1989)

Die Reinheit und Konzentration von RNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. Die RNA-Lösung wurde je nach Bedarf 1:10-1:100 in Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) gegen Wasser als Referenz bestimmt. Für RNA gilt folgender Richtwert:

$OD_{260} \times 0,04 \times \text{Verdünnung}$ entspricht der RNA-Konzentration in µg/µl. Ein Quotient von OD_{260} zu OD_{280} von 1,9 zeigt an, dass die isolierte RNA frei von Proteinen ist.

1.27 Reverse Transkription

Die reverse Transkriptase (RT) besitzt drei unterschiedliche enzymatische Funktionen. Sie kann als RNA-abhängige DNA Polymerase und als DNA-abhängige DNA Polymerase fungieren, außerdem besitzt sie eine DNA-RNA-Hybrid-abhängige Exoribonukleaseaktivität. Die reverse Transkriptase kommt in Retroviren vor, wo die Kombination dieser drei Funktionen die retrovirale Infektion durch die Transkription einzelsträngiger RNA in doppelsträngige DNA ermöglicht.

Zur reversen Transkription *in vitro* macht man sich die RNA-abhängige DNA Polymerase Aktivität sowie die Hybrid-abhängige Exoribonukleaseaktivität zunutze.

Für die Erststrangsynthese wurde die gereinigte mRNA mit Hilfe der RNase H defizienten SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) in cDNA transkribiert. Hierfür wurden 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM) und 1 µl *random Hexamere* (100 pmol/µl) mit 0,5-5 µg RNA durch Erhitzen auf 65°C für 5 min und Abkühlen auf 4°C hybridisiert. Nach Zugabe von 2 µl DTT (0,1 M), 4 µl 5 x SSII-Puffer und 1 µl RNase Out (Invitrogen) wurde der Ansatz für 2 min bei 25°C inkubiert, 1 µl SuperScript II Reverse-Transcriptase (Invitrogen) zupipettiert und weitere 10 min bei 25°C inkubiert, bevor die Erststrangsynthese bei 42°C für 50 min folgte. Anschließend wurde die Reaktion durch 15minütige Inkubation bei 70°C abgestoppt und bei -20°C gelagert.

1.28 Semiquantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Dies ist eine Methode zum Vergleich der relativen Expressionslevel eines Gens in unterschiedlichen Geweben. Mit der cDNA des zu untersuchenden Gens wird gleichzeitig die cDNA eines konstitutiv exprimierten Haushaltsgens wie HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoryltransferase), β -Aktin, GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) oder RPII (RNA Polymerase II), amplifiziert.

Die eigentliche PCR-Reaktion verläuft wie bei der qualitativen PCR, mit dem Unterschied, dass dem Reaktionsansatz aus cDNA und PCR-Reagenzien ein an die DNA bindender Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen® (Anregungswellenlänge: 470 nm; Emissionswellenlänge: 585 nm) zugesetzt wird. Dieser besitzt im ungebundenen Zustand eine geringe Eigenfluoreszenz, die durch die Bindung an die kleine Furche doppelsträngiger DNA-Moleküle (dsDNA) deutlich erhöht wird. Die Fluoreszenz korreliert hierbei mit der Menge an dsDNA. Diese Fluoreszenz wird während des gesamten PCR-Verlaufs parallel im Cycler gemessen. Bei der späteren Auswertung (siehe unten) macht man sich den Effekt zunutze, dass die Anzahl der benötigten PCR-Zyklen bis zum Erreichen eines bestimmten Fluoreszenzintensitätssignals, mit der Anfangskonzentration korreliert. Um unterscheiden zu können, ob das Fluoreszenzsignal durch eine spezifische oder eine unspezifische Amplifikation entstanden ist, werden die Dissoziationstemperaturen verglichen. Diese ist für jedes Amplikon spezifisch. Zur Bestimmung der Dissoziationskurve, bzw. der Dissoziationstemperatur, wird die Temperatur des Reaktionsansatzes mit einer geringen Heizrate von 60°C auf 95°C erhitzt und parallel wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Kommt es zum temperaturabhängigen Aufschmelzen der Doppelstränge nimmt das Fluoreszenzsignal ab. Durch die Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur erhält man die Schmelzkurve. Trägt man die erste Ableitung der Fluoreszenzsignalintensität gegen die Temperatur auf, kann man für jedes Amplifikat, am Peak der Schmelzkurve eine spezifische Temperatur ermitteln. Treten zusätzliche Peaks auf, lässt dies auf unspezifische Nebenprodukte schließen. Für jedes Primerpaar wurde deshalb eine PCR durchgeführt, die kein Template enthielt, um Rückschlüsse auf eventuelle Primerdimerbildungen des entsprechenden Primerpaares zu erhalten.

Zusätzlich wurde für jede cDNA eine -RT-Kontrollmessung durchgeführt. Dies ist erforderlich, wenn die Primer einer PCR nicht über einer Exon-Intron-Exon-Grenze liegen, sondern innerhalb eines Exons. In diesem Falle kann nicht zwischen cDNA und genomischer DNA unterschieden werden. Da die -RT-Kontrolle keine cDNA enthält, wird der C_T -Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") während einer PCR demnach nur durch eventuelle genomische DNA-Kontaminationen und eventuelle Primerdimere hervorgerufen. Unterscheiden sich der -RT- C_T -Wert und cDNA C_T -Wert ausreichend, d.h., um mindestens fünf Zyklen, kann die Probe für die eigentlichen Messungen herangezogen werden.

III. Methoden

Zur Überprüfung der Spezifität einer Real-Time-PCR, wurde das Amplikon jedes Primerpaares sequenziert (vgl. 1.18).

Durchführung

Für die Real-Time-PCR wurde in den meisten Fällen 0,025 µg RNA pro Ansatz in cDNA umgesetzt und alle Ansätze wurden als Triplikate gemessen. Für die PCR wurde ein Komponentenkit (qPCR Core Kit, Eurogentec), das bis auf die Primer, Wasser und das Template alle notwendigen Bestandteile enthielt, benutzt. Für 20 µl Ansätze wurden die folgenden Komponenten zusammen pipettiert:

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i>	<i>Endkonzentration</i>
10x Reaktionspuffer	2,0 µl	1 x
50 mM MgCl ₂	1,4 µl	3,5 mM
5 mM dNTPs	0,8 µl	200,0 µM
Enzym	0,1 µl	0,025 U/µl
Wasser	12,1 µl	-
SYBRGreen	0,6 µl	
Primerpaar	2,0 µl	jeder Primer 0,005 µM
Template	1,0 µl	0,025 µg RNA nach RT

Die PCR wurde in einer 96-Lochplatte (Sarstedt) angesetzt. Im Anschluss wurde die Platte mit einer lichtdurchlässigen Folie verschlossen. Die Real-Time-PCR wurde im Cycler 7900HT von Applied Biosystems durchgeführt. Um Fehler, die durch Pipettierfehler oder durch Unterschiede im Reaktionsvolumen entstehen sowie Unterschiede des Fluoreszenzsignales durch gerätebedingte Variationen zu eliminieren, enthält der Puffer des SYBRGreen Kits einen Fluoreszenzfarbstoff (ROX), dessen Intensität sich nicht verändert und in allen Wells gleich sein sollte. Die Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten in den verschiedenen Wells werden auf die Fluoreszenz des Detektionsfarbstoffes durch die Applied Biosystemsoftware berücksichtigt.

Das Temperaturprogramm für die Real-Time-PCR wurde entsprechend der Vorschrift von Applied Biosystems gewählt.

III. Methoden

Schritt	Dauer	Temperatur	Wiederholungen
Aktivierung	2 min	50°C	1 x
Polymeraseaktivierung	10 min	95 C	1 x
Strangtrennung	15 sec	95°C	1 45 x
Anlagerung und Verlängerung	1 min	60°C	1
Dissoziationskurve*	-	60-95°C	1 x

*Die Dissoziation erfolgt mit 2 % der maximalen Heizrate

Gen	vorwärts Primer	rückwärts Primer
β-Actin	TCCTGTGGCATCCATGAAACT	TTCTGCATCCTGTCAGCAATG
GAPDH	CCAGCCTCGTCCCGTAGACAAA	TGGCAACAATCTCCACTTTGCCA
HNK1-ST1	CTGACGACCATGCCGGAAGCA	TGCAGGTGTTTCTAATGAGCTCCA
HPRT	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGA	TCCCCGTTGACTGATCATTACA
Chst12	GCCCCAGCAAGCCAGTCTTG	AGGCTGGCGTTGGCACAGAAGT
Chst11	TCATGCGGAGGAACCCCTTCG	CCCGGCAGGTGTCTGTACCT
Chst8	CGTCCATCCTGCTGTTTGGAGCT	TCTGTGGATATCCTCAAGTGGCTA
Chst9	AGCTTACAGATCAACTGAAGCACA	GCTTCTCTTGGGTTGCATCTGCT
D4ST1	GCATTACCACTTGTGCAATGTTCCA	GGTGACAGGCTTCCTTGGTGACA
Chst13	GTGTTGGGTGCAATAGAGCCAGT	GTACCCTACCCAGTCGGAATGAG
RPII	CCAATGATATTGTGGAGATCTTCAC	GGCATGTCATAGTGCACACAGGA

Tabelle 3.1: Aufstellung der für die qRT-PCR verwendeten Primersequenzen.

Die Daten wurden durch das ABI PRISM 7900 Sequence-Detection-System erhoben. Die Datenauswertung erfolgte durch die ABI PRISM SDS 2.1 Software.

Die relative Quantifizierung der Genexpression benötigt die Quantifizierung von zwei unterschiedlichen Genen, eines Targets und einer natürlichen Kontrolle. Die Kontrolle ist erforderlich, um Schwankungen der cDNA-Ausgangsmenge, die durch Pipettierfehler oder unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkription begründet sind, auszugleichen (Normalisieren). Als Kontrolle dienten vier endogene Haushaltsge, die in konstanter aber nicht notwendigerweise bekannter Konzentration vorlagen. Gemessen werden die Fluoreszenzintensitäten die als R_n bzw. ΔR_n ausgegeben werden. R_n ist der Quotient aus der emittierten Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs und einer passiven Referenz. ΔR_n ergibt sich durch Subtraktion des Baselinefluoreszenzsignals von R_n . Das Baselinefluoreszenzsignal ergibt sich aus den mittleren Fluoreszenzsignalen der manuell festgelegten anfänglichen Zyklen der PCR.

III. Methoden

Die Auswertungen basieren auf den C_T -Werten, die für jedes Amplifikat bestimmt werden. Der C_T -Wert ist die Anzahl der Zyklen die benötigt werden, bis das Fluoreszenzsignal eines Reaktionsansatzes einen festgelegten Schwellenwert (*Threshold*) erreicht. Dieser muss oberhalb der Baseline aber ausreichend tief gelegt werden, um innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve zu liegen. Der Schwellenwert betrug für alle Auswertungen $0,2 \Delta R_n$.

Relative Standardkurven-Methode

Durch die relative Standardkurven-Methode lässt sich das Expressionsverhältnis eines Transkripts zwischen Probe und Referenz berechnen (z.B. zwischen +/+ und -/-). Nach jedem PCR-Zyklus kommt es zu einem Anstieg der Amplikonmenge, der abhängig ist von der Effizienz (E) der PCR.

Pro Gen wurde durch qRT-PCR ein C_T -Wert bestimmt. Da jeder Ansatz als Triplikat zusammen pipettiert wurde, wurde zuerst aus allen Triplikaten ein Mittelwert gebildet und dieser im Folgenden als C_T -Wert für das jeweilige Gen behandelt. Für die Normalisierung wurden die individuellen C_T -Werte pro Referenzgen gemittelt und die Differenz der individuellen C_T -Werte des Referenzgens zu diesem Mittelwert gebildet (ΔC_{TR}).

Da sich bei einer PCR die Menge der DNA nicht bei jedem Zyklus verdoppelt, sondern die Effizienz bei 1,7-1,9 liegt, muss die Effizienz der PCR für das jeweilige Gen aus einer für das jeweilige Gen erarbeiteten Kallibrierungsformel, ($y = ax + b$) ermittelt werden, wobei die Steigung als a definiert ist. Die Kallibrierungsformeln für die in dieser Arbeit untersuchten Gene sind in Tab. 3.2 aufgeführt.

Die Effizienz errechnet sich wie folgt (Pfaffl et al. 2004):

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Anschließend wurde durch Bezugnahme an ΔC_{TR} und die Effizienzen für Referenzgen und Zielgen der Faktor ΔC_{TRE} berechnet:

$$\Delta C_{TRE} = \Delta C_{TR} / \text{Log}_{(E)} E_Z$$

Zur Berechnung der ΔC_{TZ} wurden die individuellen ΔC_{TRE} vom C_T -Wert des im selben Tier gemessenen Zielgens abgezogen:

$$\Delta C_{TZ} (\text{Zielgen}) = C_T (\text{Zielgen}) - \Delta C_{TRE}$$

III. Methoden

Gen	Kalibrierungsformel	Korrelation	Steigung	-1/Steigung	Effizienz
Actin	$y = -4.0504x + 26.265$	R2 = 0.9911	-4,0504	0,246889196	1,765587299
GAPDH	$y = -3.3998x + 24.76$	R2 = 0.9969	-3,3998	0,294134949	1,96849787
HPRT	$y = -3.4691x + 23.477$	R2 = 0.9873	-3,4691	0,288259203	1,942044614
RPII-2	$y = -3.3172x + 22.631$	R2 = 0.9805	-3,3172	0,301459062	2,001976899
CHST-8	$y = -3.4126x + 25.834$	R2 = 0.9923	-3,4126	0,293031706	1,963503619
CHST-9	$y = -3.6795x + 24.888$	R2 = 0.9943	-3,6795	0,271776057	1,869717774
HNK-1ST	$y = -4.4679x + 28.426$	R2 = 0.9986	-4,4679	0,223818796	1,674244174
CHST-11	$y = -4.1954x + 27.703$	R2 = 0.9989	-4,1954	0,238356295	1,731236082
CHST-12	$y = -3.7058x + 24.958$	R2 = 0.9956	-3,7058	0,269847266	1,861432389
CHST-13	$y = -4.8917x + 30.224$	R2 = 0.9961	-4,8917	0,204427908	1,601134843
D4ST1	$y = -4.1141x + 25.74$	R2 = 0.9889	-4,1141	0,243066527	1,750114759

Tab. 3.2: Übersicht der verwendeten Kalibrierungsformeln, Steigungen und Effizienzen der für die qRT-PCR verwendeten Gene. Die Kalibrierungsformeln wurden der Bachelorarbeit von Kathrin Hoffmann entnommen (Hoffmann, 2007). Die Steigung ergibt sich aus der Formel $y = ax + b$, wobei a als Steigung definiert ist. Die Effizienzberechnung erfolgte nach Pfaffl et al., 2004.

Die so ermittelten ΔC_T -Werte, wurden in die Kalibrierformel eingesetzt und die umgekehrten Logarithmen der Resultate ermittelt, um die Ausgangsmenge an eingesetzter RNA abzuschätzen. Anschließend wurde, um eine relative Expression des jeweiligen Gens zu ermitteln, ein Kallibrator definiert, dieser auf 1 gesetzt und alle anderen Werte in Relation dazu errechnet.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1. Amplifikation einer Phagenbibliothek

Es wurde eine LE392 ÜN-Kultur in LB, versetzt mit 0,2% Maltose bei 37°C angeimpft. Am nächsten Morgen wurden 5 ml der ÜN-Kultur mit 10 mM MgSO₄ supplementiert und mit 1×10^8 plaque forming units (pfu) λ ko-2 Phagen angeimpft. Nach 20minütiger Inkubation bei 37°C wurden 500 μ l der Kultur mit 8 ml 45-50°C warmen Top-Agar gemischt und auf eine

III. Methoden

15 mm LB-Agar-Platte gegossen. Insgesamt wurden zehn LB-Agar-Platten auf diese Weise präpariert. Die Platten wurden 15 min bei RT zum Aushärten des Top-Agars vorinkubiert, anschließend für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 8 Stunden wurde auf jede Platte ein Tropfen Chloroform pipettiert, die Platten mit offenem Deckel 5 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig 15 ml SM-Medium aufgelegt. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Überstand abgenommen, mit 1 ml Chloroform versetzt und 30 min bei 7000 g und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer und Agar-Reste zu entfernen. Um die Phagen kurzfristig (mehrere Monate) zu lagern, wurden 1 ml Aliquots mit 30 µl Chloroform versetzt und fest verschlossen bei 4°C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden kleine Aliquots in 7% DMSO bei -80°C gelagert.

2.2. Austitrieren einer Phagenbibliothek

Eine *E.coli*-Kultur wurde in Lambda-broth-Medium mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 1 hochgezogen. Von den Phagen wurde eine Verdünnungsreihe (10²-10⁵) in SM-Medium angesetzt. 100 µl der Phagenverdünnung wurden mit 300 µl Bakterienkultur versetzt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert, mit 2,5 ml 45-50°C warmen Top-Agar vermischt und auf λ-Platten ausplattiert. Nach 12 h bei 37°C konnten die Plaques (Löcher im Bakterienrasen) gezählt und der Phagentiter nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Plaques} \times \text{Verdünnung}}{\text{Menge der ausplattierten Phagen}}$$

2.3 Screenen einer Phagenbibliothek

Es wurde eine 5 ml ÜN-Kultur von SCRN10 Zellen (in LB^{Spec50/ Tet12,5} mit 0,2% Glukose bei 30°C) angeimpft, die zuvor mit dem Konstrukt, mit dem die Phagenbibliothek *gescreent* werden sollte, transformiert wurden. Am nächsten Morgen wurde die Kultur zweimal mit 10 ml LB-Medium gewaschen und die Bakterien in 5 ml LB aufgenommen. 1 ml dieser Kultur wurde in 100 ml LB^{spec25} mit 0,4 mM IPTG und 0,2% Maltose angeimpft und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 1 kultiviert. 4 ml dieser Bakterienkultur wurde mit 1 x 10⁸ λko-2 Phagen infiziert, mit 10 mM MgSO₄ supplementiert und 20 min bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Zweimal 2 ml dieses Bakterien-Phagen-Gemisches wurden mit je 8 ml Top-Agar versetzt und auf zwei 15 mm LB^{0,4mIPTG/0,002%Arabinose}-Agar-Platten ausplattiert. Nach 8-10 Stunden Inkubation bei 37°C waren erste Plaques sichtbar. Auf jede Platte wurde ein Tropfen Chloroform geträufelt und 5 min bei RT mit geöffnetem Deckel inkubiert. Anschließend wurden 10 ml SM-Medium

III. Methoden

auf die Platten pipettiert und die Phagen über Nacht bei 4°C eluiert. Der Überstand wurde am nächsten Morgen gesammelt, mit 1 ml Chloroform versetzt, gevortext und bei 8000 upm für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 500 µl Chloroform versetzt, der Phagentiter bestimmt (vgl. 2.2) und bei 4°C gelagert.

Für den nächsten Schritt wurde eine 10 ml JM107-RS-ÜN-Kultur in LB^{spec50} bei 30°C angeimpft. Am nächsten Morgen wurden 1 ml dieser ÜN Kultur in 100 ml LB^{spec25} mit 0,4 mM IPTG und 0,2% Maltose überimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 1,5 kultiviert. 50 ml dieser Zellen wurden mit 2 x 10¹⁰ pfu der austitrierten Phagen versetzt, mit 10 mM MgSO₄ supplementiert und 30 min bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Dann wurden 500 ml LB mit 0,4 mM IPTG zugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 30°C geschüttelt. Die transduzierten Bakterien wurden 20 min bei 5000 upm pelletiert, in 3 ml LB Medium resuspendiert und je 150 µl auf insgesamt zwanzig 150 mm LB^{amp50/Tet12,5}-Agar-Platten plattiert. Zur Bestimmung der *Loop-Out-Effizienz (LOEFF)* wurde je eine 10⁻⁶ und 10⁻⁷ Verdünnung auf eine 10 mm LB^{amp}-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle 150 mm Platten mit Hilfe eines Filterpapiers auf neue LB^{amp50/Tet12,5}-Agar-Platten gestempelt und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Die *Loop-Out-Effizienz* der Kontrollplatten sowie die Anzahl der erwarteten Kolonien wurde nach folgender Formel bestimmt:

LOEFF = Durchschnitt aus den gezählten Kolonien auf den 10⁻⁶ und 10⁻⁷ Verdünnungsplatten

$$\text{Anzahl erwarteter Kolonien} = \frac{\text{LOEFF} \times \text{ausplattierte Menge}}{20.000}$$

$$\text{Kolonien/cm}^2 = \frac{\text{Anzahl erwarteter Kolonien}}{\text{Grundfläche der Platte}}$$

3. Kultur embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

3.1 Gelatinieren der Zellkulturschalen

Die Schalen oder 96-Lochplatten wurden 30 min mit 0,1% Gelatine behandelt, die Gelatine abgesaugt, die Platten anschließend unter der Sterilbank luftgetrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C bis zu 3 Wochen gelagert.

3.2 Kultur von mausembryonalen Fibroblasten (MEF) Zellen

Die Kultivierung embryonaler Stammzellen benötigt die Co-Kultivierung von mausembryonalen Fibroblasten (MEFs). In dieser Arbeit wurden Neomycin-resistente MEFs verwendet. Diese Neomycin-resistenten Fibroblasten wurden aus E 13,5–E 14,5 Embryonen einer neo-transgenen Mauslinie (FV-Neo) isoliert, die freundlicherweise von Dr. Michael Boesl (ZMNH, Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde.

Ein Röhrchen mit 2×10^6 MEF-Zellen wurde schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut und auf einer 15 cm Kulturschale ausgesät, die mit 25 ml MEF-Medium vorbereitet wurde. Die Zellen wurden drei Tage mit 5% CO₂ bei 37°C im Inkubator (Nuair, Plymouth, Maine, USA) kultiviert und anschließend 1:3 oder 1:4, je nach Dichte der Zellen, gesplittet.

3.3 Splitten der MEF-Zellen

Das Medium einer konfluenten 25 cm Kulturschale wurde abgesaugt und die Zellen 1 x mit 25 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3 ml Trypsin und anschließender Inkubation bei 37°C für 3-5 min von der Platte gelöst, mit einer Pasteurpipette sorgfältig vereinzelt und die Trypsinreaktion mit 5 ml MEF-Medium gestoppt. Je nachdem, wie die MEF-Zellen verdünnt werden sollten, wurde in 3-4 neuen 15 cm Kulturschalen 20 ml MEF-Medium vorgelegt und die MEF-Zellsuspension auf die vorbereiteten Platten verteilt. Die Zellen wuchsen drei Tage bei 37°C und wurden dann erneut gesplittet oder mit MMC inaktiviert (vgl. 3.4).

3.4 Inaktivierung der MEF-Zellen durch Mitomycin C (MMC)

Mitomycin C ist ein chemotherapeutisches Mittel, das durch Quervernetzung des DNA Doppelstranges den Zellzyklus blockiert. MMC-behandelte Zellen werden als *Feederzellen* für die ES-Zellen verwendet.

Das Medium der konfluenten MEF-Zellen (15 cm Kulturschale) wurde abgesaugt und durch 15 ml frisches MEF-Medium, das mit 10 µg/ml MMC versetzt wurde, ersetzt. Die Zellen

III. Methoden

wurden 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend das Medium abgesaugt und 2 x mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 3 ml Trypsin und Inkubation bei 37°C für 3-5 Minuten, wurden die Zellen trypsinisiert und anschließend durch sorgfältiges Resuspendieren vereinzelt. Die Zellen wurden mit 7 ml Medium ab gespült, in einem Falcon-Röhrchen gesammelt, die Zellzahl bestimmt (vgl. 3.5), 5 min bei 900 upm zentrifugiert und das Zell-Pellet in soviel Einfriermedium aufgenommen, dass man eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml erhielt. Die Zellen wurden in 1 ml-Aliquots in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.5 Bestimmen der Zellzahl

20 µl Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zellen in vier großen Eckquadraten wurden ausgezählt, der Mittelwert gebildet und die Zellzahl mit Hilfe der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Gesamtvolumen}$$

3.6 Auftauen der ES-Zellen

Die Zellen wurden im 37°C Wasserbad schnell aufgetaut und in 5-10 ml ES-Zellmedium aufgenommen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 900 upm wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und das Pellet in entsprechendem Volumen ES-Zellmedium resuspendiert und auf die mit MEF-*Feederzellen* vorbereiteten, gelatinierten Kulturschalen ausgesät.

3.7 Kultur der ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank (SterilGard Class II, The Baker Company, Sanford, Maine, USA) behandelt und wuchsen mit 6,6 Vol % CO₂ bei 37 °C im Inkubator (Nuair, Plymouth, Maine, USA). Die ES-Zellen wurden auf MEF-*Feederzellen* ausgesät, die am Vortag auf gelatinierten Zellkulturschalen plattiert worden waren. Das Medium der Zellen wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen nach zwei Tagen, wenn sie subkonfluent waren, 1:4 bis 1:6 auf neue, mit MEF-*Feederzellen* plattierten Platten, verdünnt.

3.8 Splitten der ES-Zellen

Die Zellen sollten alle zwei Tage subkonfluent sein und müssen dann 1:4 bis 1:6 gesplittet werden. Die Schale bzw. die 96-Lochplatte mit den ES-Zellen wurde 1 x mit PBS/EDTA gewaschen. Dann wurde 1/5 Volumen 0,25% Trypsin/EDTA zugegeben und die Zellen bei 37°C 3-5 min inkubiert und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vereinzelt. Die Trypsinierung wurde mit mindestens der doppelten Menge ES-Zellmedium abgestoppt, die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt, um sie bei 900 upm für 5 min zu zentrifugieren. Das Pellet wurde in entsprechendem Volumen ES-Zellmedium resuspendiert und auf 1-6 neue, mit MEF-Feederzellen vorbereitete, gelatinierte Kulturschalen ausgesät. Die 96-Lochplatten wurden nach der Trypsinierung direkt auf 3-4 neue, mit MEF-Feederzellen vorbereitete, gelatinierte 96-Lochplatten oder auf eine 24-Lochplatte verteilt.

3.9 Elektroporation und Selektion von ES-Zellen

Pro Elektroporationsansatz wurden 1×10^7 ES-Zellen eingesetzt. Zwei Stunden vor der Elektroporation wurde das Medium der ES-Zellen gewechselt. Die Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, mit 3 ml 0,25% Trypsin/EDTA und 3-5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch auf- und abpipettieren sorgfältig vereinzelt, die Trypsinierungsreaktion mit 7 ml ES-Zellmedium gestoppt, in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen 5 min bei 900 upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert, erneut 5 min bei 900 upm zentrifugiert, die Zellen in 800 µl PBS aufgenommen, vereinzelt und mit 30 µg linearisierter DNA gemischt. Das Zell/DNA-Gemisch wurde in eine 0,4 cm *gap*-Elektroporationsküvette überführt und im Biorad Elektroporator bei 240 V und 500 µF elektroporiert. Eine Zeitkonstante zwischen 5,5 und 6,2 wurde als optimal bewertet. Nach dem Elektroschock wurden die Zellen bei RT für 5 min inkubiert, in 10 ml Medium aufgenommen und gleichmäßig auf 5-6 mit Feederzellen vorbereitete, gelatinierte 10 cm Schalen verteilt. Nach 24 h Erholung in ES-Zellmedium wurde mit der Selektion begonnen und das Medium gegen ES-Zellmedium, das mit 250 µg/ml G418 (Geneticin) versetzt wurde, ausgetauscht. Die transfizierten Zellen wurden für eine Woche in Kultur gehalten und das Selektionsmedium jeden Tag erneuert. Kolonien, die sieben Tage nach der Elektroporation unter dem Binocular eine runde, glatte Oberfläche mit scharfer Umrandung zeigten, wurden mit sterilen Pipettenspitzen gepickt. Jede einzelne Kolonie wurde in ein Loch einer 96-Lochplatte mit rundem Boden überführt, in das 40 µl Trypsin vorgelegt worden waren. Wenn zwei Reihen der Platte mit gepickten Klonen voll waren, wurden die Zellen bei 37°C für 3-5 min inkubiert, die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt und in eine neue 96-Lochplatte mit glattem Boden überführt, die mit MEF-Feederzellen beschichtet und mit 200 µl

III. Methoden

ES-Zellmedium versehen wurde. Die Platten wurden 2-3 Tage bei 37°C kultiviert bis die Zellen subkonfluent waren und dann 1:4 gesplittet (vgl. 3.8).

3.10 Einfrieren von ES-Zellen

Zwei Stunden vor dem Einfrieren wurde noch einmal das Medium der ES-Zellen gewechselt. Die Zellen wurden 1 x mit PBS gewaschen und anschließend wurden pro Loch 40 µl Trypsin pipettiert und für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden sorgfältig vereinzelt und die Reaktion mit 60 µl ES-Zellmedium abgestoppt. Die 96-Lochplatte wurde auf Eis gestellt und pro Loch 100 µl 2 x Einfriermedium zupipettiert. Die 96-Lochplatte wurde mit Klebeband umwickelt und in einer Styroporbox bei -80 eingefroren. Nach zwei Tagen wurden die Platten aus der Styroporbox genommen und bei -80 °C gelagert.

4. Histologische Methoden

4.1 Herstellung von Rückenmarks-Cryoschnitten

Die Mäuse wurden mit Narcoren tief narkotisiert und durch den linken Herzventrikel mit 4% PFA perfundiert. Das Rückenmark wurde nach Entfernen der Wirbel vorsichtig isoliert und über Nacht in 4% PFA bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in 15% Sucrose überführt und nach spätestens zwei Tagen, wenn es an der Oberfläche schwamm, in Tissue-TEK[®] O.C.T. (Sakura Finetek, Zoeterwonde, Niederlande) bei -80°C in Isopentan eingefroren und bis zur Herstellung der Schnitte bei -80°C gelagert. Es wurden 25 µm dicke, longitudinale oder transversale Cryoschnitte am Cryostat (Leica, Bensheim, Deutschland) hergestellt, auf superfrost-Objektträger transferiert und eine Stunde bei RT getrocknet, bevor sie weiterverwendet oder bei -20°C gelagert wurden.

4.2 Kernfärbung mit *Cresyl Violet* (Nissl) und Myelinfärbung mit *Luxol Fast Blue*

Die Schnitte wurden bei RT in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 95%, 100% Ethanol) für je zwei Minuten dehydriert und in *Luxol Fast Blue*-Lösung über Nacht im 56°C Wasserbad gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei Minuten in 95% Ethanol und H₂O gewaschen. Die Differenzierung in graue und weiße Substanz erfolgte bei RT für drei Minuten in 0,05% Lithiumcarbonat-Lösung, anschließend in 70% Ethanol, bis graue und weiße

III. Methoden

Substanz deutlich voneinander zu unterscheiden waren. Für die Nissl-Färbung wurden die Schnitte 20 min in *Cresyl Violet*-Lösung bei 56°C im Wasserbad inkubiert, kurz in Wasser gewaschen und ein paar Sekunden in *Cresyl Violet*-Differenzierungslösung inkubiert. Die Schnitte wurden bei RT in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 95%, 2 x 100% Ethanol, 2 x Xylol) je zwei Minuten dehydriert und mit Entellan neu (Merck) eingedeckelt.

4.3 Immunfluoreszenzfärbungen von Cryoschnitten

Die Cryoschnitte (vgl. 4.1) wurden 30 min in 10 mM Natriumcitrat-Lösung (pH 9,0) bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte auf Raumtemperatur abgekühlt und eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert. Die Blockierlösung wurde verworfen und die Schnitte 1-3 Tage mit Primärantikörper (verdünnt in PBS mit 0,5% w/v lambda-carrageenan und 0,2% w/v Natriumacit) in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen, für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit entsprechendem Sekundärantikörper (1:2000 in PBS-carrageenan) inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Für die Kernfärbung wurden die Schnitte 10 min in bis-benzimid-Lösung inkubiert, zweimal für 5 min in PBS gewaschen und mit Fluoromount eingedeckelt.

5. Tierversuche

Die CHST14^{-/-} und die CHST14^{+/+} Geschwister-Mäuse wurden im Alter von drei Monaten aus der Tierhaltung des ZMNH geliefert. Die Tiere wurden unter Standard-Laborbedingungen gehalten und mittels PCR-Analyse genotypisiert. Sämtliche Tierversuche wurden gemäß der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg genehmigt.

Die Versuche sowie die Auswertung der Daten wurden blind durchgeführt. Die Anzahl der Mäuse pro Gruppe und untersuchtem Zeitpunkt werden im Abschnitt Ergebnisse genannt.

5.1. Rückenmarksläsionen

5.1.1 Durchführung der Läsion

Die Läsionen wurden ausschließlich mit 12-16 Wochen alten, weiblichen Mäusen durchgeführt, da den Tieren nach der Operation eine Woche lang manuell die Blase entleert werden muss und dies aus anatomischen Gründen bei Männchen nicht machbar ist.

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 100 mg Ketanest und 5 mg Rompun pro kg Körpergewicht narkotisiert. Die Wirbelsäule wurde im Bereich T7-T9 freigelegt und eine Laminektomie durchgeführt. Um die Läsion durchzuführen, wurde eine Maus-Rückenmarks-Kompressions-Apparatur (Curtis et al., 1993; Stewart et al., 2003) bestehend aus einer Uhrmacherpinzette, die an einer stereotaktischen Einheit befestigt ist, verwendet. Die Kompressionskraft und die Dauer der Kompression wurden über eine elektromagnetische Apparatur kontrolliert. In den meisten Fällen wurde das Rückenmark mit Hilfe eines zeitkontrollierten Stromflusses durch die elektromagnetische Apparatur für eine Sekunde maximal komprimiert (100% nach der Definition von Curtis et al., 1993). Anschließend wurde die Haut mit 3-6 Stichen genäht. Die Maus wurde nach der Operation für mehrere Stunden in einem 37°C warmen Raum gehalten, um Hypothermie zu verhindern. Die Mäuse wurden einzeln gehalten und die Blase der Tiere sieben Tage lang täglich manuell entleert.

5.1.2 Injektion von Chondroitinase ABC in die Läsionsstelle

Die Mäuse wurden wie in 6.1.1 beschrieben narkotisiert und läsioniert. 1 µl Chondroitinase ABC (10 U/ml) wurden mit einer Hamilton-Spritze aufgezogen, die anstelle der Uhrmacherpinzette in die stereotaktische Einheit der Kompressions-Apparatur (vgl. 5.1.1) eingebaut wurde. Die Spritze wurde ca. 2 mm caudal der Läsionsstelle orientiert und die Chondroitinase ABC in zwei Minuten langsam injiziert. Bevor die Spritze vorsichtig und sehr langsam entfernt wurde, wartete man eine Minute, um die Chondroitinase ABC langsam in das Gewebe diffundieren zu lassen. Anschließend wurde die Haut genäht und die Tiere wie in 5.1.1 beschrieben postoperativ versorgt.

Um eine ausreichend lang anhaltende Aktivität der Chondroitinase ABC *in vivo* zu gewährleisten, wurde drei und sechs Tage nach der Läsion erneut Chondroitinase ABC injiziert. Hierfür wurden die Tiere wie oben beschrieben narkotisiert, die alte Naht vorsichtig geöffnet, 1 µl Chondroitinase ABC (10 U/µl) injiziert und die Mäuse postoperativ versorgt.

5.1.3 Analyse der motorischen Funktion

Die Regeneration der motorischen Beweglichkeit wurde mit Hilfe der *open field locomotion*-Skala (BBB-Skala) bewertet (Joshi und Fehlings, 2002). Die BBB-Skala ist eine 21-Punkt-Skala von 0-21, wobei 0 die vollständige Paralyse der Hinterläufe beschreibt. Um Fehler zu minimieren, wurde die Analyse immer von der gleichen Person durchgeführt. Die Bewertung erfolgte später anhand von Videoaufzeichnungen im Zeitlupenmodus. Die Bewertungen der Tiere erfolgten vor der Rückenmarksläsion sowie eine, drei und sechs Wochen nach der Läsion. Um die motorische Beweglichkeit zu beurteilen, wurde ein klassischer *Beam walking* Test durchgeführt. Die Tiere wurden darauf trainiert auf einem 90 cm langen und 4 cm breiten Holzbalken freiwillig von einem zum anderen Ende zu laufen, wo ihr Käfig platziert wurde. In zwei aufeinander folgenden Läufen wurden die Tiere von beiden Seiten seitlich gefilmt (Panasonic NV-DS12 Kamera; 25 Bilder pro Sekunde). Die Video-Sequenzen wurden anschließend digitalisiert und mit Hilfe der VirtualDub-Software (frei zugängliche Software; erhältlich unter <http://virtualdub.org>) ausgewertet. Ausgewählte Bilder, in denen die Tiere in definierten Bewegungsphasen zu sehen sind (siehe unten) wurden mit Hilfe der frei zugänglichen Image Tool 2.0-Software (University of Texas, San Antonio, TX; <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/>) vermessen.

Es wurden drei Parameter zur Analyse der motorischen Funktion betrachtet: der *rump-height* Index, der *footstepping* Winkel und das Streck-Beuge-Verhältnis im Stift-Test.

Der *footstepping Winkel* (FSW) ist definiert durch den Winkel zwischen der Linie parallel zur Fußsohle und einer horizontalen Linie kurz bevor die Maus die Pfote in der Laufbewegung anhebt. Bei gesunden Mäusen ist dieser Winkel kleiner als 20°. Rückenmarksläsionierte Tiere ziehen ihre Hinterläufe mit der Fußsohle nach oben hinterher, wodurch der Winkel auf über 150° vergrößert ist (vgl. Abb. 3.2). Bei diesen Tieren wurde der kleinste Winkel einer einzelnen Laufbewegung gemessen; meist war das der Moment, als die Maus versuchte ihren Hinterlauf zu beugen. Bei läsionierten Tieren, deren Läsion weniger schwer war und die zu Schritten unterschiedlicher Qualität in der Lage waren, wurde der Winkel gemessen, nachdem die Maus ihren Hinterlauf gerade aufgesetzt hat, ohne den Fuß schon voll belastet zu haben. Ein Durchschnittswert aus drei Messungen pro Tier, Extremität und Versuch wurde als repräsentativ für das jeweilige Tier betrachtet. Der *footstepping* Winkel wurde als numerischer Wert gemessen (vgl. Abb. 3.2), der eine objektive Abschätzung der *plantar stepping* Fähigkeit mit Hilfe der BBB Skala zulässt.

Der zweite Parameter, der *rump-height* Index (RHI), dient als numerische Abschätzung der Fähigkeit das eigene Körpergewicht zu tragen. Diese Fähigkeit benötigt die Koordination

III. Methoden

verschiedener Gelenke beider Hinterläufe und wird durch verschiedene Faktoren wie Muskelkraft, Spastizität sowie der Laufart (*plantar* oder *dorsal stepping*), beeinflusst.

Der *rump-height* Index wurde mit Hilfe der gleichen Videoaufnahmen bestimmt, die auch für den *footstepping* Winkel verwendet wurden. Dieser Parameter ist durch die Rumpfhöhe definiert und wird durch eine vertikale Linie vom dorsalen Schwanzansatz der Maus bis zum Boden des Holzbalkens bestimmt. Der Wert wurde mit der Dicke des Holzbalkens normalisiert (vgl. Abb. 3.2), der ebenfalls durch eine vertikale Linie vermessen wurde. Pro Tier und Versuch wurden drei Messungen durchgeführt. Als Zeitpunkt wurde der Punkt bestimmt, an dem die Rumpfhöhe während einer Laufbewegung maximal war.

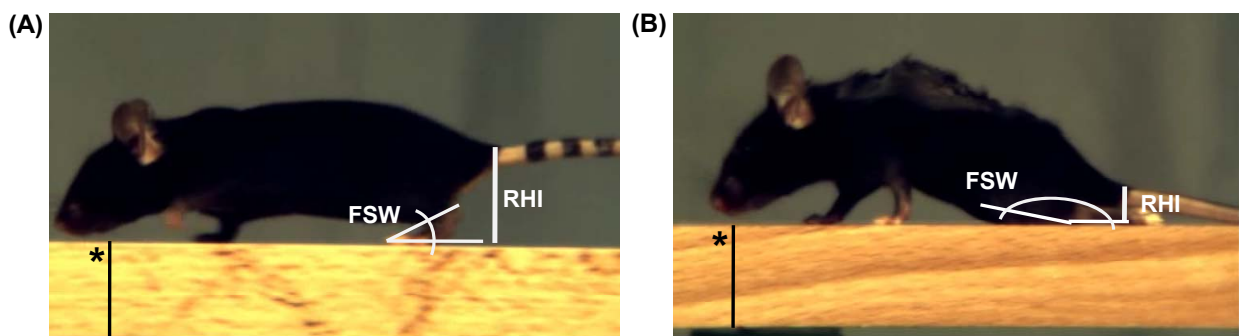


Abb. 3.2: Footstepping Winkel und rump-height Index. Der *Footstepping* Winkel (FSW) wurde im unläsionierten Tier als Winkel zwischen Ferse, Fußspitze und der Oberfläche des Balkens gemessen (A), im läsionierten Tier als Winkel zwischen Knie und der Oberfläche des Balkens (B). Der *rump-height* Index (RHI) wurde als der Abstand vom dorsalen Schwanzansatz der Maus bis zum Boden des Holzbalkens gemessen und mit der Dicke des Holzbalkens (*) normalisiert.

Ein dritter Parameter, das Streck-Beugeverhältnis im Stift-Test, ist eine numerische Abschätzung der Fähigkeit der Tiere freiwillige und körperrgewichtsunabhängige Bewegungen durchzuführen. Solche Bewegungen benötigen die Verbindung zwischen Rückenmark und supraspinalen motorischen Kontrollzentren, jedoch sind sie in unserer Betrachtungsweise unabhängig von Koordination und Präzision.

Das Streck-Beugeverhältnis wurde mit Hilfe von Videoaufzeichnungen der Tiere beim Stift-Test (*pencil test*), wie er für Femoralis-Nerv-Läsionsmodelle beschrieben wurde (Irintchev et al., 2005), ausgewertet. Wenn man eine gesunde Maus kopfüber am Schwanz festhält und ihr die Möglichkeit bietet, mit ihren Vorderpfoten einen Stift zu greifen, wird sie versuchen den Stift auch mit ihren Hinterläufen zu greifen. Dadurch vollzieht sie mit ihren Hinterläufen periodische Streck- und Beugebewegungen. Diese Beuge- und Streckwerte wurden als der Abstand zwischen dem distalsten Punkt des Fußes und dem Schwanzansatz gemessen (vgl. Abb. 3.3). Für das Rückenmarksläsionsmodell wurden pro Tier rechte und linke Seite gemessen und der Durchschnitt der Mittelwerte für linke und rechte Seite als Wert genommen.

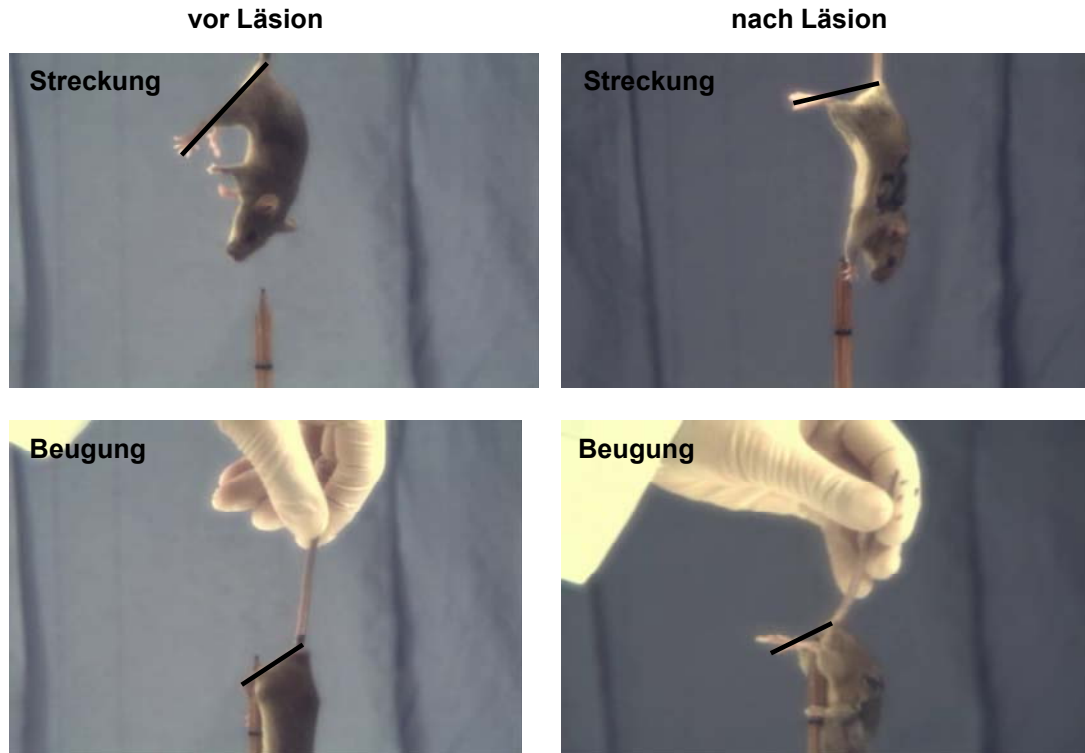


Abb. 3.3: Streck-Beugeverhältnis im Stift-Test. Es wird jeweils der Abstand zwischen dem distalsten Punkt des Fußes und dem Schwanzansatz gemessen. In der rechten Spalte sind die Streckung (oben) und Beugung (unten) im unläsionierten Tier gezeigt, in der linken Spalte nach der Läsion.

5.1.4 Recovery Index (RI)

(Irintchev et al., 2005)

Der *Recovery Index* ist eine für jedes Tier individuelle Abschätzung für unterschiedliche Parameter wie oben beschrieben und wird wie folgt berechnet:

$$\text{RI (\%)} = \left(\frac{(X_{7+n} - X_7)}{(X_0 - X_7)} \right) \times 100$$

X_0 , X_7 und X_{7+n} sind hierbei die Werte vor der Operation, sieben Tage nach der Operation und n Tage nach der Operation. Wenn während des Beobachtungszeitraumes keine Verbesserung oder sogar eine Verschlechterung auftritt, können die Werte 0 annehmen oder negativ werden. Wenn $X_0 - X_7 = 0$ ist, also die Operation keine Veränderungen in den betrachteten Parametern hervorruft, kann kein RI berechnet werden.

5.2. Verhaltensmethoden

5.2.1 Tiere und Tierhaltung

Die CHST14^{-/-} und die CHST14^{+/+} Geschwister-Mäuse wurden mittels PCR-Analyse genotypisiert. Zwei Wochen bevor die Verhaltenstest gestartet wurden, wurden die drei Monate alten CHST14^{-/-} (n = 11) und die CHST14^{+/+} (n = 12) Männchen in einen Mausraum mit umgekehrten 12:12 Stunden Licht-Dunkel-Rhythmus (Licht an um 19 h) überführt, wo sie unter Standardhaltungsbedingungen (21°C ± 1°C, 40-50% Luftfeuchtigkeit, Futter und Wasser *ad libitum*) gehalten wurden. Alle Verhaltenstests wurden während der Dunkelphase in einem mit gedimmten Rotlicht beleuchteten Raum, neben dem Mausraum durchgeführt. Alle Versuche starteten frühestens zwei Stunden nachdem das Licht ausging und endeten spätestens zwei Stunden bevor das Licht wieder anging. Alle Apparaturen und Materialien, die für die Versuche benötigt wurden, wurden vor jedem Experiment und nach Kontakt mit einem Tier mit Seife, Wasser und 70% Ethanol gewaschen. Die Tests wurden ausschließlich mit männlichen Tieren durchgeführt und um einen Geschwistereffekt bei den Versuchen ausschließen zu können, wurden aus einem Wurf nicht mehr als zwei Tiere pro Genotyp untersucht. Alle Tests wurden auf Video aufgenommen und zwischen verschiedenen Tests immer mindestens ein Tag pausiert. Sämtliche Tierversuche wurden gemäß der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg genehmigt. Die Versuche sowie die Auswertung der Daten wurden blind durchgeführt, die Anzahl der Mäuse pro Gruppe und untersuchtem Zeitpunkt werden im Abschnitt Ergebnisse genannt.

5.2.2 Open field

Dieser Test basiert auf dem inneren Konflikt der Tiere zwischen ihrer angeborenen Furcht gegenüber offenen Flächen auf der einen Seite und ihrem Explorationsdrang auf der anderen Seite. Die Arena des *open fields* besteht aus vier Kästen à 50 cm x 50 cm Grundfläche und 40 cm hohen Wänden (vgl. Abb. 3.4) und wurde mit 100 Lux ausgeleuchtet. Pro Kasten wurde eine Maus in eine definierte Ecke gesetzt. Die Maus konnte sich 15 min frei in der Arena bewegen und wurde dabei mit Hilfe des *EthoVision* Programmes (Noldus, Wageningen, Niederlande) gefilmt.

Folgende Parameter wurden mit Hilfe des *EthoVision*-Programmes analysiert: zurückgelegte Strecke, Durchschnittsgeschwindigkeit der Maus, durchschnittlicher Abstand zur Wand (Rand), sowie die Verweildauer des Tieres in der Mitte (Zentrum) des Kastens.

Während der ersten fünf Minuten wurden folgende Verhaltensparameter mit Hilfe des *The Observer*-Programmes (Noldus) bestimmt: *rearing* (Männchen machen) mit und ohne die

III. Methoden

Wand zu berühren, *self grooming* (sich putzen), sowie SAP (*stretched attend posture*; die Maus streckt sich vorwärts und zieht sich in ihre Ausgangsposition zurück, ohne sich dabei vorwärts zu bewegen).

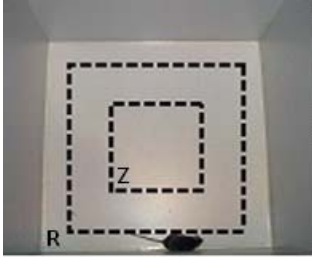


Abb. 3.4: Arena des *open fields*. Dargestellt ist ein Kasten der Arena und den zur Auswertung gedanklich gezeichneten Feldern für Zentrum (Z) und Rand (R).

5.2.3 *Elevated plus maze*

Dieser Test basiert wie das *open field* auf dem inneren Konflikt der Tiere zwischen ihrer angeborenen Furcht gegenüber offenen, teilweise erhöhten Flächen auf der einen Seite und ihrem Explorationsdrang auf der anderen Seite.

Die Arena hat die Form eines Plus mit vier 30 cm langen und 5 cm breiten Armen, die durch ein 5 x 5 cm großes Quadrat miteinander verbunden sind (vgl. Abb. 3.5). Zwei sich gegenüberliegende Arme sind seitlich durch 15 cm hohe Wände verschlossen (geschlossene Arme), während die anderen beiden Arme nur durch eine 2 mm hohe Kante begrenzt sind (offene Arme). Das Labyrinth ist 75 cm vom Boden entfernt, hinter einem dunklen Vorhang platziert und mit 2 Lux ausgeleuchtet.

Die Maus wurde in die Mitte des Plus gesetzt und zwar so, dass sie in einen offenen Arm schaute und wurde für fünf Minuten gefilmt. Folgende Parameter wurden mit Hilfe des *The Observer*-Programmes analysiert: Zeit, bis die Maus das erste Mal einen offenen Arm betreten hat und die Summe der Eintritte in die offenen sowie in die geschlossenen Arme, wobei die Maus mit allen vier Pfoten den jeweiligen Arm betreten haben musste.



Abb. 3.5: *Elevated plus maze*. Die Arena besteht aus zwei sich kreuzenden Armen. Zwei Seiten des Kreuzes sind offen, während die zwei anderen von 15 cm hohen Wänden begrenzt sind.

Außerdem wurden *stretched attend postures* (SAP) gezählt (die Maus streckt sich vorwärts und zieht sich in ihre Ausgangsposition zurück, ohne sich dabei vorwärts zu bewegen), die Anzahl der Eintritte in den offenen Arm, bei denen die Maus das Ende des Armes erreicht hat, *rearing* (Männchen machen), *self grooming* (sich putzen) sowie die Anzahl der

III. Methoden

geschützten und ungeschützten *head dips* (die Maus schaut über die Kante des offenen Armes nach unten; bei geschützten *head dips* ist der Körper durch die Wände des geschlossenen Armes geschützt, bei ungeschützten *head dips* befindet sich die Maus auf dem offenen Arm und streckt ihren Kopf nach unten).

5.2.4 Spontane Alternation im Y-Labyrinth

Die spontane Alternation ist ein klassischer Test für das Arbeitsgedächtnis in Nagetieren. Nagetiere tendieren dazu, ihnen unbekannte Plätze zu erkunden. Wenn die Maus zum Beispiel den linken Arm des Y-Labyrinthes erkundet hat, würde man erwarten, dass sie als nächstes den rechten Arm untersucht. Das bedeutet, dass bei Tieren, die sich erinnern welchen Arm sie als letztes aufgesucht haben, Alternation auftritt. Da das Verhalten der Tiere nicht durch Belohnung oder Strafe bestätigt wird, spricht man von spontaner Alternation.

Das Labyrinth besteht aus drei identischen Plexiglas-Armen A, B, C (34 x 5 x 30 cm), die so verbunden sind, dass sie ein Y formen. Das Set wurde mit 2 Lux ausgeleuchtet.

Die Maus wurde in die Mitte des Labyrinthes gesetzt wo sich die drei Arme treffen und notiert welche Arme sie betrat. Ein Eintritt in einen Arm wurde dann gewertet, wenn die Maus mit allen vier Pfoten den Arm betreten hatte. Nach 20 Eintritten wurde die Maus in den Käfig zurückgesetzt. Machte die Maus innerhalb von 20 Minuten keine 20 Eintritte, wurde der Versuch abgebrochen. Der Versuch wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt und die Daten als Prozent der Alternationen aller Versuche ausgewertet.

5.2.5 Neues Objekt

Mit diesem Test wurden Neugierde und Ängstlichkeit der Tiere getestet, indem man sie in ihrem Käfig mit einem fremden Objekt konfrontierte und untersuchte wie sie sich diesem Objekt näherten oder es untersuchten.

Am Vortag wurden die Mäuse einzeln in einen Käfig Typ II (38 x 22 x 15 cm) gesetzt und mit frischem Einstreu sowie Futter und Wasser *ad libitum* versorgt. Es wurde jedoch kein Nestmaterial in die Käfige getan und das Futter wurde in den Käfig gelegt und nicht in die Futterraufe im Deckel. Am folgenden Tag wurden die Tiere im Käfig für fünf Minuten gefilmt, dann wurde ein neues Objekt in den Käfig gestellt. Dieses Objekt bestand aus einer präparierten, leeren Wasserflasche (7 x 7 x 10 cm), wie sie in der Tierhaltung verwendet wird. Der Boden der Flasche wurde entfernt und auf einer Seite in Eingang von 3 x 4 cm ausgeschnitten. Die Flasche wurde so im Käfig platziert, dass sie aufrecht stand (vgl. Abb. 3.6), der ausgeschnittene Eingang in den Käfig zeigte und die Metallspitze zwischen

III. Methoden

den Gitterstäben des Deckels fixiert war. Das Verhalten der Mäuse wurde weitere fünf Minuten gefilmt.

Der Versuch wurde später mit Hilfe des *The Observer*-Programmes ausgewertet, wobei folgende Verhaltensparameter betrachtet wurden: Die Zeit, die die Maus in der Käfigseite, wo das neue Objekt stand (Objektseite), verbracht hat, sowie die Zeit, die auf der gegenüberliegenden Seite verbracht wurde. Außerdem wurde analysiert wie lange und wie oft die Maus an dem Objekt geschnüffelt hat, die Häufigkeit von self *grooming*, (sich putzen), *rearing* (Männchen machen) und SAP (*stretched attend posture*: die Maus streckt sich vorwärts und zieht sich in ihre Ausgangsposition zurück, ohne sich dabei vorwärts zu bewegen).

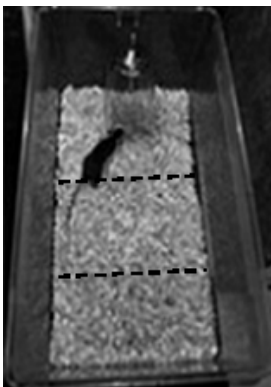


Abb. 3.6: Versuchsaufbau „Neues Objekt“. In einen Käfig wird eine an einer Seite geöffnete Trinkflasche gestellt und der Käfig zu Auswertung in drei Zonen unterteilt: Objektseite, Mitte, gegenüber des Objektes.

5.2.6 Resident/Intruder Test

Mit dem *Resident/Intruder* Test wurde das Verhalten der Mäuse gegenüber unbekanntem, männlichen Eindringlingen untersucht. Es wäre zu erwarten, dass die Tier sein Revier gegen Eindringlinge verteidigt und versucht diese zu unterwerfen.

Dieser Test wurde drei Tage nachdem die Tiere separiert wurden durchgeführt. Der Käfig (38 x 22 x 15 cm) wurde unter einer Videokamera positioniert und der Deckel durch eine Plexiglasscheibe ersetzt, die einige Luftlöcher besaß. Nach fünf Minuten wurde eine männliche C57Bl/6J Maus (*Intruder*), die in Alter und Gewicht in etwa der zu testenden Maus (*Resident*) entsprach, in den Käfig dazu gesetzt. Nachdem der erste Kontakt zwischen den beiden Tieren stattgefunden hatte, wurde das Verhalten der Tiere für weitere zehn Minuten gefilmt und die Angriffe der Tiere analysiert, wobei unterschieden wurde, ob der Angriff vom *Resident* oder *Intruder* ausging.

5.2.7 Urin-Markierung

Urin-Markierung ist eine wichtige soziale Komponente im Verhalten der Mäuse. Männliche Tiere markieren ihr Revier mit kleinen Urintropfen und teilen so anderen Männchen ihren Anspruch auf dieses Territorium mit. Gleichzeitig werden Weibchen informiert, dass sich hier ein geschlechtsreifes Männchen befindet.

Für diese Versuche wurde die Arena des *open field* (vgl. 5.2.2) benutzt. Der Boden der Arena wurde mit Whatman Filterpapier #4 ausgelegt. In eine Ecke jeder Box wurden je drei C57BL/6J Weibchen gesetzt, die durch eine Plexiglaswand (18 x 18 cm und 30 cm hoch) mit eingebohrten Löchern (\varnothing 8 mm) am unteren Rand, von den Männchen getrennt wurden. Somit konnten sich die Tiere zwar anschauen und riechen, aber es war kein Körperkontakt zwischen Männchen und Weibchen möglich (vgl. Abb. 3.7 A). Nachdem die Männchen in die Arena gesetzt wurden, wurde ihr Verhalten für 30 min auf Video aufgezeichnet.

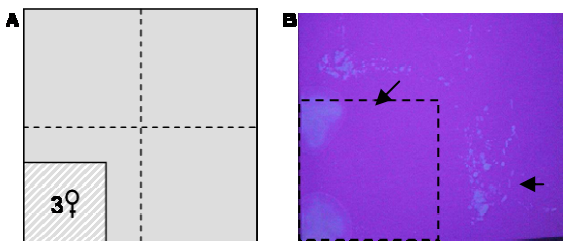


Abb. 3.7: Urin-Markierung. In A ist die Arena mit der Position der Weibchen und der gedanklichen Felder für die Auswertung dargestellt; B zeigt die Urin Markierungen (Schwarze Pfeile) am Rand des Felds der Weibchen unter UV Licht. Der Bereich in dem die Weibchen saßen, ist durch eine gestrichelte Linie markiert.

Anschließend wurden die Filterpapiere getrocknet und die einzelnen Urin Markierungen unter UV Licht gezählt (vgl. Abb. 3.7 B). Mit Hilfe von *EthoVision* wurden die zurückgelegte Strecke und die Durchschnittsgeschwindigkeit der Mäuse bestimmt sowie die Zeit, die sie im Bereich der weiblichen Mäuse verbracht haben.

5.2.8 Fear conditioning and extinction

Fear conditioning and extinction ist eine Variante des aversiven Trainings, basierend auf den Pavlov'schen Theorien, bei dem ein konditionierter Stimulus mit einem unkonditioniertem Stimulus gepaart wird.

Die verwendete Kammer (23,5 x 23,5 x 19,5 cm) bestand aus vier Plexiglaswänden und einem abnehmbaren Plexiglasdeckel und wurde auf ein Metallgitter platziert. In der Mitte des Deckels waren fünf Infrarotsensoren integriert, die mit einer Schaltereinheit verbunden waren. Diese wiederum war mit einem Mikroprozessor (MOUSE-E-MOTION®, INFRA-E-MOTION GmbH, Hamburg, Deutschland) verbunden, der das *freezing*-Verhalten der Tiere aufzeichnete und speicherte. Der Metallgitter-Boden war mit einer Spannungsquelle verbunden, die auf Knopfdruck einen Stromschlag von 250 μ A für 1 sec in dem Bodengitter

III. Methoden

erzeugte. Die Kammer wurde mit 10 Lux ausgeleuchtet und der Versuch zusätzlich zu der automatischen Analyse durch das MOUSE-E-MOTION® System auf Video aufgezeichnet.

Am ersten Tag wurde die Maus in die Kammer gesetzt und nach 160 sec und 200 sec für eine Sekunde einem Stromschlag von 250 μ A ausgesetzt. Nach weiteren 40 sec wurde die Maus in ihren Käfig zurückgesetzt. Das *freezing*-Verhalten wurde mit Hilfe des MOUSE-E-MOTION® System und zusätzlich auf Video aufgezeichnet.

Am nächsten Tag wurde die Maus für 30 min in die Kammer gesetzt, jedoch ohne eine Stromschlag auszulösen. Das *freezing*-Verhalten der Maus wurde wiederum per Video und MOUSE-E-MOTION® System festgehalten.



Abb. 3.8: Aufbau der *fear conditioning* Kammer. Der Deckel der Plexiglasskammer ist mit Infrarotsensoren ausgestattet und über eine Schaltereinheit mit dem MOUSE-E-MOTION® Mikroprozessor verbunden. Der Metallgitter-Boden ist an eine Spannungsquelle gekoppelt, die auf Knopfdruck einen Stromschlag von 250 μ A erzeugt.

Am dritten Tag wurde die Maus erneut für fünf Minuten in die Kammer gesetzt, ohne dass ein Stromschlag verabreicht wurde. Das *freezing*-Verhalten der Maus wurde per Video und MOUSE-E-MOTION® System festgehalten.

5.2.9 Vertical pole Test

Mit diesem Test wird die Motoroordination der Tiere untersucht, während sie einen Stab herunterklettern. Hierzu wurde die Maus auf das obere Ende eines rauen, vertikalen Stabs (60 cm lang, 7 mm Durchmesser) gesetzt und zwar so, dass der Kopf nach oben zeigte und sie mit allen vier Pfoten den Stab umklammerte (vgl. Abb. 3.9 A). Die Zeit, die die Maus brauchte um den Stab hinunterzuklettern wurde festgehalten. Der Versuch wurde mit jeder Maus dreimal hintereinander durchgeführt, wobei sie zwischen den einzelnen Läufen für 30 sec in ihren Käfig zurückgesetzt wurde. Es wurde die Fähigkeit der Maus bewertet, sich um 180° zu drehen und den Stab Kopf voran hinunterzuklettern (vgl. Abb. 3.9 B). In den Fällen, in denen sich die Maus drehte, wurde analysiert in welchem Drittel (Level) des Stabes sie sich drehte. Der Stab wurde folgendermaßen eingeteilt. Level 1 entsprach dem oberen Drittel (40-60 cm), Level 2 entsprach dem mittleren Drittel (20-40 cm) und die unteren 20 cm entsprachen Level 3.

III. Methoden

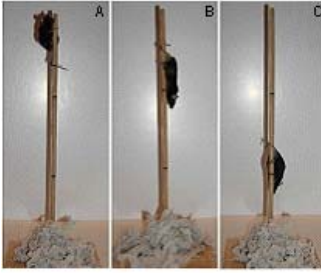


Abb. 3.9: Vertical pole Test. Die Maus musste sich am Stab um 180° drehen und kopfüber nach unten klettern.

5.2.10 Rotarod Test

Im *Rotarod* Test werden motorische Fähigkeiten und Koordination getestet. Die Mäuse mussten auf einem geriffeltem, sich drehendem runden Stab (\varnothing 3,2 cm) (*Acceler. Rotarod for mice*, Jones & Roberts, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) laufen (vgl. Abb. 3.10). Am ersten Tag wurden fünf Läufe pro Tier durchgeführt, wobei die ersten zwei Läufe mit einer konstanten Geschwindigkeit von 4 upm durchgeführt wurden und drei Minuten dauerten. Bei den folgenden drei Läufen wurde mit 4 upm begonnen, innerhalb von vier Minuten wurde die Geschwindigkeit dann langsam auf 40 upm erhöht. Die Mäuse liefen so lange, bis sie von dem Rotor herunterfielen, maximal jedoch sechs Minuten.

Am folgenden Tag wurde ein sechster Lauf mit beschleunigtem Rotor durchgeführt. Als Parameter für die Auswertung wurde die Zeit genommen, die sich die Tiere auf dem schneller werdenden Rotor halten konnten, bevor sie herunterfielen.



Abb. 3.10: Rotarod Apparatur. Die Mäuse müssen auf einem langsam schneller werdenden Stab laufen, bis sie herunterfallen.

5.2.11 Tail suspension

Mit diesem Versuch wird der Hang der Tiere zur Depression getestet, bzw. ihr Bestreben und ihre Ausdauer, sich aus einer unangenehmen Situation zu befreien. Hierzu werden die Mäuse in eine missliche Situation gebracht und es wäre zu erwarten, dass sie versuchen sich aus dieser Situation zu befreien. Die Mäuse wurden hierfür kopfüber mit Hilfe von Klebeband am Schwanz aufgehängt, so dass der Körper frei schwingen konnte. Das Verhalten der Mäuse wurde für sechs Minuten auf Video aufgezeichnet und anschließend

III. Methoden

mit Hilfe des *The Observer* ausgewertet. Hierbei wurde analysiert, wie oft und wie lange die Mäuse versuchten sich frei zu strampeln, bzw. wie lange sie regungslos hingen.

5.2.12 One trial spatial learning

Dieser Test basiert auf der Fähigkeit der Maus, geometrische Informationen als Orientierungshilfe zu nutzen. In einem ersten Akquisitionsdurchgang werden die Mäuse in eine Arena gesetzt, bei der in einer Ecke Weibchen sitzen. 24 Stunden später werden die Tiere erneut in die Arena, diesmal ohne Weibchen, gesetzt und sollen sich erinnern, wo die Weibchen am Vortag platziert waren.

Es wurde die Arena des *open field* benutzt, allerdings wurde in die Mitte der Kästen eine Trennwand eingezogen, die einen Durchgang besaß, wodurch die beiden entstehenden Räume miteinander verbunden waren. Die beiden Seiten wurden nun symmetrisch aufgebaut. In je zwei Ecken wurden Bechergläser platziert, in die Löcher eingebohrt wurden (\varnothing 8 mm). In einen der zwei Becher wurden drei Weibchen gesetzt, der andere Becher blieb leer. Die Becher wurden mit einer Plexiglasplatte zugedeckt und mit einer vollen Trinkflasche beschwert, um das Ganze zu stabilisieren (vgl. Abb. 3.11).

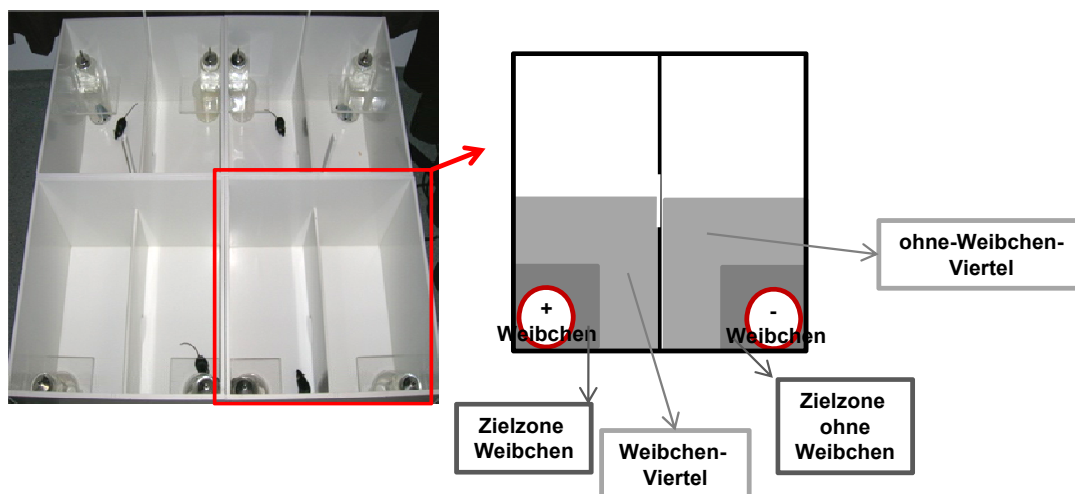


Abb. 3.11: Arena des one trial spatial learning Tests. Durch eine Trennwand wird die Arena in zwei identische Räume geteilt, die über einen Durchgang verbunden sind. Auf einer Seite wird in eine Ecke ein Becher mit Weibchen gestellt, auf die andere Hälfte kommt an gleicher Stelle ein leerer Becher. Die einzelnen Zonen, in die zur Analyse des Versuches unterschieden wurde, sind unterschiedlich grau unterlegt.

Nun wurden die Männchen für 20 min in die Arena gesetzt, ihr Verhalten auf Video aufgezeichnet und die Tiere anschließend wieder in ihren Heimkäfig zurück gesetzt. Die Arena und alle Komponenten wurden sorgfältig erst mit Seifenwasser, dann mit 70% Ethanol gewaschen und abgetrocknet, so dass die nachfolgenden Tiere nicht durch fremde Gerüche beeinflusst wurden. Nach 24 Stunden wurden die Tiere erneut in die Arena gesetzt, die

identisch zum Vortag aufgebaut war, nur dass diesmal alle Becher ohne Mäuse waren. Das Verhalten der Tiere wurde auf Video aufgezeichnet. Mit Hilfe des *EthoVision* Programmes wurden folgenden Parameter ausgewertet: Zurückgelegte Strecke in der Gesamtarena, Aufenthaltsdauer in der Zielzone mit und ohne Weibchen, Aufenthaltsdauer im Weibchen-Viertel und im ohne-Weibchen-Viertel.

5.2.13 Analyse der Verhaltensparameter

Mit Ausnahme des *Rotarod* Tests wurden alle Versuche auf Video aufgezeichnet. Das *open field* sowie Urin Markierung und *one trial spatial learning* wurden mit Hilfe der *EthoVision* Software ausgewertet. Es wurden Tracks erstellt, die die Position der Maus darstellen (fünf Zeitpunkte pro Sekunde). Folgende Parameter wurden zur Auswertung gesammelt: zurückgelegte Strecke, Durchschnittsgeschwindigkeit und Maximalgeschwindigkeit der Maus. Die Arena wurde je nach Versuch (s.o.) in unterschiedliche Zonen geteilt und hierfür entsprechend folgende Parameter bestimmt: Verweildauer und zurückgelegte Strecke in einer bestimmten Zone, Zeitpunkt des ersten Eintretens und Anzahl der Gesamteintritte in eine bestimmte Zone, sowie Abstand zu einer bestimmten Zone.

Die Versuche *elevated plus maze*, Neues Objekt, *Resident/Intruder* und *tail suspension* wurden mit Hilfe der Software *The Observer* analysiert. Die Auswertung der Versuche erfolgte immer von derselben Person, wobei der Genotyp der Mäuse zum Zeitpunkt der Auswertung nicht bekannt war. Der Experimentator wurde vorab trainiert, so dass er bei wiederholter Auswertung des gleichen Versuches auf Basis des *Reliability Tests* der *The Observer* Software, eine Übereinstimmung der Ergebnisse von mindestens 85% erzielte.

IV. Ergebnisse

Projekt 1

Konstruktion der Zielvektoren zur Generierung einer konstitutiven TN-N KO-Maus und einer konditionalen CHST-12^{flox/flox} Maus

Die Herstellung konditionaler oder konstitutiver KO-Mäuse ist eine weit verbreitete Methode, um die Funktion eines Gens *in vivo* zu untersuchen. Beim sogenannten *Gene Targeting* (engl., gezielte Veränderung von Genen in ihren natürlichen Loci), wird mit Hilfe eines Zielvektors eine Veränderung in das Zielgen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) von Mäusen eingeführt. So veränderte ES-Zellen können in Blastozysten injiziert werden und tragen dort zur Bildung einer Reihe von Geweben bei, wobei sie auch die Keimbahn besiedeln können. Auf diesem Weg kann die Veränderung des Zielgens im Mausgenom etabliert und an die kommenden Generationen weitergegeben werden.

Je nachdem, ob eine konstitutive oder eine konditionale KO-Maus erzeugt werden soll, wird der ausgesuchte Genbereich entweder deletiert oder mit loxP-Erkennungssequenzen flankiert. Die entsprechend modifizierten und linearisierten Vektoren werden in ES-Zellen eingeführt, wo homologe Rekombination mit einem der wildtypischen Loci stattfindet. Stabil transfizierte Klone werden mit Hilfe der integrierten Selektionskassette identifiziert.

Die Zielvektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden, bestanden aus einem kurzen und einem langen Arm genomischer DNA, die eine mit loxP-Erkennungssequenzen flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette einrahmen.

IV. Ergebnisse

Im ersten Teil dieses Projekts wird die Klonierung des Zielvektors zur Herstellung einer konstitutiven TN-N KO-Maus (TN-N^{-/-}) beschrieben, bei der die Exone 2-4 durch eine Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette ersetzt wurden. Die genomische DNA mausemryonaler Stammzellen wurde mit diesem Zielvektor über homologe Rekombination manipuliert und die erfolgreiche Integration in den TN-N-Lokus über PCR und Southern-Blot-Analysen untersucht.

Der zweite Teil dieses Projekts beschreibt die Klonierung des Zielvektors zur Herstellung einer konditionalen CHST-12 Maus (CHST-12^{fl^{ox}/fl^{ox}}). Exon 2 des CHST-12-Gens wurde mit loxP-Erkennungssequenzen flankiert, die die Deletion des Genbereiches über Cre-Aktivität ermöglichen sollen. Des Weiteren wurde eine loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette integriert, die nach erfolgter Rekombination in ES-Zellen, *in vitro* durch Cre-Expression entfernt werden kann.

Die Konstruktion der beiden Zielvektoren basierte auf der Methode des *recombination cloning* (REC) Systems, das von Zhang et al. (2001) beschrieben wurde und sich das Prinzip der homologen Rekombination der Bakterien zunutze macht. Hierbei werden Tetrazyklin- oder Neomycin/Kanamycin-Selektionskassetten mit 70 bp langen DNA-Sequenzen flankiert, die homolog zum gewünschten Integrations-, bzw. Manipulations-Genlocus sind. Durch den Einsatz von Bakterienstämmen und Plasmiden, die die homologe Rekombination verstärkt induzieren, können die Veränderungen in die genomische DNA eingeführt werden. Anschließende Selektion über die integrierte Resistenz erlaubt die Identifizierung solcher Klone, die die manipulierte DNA besitzen.

Alle für das *recombination cloning* benötigten Vektoren, Zelllinien und Phagenbibliotheken wurden freundlicherweise von Dr. Elledge zur Verfügung gestellt.

IV. Ergebnisse

1. Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer TN-N KO-Maus

Der Maus TN-N-Genlokus liegt auf Chromosom 1 und umfasst 69307 bp. Das Gen besteht aus 22 Exonen und 21 Introns, von denen Exon 1 nicht kodierend ist. Der offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) beginnt in Exon 2, dem ersten Start-ATG folgen jedoch noch drei weitere ATG und auch in Exon 3 findet man ein ATG, das im Leserahmen liegt und als potentieller mRNA-Start dienen könnte (vgl. Abb. 4.1). Um sicher zu gehen, dass keine alternativen TN-N-mRNAs mehr transkribiert werden können, wurde entschieden, sowohl Exon 2 als auch Exon 3 auszuschalten. Zusätzlich wurde auch Exon 4 deletiert, da die Intronregion zwischen Exon 3 und 4 nur 766 bp umfasst und sichergestellt werden sollte, dass keine für Spleiß-Ereignisse wichtigen regulatorischen Elemente zerstört werden.



Abb. 4.1: Sequenz der Exone 2-4 des TN-N-Genlokus nach Genbank Zugangsnummer NT_039185. Es ist die vollständige Sequenz der Exone 2-4 angegeben, sowie die Proteinsequenz von TN-N im Ein-Buchstaben-Code und die Länge der Introns 2 und 3. Die potentiellen Start-ATG sind rot hervorgehoben. Die Positionen der Exone innerhalb der Referenzsequenz sind durch hochgestellte Zahlen am Anfang und am Ende der Exone beschrieben.

IV. Ergebnisse

1.1 Isolierung des TN-N Genlokus aus einer λ -ko2 Phagenbibliothek

Der erste Schritt bei der Herstellung des Zielvektors besteht in der Isolierung des geeigneten genomischen Lokus. Hierfür sollte eine λ -ko2 Maus-Phagenbibliothek (Zhang et. al., 2001) *gescreent* werden.

Es wurde ein bereits vorhandenes Plasmid (pGEM-TE/TNN) verwendet, das einen 370 bp TN-N-genomischen Bereich enthielt, der homolog zur genomischen Region 3' von Exon 4 des TN-N-Lokus war (vgl. Abb. 4.2). Über eine einzelne *SacI*-Erkennungssequenz im TN-N homologen Bereich war eine Tetrazyklin-Expressionskassette eingefügt worden, die später die Identifizierung der Bakterien erlaubte, die den TN-N-genomischen Lokus besaßen.

Der 1,8 kb große TN-N homologe Bereich mit der integrierten Tetrazyklin-Expressionskassette wurde über *PmeI* in den pML179 Vektor ligiert und zur Transformation von SCRN-10 Zellen verwendet, die spezifisch zur Erhöhung der Rekombination modifiziert waren. Ein Klon wurde expandiert und mit 1×10^8 λ -ko2-Phagen transduziert. Die rekombinierten λ -ko2-TN-N-Phagen wurden gesammelt und nach Phagentiter-Bestimmung (2×10^7 Pfu/ μ l) wurden 2×10^{10} λ -ko2-TN-N-Phagen zur Transduktion von JM107RS Bakterien verwendet, die so modifiziert waren, dass sie die lineare Phagen-DNA zirkularisieren konnten. Über die integrierte Tetrazyklin-Kassette wurde nach erfolgreich rekombinierten Klonen selektiert, die DNA vier resistenter Klone isoliert, sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit der genomischen TN-N-Sequenz (Genbank Zugangsnummer NT_039185.7) abgeglichen (vgl. Abb. 4.2).

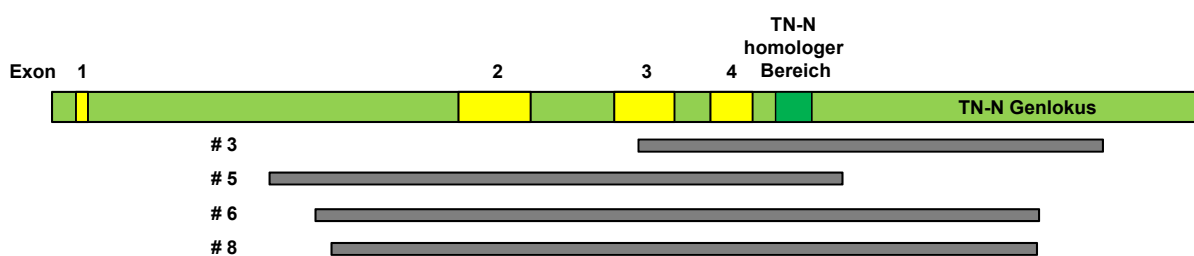


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Sequenzabgleichs der nach *Phagenscreen* erhaltenen TN-N-Sequenzen mit dem TN-N-Lokus (NT_039185.7). Die Exone 1-4 sind als gelbe Kästchen dargestellt, die Intronregion ist hellgrün, der für den *Phagenscreen* verwendete TN-N homologe Bereich ist als dunkelgrünes Kästchen hervorgehoben. Die Sequenzen #6 und #8 umfassten die Exone 2, 3 und 4 sowie ausreichend große Intronsequenzen 3' von Exon 4 und 5' von Exon 2.

IV. Ergebnisse

Klon #3 bestand aus 7706 bp, die 181 bp des Exons 3, Intron 3, Exon 4 und 6496 bp der Intronregion 3' von Exon 4 entsprachen.

Die 8503 bp lange DNA des Klons #5 bestand aus 4282 bp des ersten Introns, dem TN-N-genomischen Bereich der Exone 2-4 und 1311 bp der Intronregion 3' von Exon 4.

Klon #6 enthielt ein 12155 bp langes DNA Fragment, das den TN-N-genomischen Bereich der Exone 2-4 sowie 3431 bp der Intronsequenz 5' von Exon 2 und 5917 bp der Intronsequenz 3' von Exon 4 einschloss.

Die 12140 bp große DNA-Sequenz des Klons #8 entsprach der Sequenz von Klon #6, mit dem Unterschied, dass die Intronsequenz 5' von Exon 2 mit 3416 bp etwas kürzer war.

Die Klone #3 und #5 waren zur weiteren Verwendung ungeeignet, da sie nur Teile der gewünschten genomischen Sequenz enthielten. Die Klone #6 und #8 enthielten den gewünschten Bereich des TN-N-Lokus, der die Exone 2-4 sowie ausreichend große Intronsequenzen am 5' und 3' Ende einschloss, die als langer und kurzer homologer Arm bei der Konstruktion des Zielvektors dienten.

Klon #8 wurde zur Herstellung des TN-N Zielvektors ausgesucht. Die Tetrazyklin-Kassette wurde über *Ascl* entfernt und der Vektor religiert. Der daraus resultierende Vektor, der aus 3416 bp der Intronregion 5' von Exon 2 (kurzer homologer Arm), der 3808 bp langen genomischen Sequenz der Exone 2-4 und einer 5917 bp langen Intronregion 3' von Exon 4 (langer homologer Arm) bestand, wurde $\text{p}\lambda\text{-KO-2/TN-N hom}$ genannt und zur weiteren Manipulation in *pML104/Dh10 β* Zellen transformiert und elektrokompente Zellen hergestellt (*TNN hom/pML104/DH10 β*).

1.2 Manipulation des TN-N homologen Bereichs

Die einzelnen Schritte der Klonierung des TN-N Zielvektors sind in Abb. 4.3 schematisch dargestellt.

Im ersten Schritt wurde 366 bp 5' von Exon 2 eine loxP-Erkennungssequenz integriert. Hierfür wurde ein 5'TN-N loxP-tet Fragment über verschachtelte PCR amplifiziert, in dem eine loxP-tet-Sequenz von je 70 bp flankiert war, die homolog zu einer ausgewählten Intronregion 5' von Exon 2 war (vgl. Abb. 4.3 #1 und Abb. 4.4).

IV. Ergebnisse

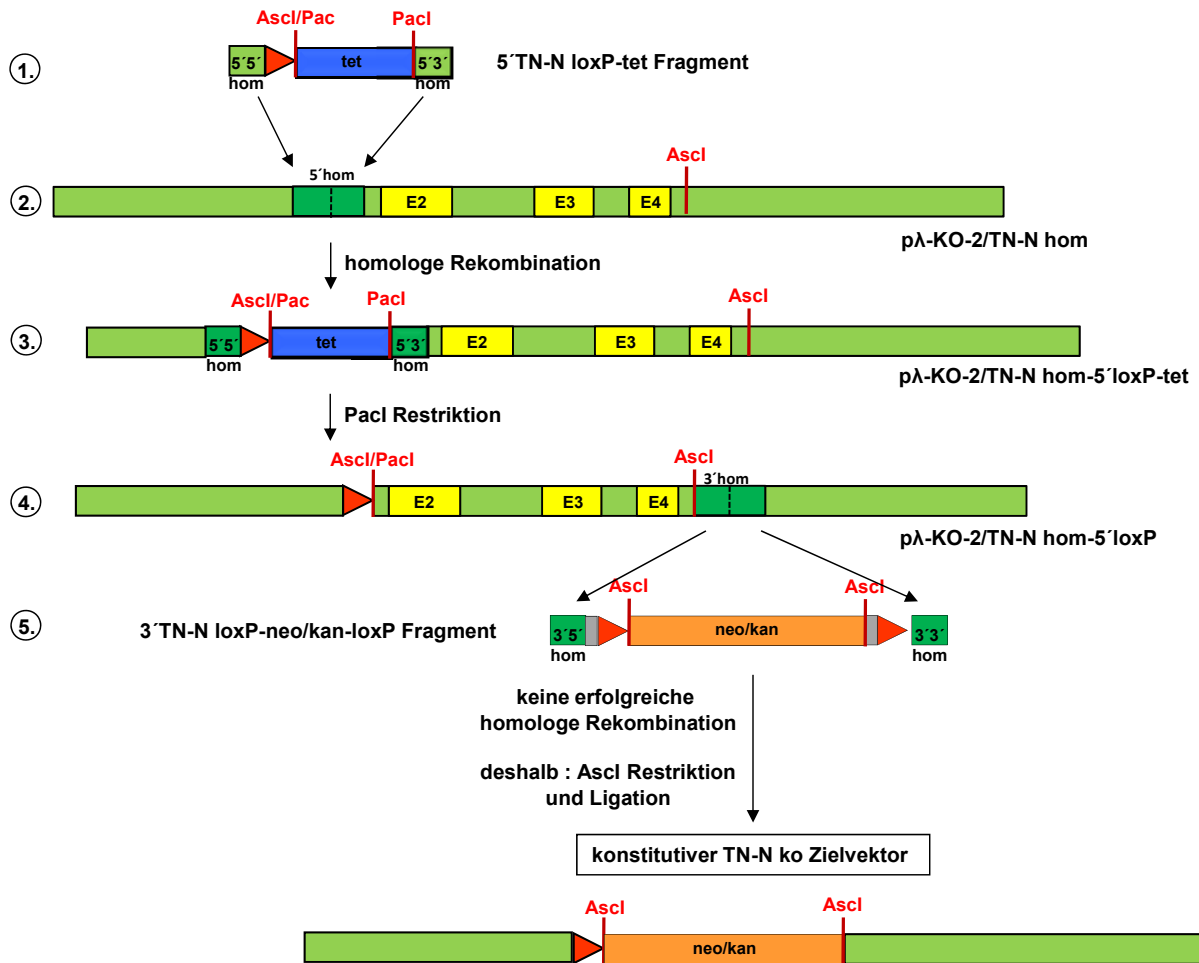


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des TN-N Zielvektors. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden durchnummeriert und werden im Text erläutert. Die Tetrazyklin-Kassette (tet) ist als blauer, die Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette (neo/kan) als orangefarbener Kasten dargestellt. Als homologe Regionen (hom) verwendete Bereiche sind dunkelgrün, die Exone (E 1-4) als gelber Kasten hervorgehoben. Die loxP-Erkennungssequenz ist als rotes Dreieck, die FRT-Sequenzen als graue Boxen dargestellt und die für die weitere Klonierung wichtigen Restriktionserkennungssequenzen (Ascl, PacI) markiert.

Der innere Vorwärtsprimer (TNN-55-FW2) wurde so konstruiert, dass er mit der loxP-Erkennungssequenz des Templates hybridisierte und dieses um 32 bp verlängerte, die homolog zum ausgesuchten TN-N-Lokus waren. Der innere Rückwärtsprimer (TNN-53-RV2) hybridisierte mit 30 bp der Tetrazyklinsequenz des Templates und verlängerte es um 30 bp, die zum ausgewählten TN-N-Lokus homolog waren. Als Template wurde das pGEM-TE/M5 5'loxP tet Plasmid verwendet, das eine Tetrazyklinsequenz, der 5' eine loxP-Erkennungssequenz vorgeschaltet war, enthielt. Der äußere Vorwärtsprimer (TNN-55-FW1) für die 2. PCR überlappte 20 bp mit dem inneren Vorwärtsprimer und verlängerte das PCR-Produkt um weitere 38 bp, die zum TN-N-Lokus homolog waren. Am 5' Ende wurde eine zusätzliche PmeI-Erkennungssequenz eingefügt. Der äußere Rückwärtsprimer (TNN-53-RV1) verlängerte das Amplifikat um 39 bp, die zur ausgewählten TN-N-Region homolog

IV. Ergebnisse

waren und überlappte 25 bp mit dem inneren Rückwärtsprimer. Auch hier wurde am 3' Ende eine zusätzliche PmeI-Erkennungssequenz eingefügt.

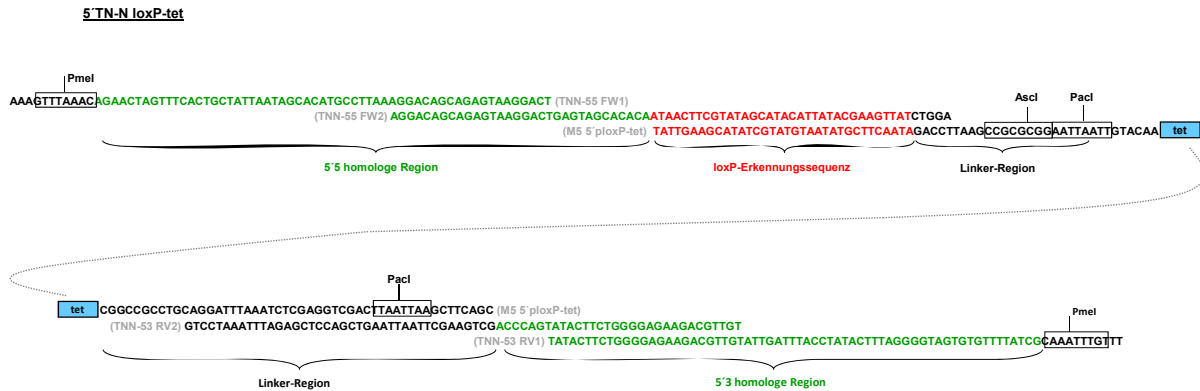


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Konstruktion des 5' TN-N loxP-tet Fragments über verschachtelte PCR. Zum TN-N-Lokus homologe Bereiche sind grün, die loxP-Erkennungssequenz rot, Linker-Regionen schwarz und je eine Hälfte der Tetrazyklincassette (tet) ist als blaues Kästchen gekennzeichnet. Die Bereiche, in denen die Primer miteinander oder mit der DNA hybridisierten, sind überlagert dargestellt. Restriktionserkennungssequenzen (PmeI, Ascl, PaclI), die für die weitere Klonierung verwendet wurden sind angegeben und mit einem schwarzen Kasten umrandet.

Die erfolgreiche Amplifikation des 1578 bp Fragments nach der zweiten PCR wurde in einem Agarosegel überprüft und das Fragment in den pGEM-TE Vektor kloniert. Nach Bestätigung der Sequenz durch Sequenzanalyse wurde das 1578 bp lange TNN loxP-tet Fragment über PmeI ausgeschnitten und 0,5 µg zur Elektroporation der TNN hom/pML104/DH10β Zellen (s. 1.1) eingesetzt.

Nach erfolgter homologer Rekombination und Selektion über Tetrazyklinresistenz (vgl. Abb. 4.3 #2) wurde die Tetrazyklin-Kassette über PaclI ausgeschnitten und der Vektor religiert (vgl. Abb. 4.3 #3). Die Sequenz des daraus resultierenden pλ-KO-2/TN-N hom 5'loxP Plasmids (vgl. Abb. 4.3 #4) wurde über Sequenzanalysen bestätigt und in pML104/DH10β Zellen transformiert. Aus diesen TN-N hom 5'loxP/pML104/DH10β Zellen wurden elektrokompente Zellen hergestellt.

Als nächstes wurde 357 bp 3' von Exon 4 eine FRT/loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Kassette integriert. Hierfür wurde über verschachtelte PCR eine loxP-neo/kan-loxP-Kassette am 3' und 5' Ende mit je 70 bp flankiert, die homolog zur ausgewählten Intronregion 3' von Exon 4 waren (vgl. Abb. 4.3 #5). Das Konstrukt wurde in zwei Teilstücken (3'5' TN-N und 3'3' TN-N homologes Fragment) amplifiziert, die später über eine einzelne SaclI-

IV. Ergebnisse

Erkennungssequenz in der Neomycin/Kanamycin-Sequenz zusammengesetzt wurden (vgl. Abb. 4.5).

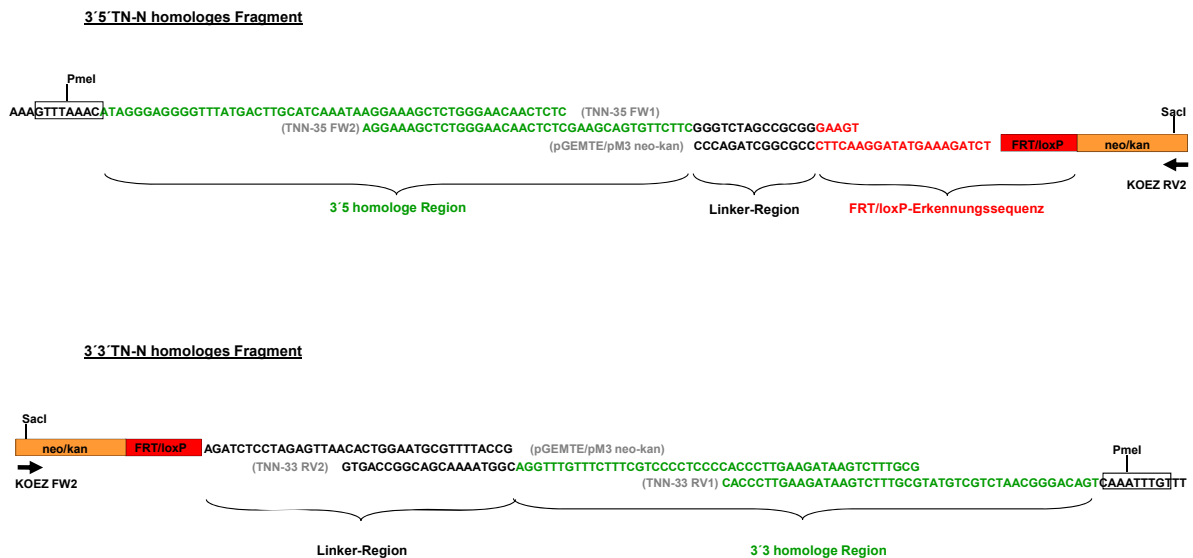


Abb. 4.5: Schematische Darstellung der Klonierung des 3' TN-N loxP-neo/kan-loxP Konstrukts über verschachtelte PCR. Das Konstrukt wurde in zwei Fragmenten (3'5' TN-N homologes Fragment und 3'3' TN-N homologes Fragment) kloniert, die über SacI innerhalb der Neomycin/Kanamycin-Sequenz (neo/kan) zusammengesetzt wurden. Zum TN-N-Lokus homologe Regionen sind grün, Linker-Regionen schwarz und FRT/loxP-Erkennungssequenzen rot gekennzeichnet. Die Bereiche, in denen die Primer miteinander oder mit der DNA hybridisierten, sind überlagert dargestellt. Die neo/kan-spezifischen Primer sind mit Richtungsangabe als schwarze Pfeile dargestellt. Zur weiteren Klonierung verwendete Restriktionserkennungssequenzen (PmeI, SacI) sind hervorgehoben.

Das 3'5' TN-N homologe Fragment bestand aus 70 bp, die homolog zur ausgewählten Intronregion 5' von Exon 4 des TN-N Gens waren, gefolgt von einer kurzen Linker-Region, einer FRT/LoxP-Erkennungssequenz und der 5' Hälfte der Neomycin/Kanamycin-Kassette. Zur Amplifikation wurde ein innerer Vorwärtsprimer (TNN-35-FW2) ausgewählt, der 5 bp der FRT/loxP-Erkennungssequenz und 16 bp der Linker-Region des pGEM-TE/pM3 neo-kan Templates erkannte und das Amplifikat um 39 bp verlängerte, die homolog zur ausgewählten Intronregion 5' von Exon 4 waren. Der äußere Vorwärtsprimer (TNN-35-FW1) hybridisierte mit 24 bp des inneren Vorwärtsprimers und verlängerte das PCR-Produkt um 31 bp, die dem TN-N-Lokus homolog waren. Am äußeren 5' Ende wurde eine zusätzliche PmeI-Erkennungssequenz integriert. Der Rückwärtsprimer (KOEZ RV2), der für beide Reaktionen verwendet wurde, hybridisierte innerhalb der Neomycin/Kanamycin-Kassette.

Um das 3'3' TN-N homologe Fragment zu klonieren, das aus der 3' Hälfte der Neomycin/Kanamycin-Kassette, einer FRT/loxP-Erkennungssequenz, einer Linker-Region und 70 bp, die homolog zum ausgesuchten TN-N-Lokus waren, bestand, wurde ein innerer

IV. Ergebnisse

Rückwärtsprimer (TNN-33-RV2) verwendet, der 20 bp der Linker-Region des pGEM-TE/M3 neo-kan Templates erkannte und das PCR-Produkt um 49 bp des TN-N-Lokus verlängerte. Der äußere Rückwärtsprimer (TNN-33-RV1) hybridisierte mit 24 bp des inneren Primers und verlängerte das Amplifikat um weitere 21 bp, die homolog zur Intronregion 3' von Exon 4 waren. Außerdem wurde am äußeren 5' Ende eine PmeI-Erkennungssequenz integriert. Der Vorwärtsprimer für beide PCRs (KOEZ FW2) hybridisierte innerhalb der Neomycin/Kanamycin-Kassette und wurde so ausgewählt, dass das 3'3' TN-N homologe Fragment und das 3'5' TN-N homologe Fragment überlappten und eine einzelne SacI-Erkennungssequenz einschlossen. Über diese und eine weitere SacI-Erkennungssequenz im pGEM-TE Vektor, konnten die beiden Fragmente später zusammengesetzt werden.

Das 1637 bp lange 3'5' TN-N homologe Fragment und das 1599 bp lange 3'3' TN-N homologe Fragment wurden nach Adenylierung in den pGEM-TE-Vektor ligiert (pGEM-TE/3'5'TN-N und pGEM-TE/3'3'TN-N) und sequenziert. Nachdem die Sequenz bestätigt und die Orientierung der Fragmente im Vektor bestimmt wurde, wurde pGEM-TE/3'3'TN-N über Restriktion mit SacI linearisiert und das 1637 bp lange 3'5' TN-N homologe Fragment über SacI aus dem Vektor isoliert. Nach Gelaufreinigung und Ligation der beiden Fragmente zu pGEM-TE/3'TN-N loxP-neo/kan-loxP wurde die Sequenz über Sequenzanalysen bestätigt. Das 3167 bp lange 3'TN-N loxP-neo/kan-loxP Insert wurde über PmeI aus dem Vektor isoliert, aufgereinigt und 0,5 µg zur Elektroporation der im vorigen Schritt hergestellten TN-N hom 5'loxP/pML104/DH10β Zellen verwendet.

Es konnte jedoch auch nach acht Versuchen keine Rekombination des 3'TN-N loxP-neo/kan-loxP Fragments in den TN-N-Lokus nachgewiesen werden, weshalb die Strategie, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, geändert wurde.

1.3 Ersetzen der Exone 2-4 durch die Neomycin/Kanamycin-Kassette

Da die Integration des 3'TN-N loxP-neo/kan-loxP Fragments in den TN-N-Lokus über homologe Rekombination nicht erfolgreich war, wurde die Strategie zur Herstellung des TN-N Zielvektors geändert.

Bei der Isolierung des TN-N-Genlokus mit Hilfe der λ-ko2 Phagenbibliothek wurde eine Ascl-Erkennungssequenz 3' von Exon 4 eingefügt (vgl. S.77 1.1). Außerdem wurde mit der 5'loxP-Erkennungssequenz 5' von Exon 2 eine weitere Ascl-Erkennungssequenz in das pTN-N hom 5'loxP Plasmid eingefügt (vgl. Abb. 4.3 #3). Da auch die Neomycin/Kanamycin-Kassette des 3' TN-N loxP-neo/kan-loxP Fragments von Ascl-Erkennungssequenzen flankiert war, konnte über Ascl-Restriktion die TN-N-genomische Region der Exone 2-4

IV. Ergebnisse

gegen die Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette ausgetauscht werden. Es wurde ein 3646 bp Fragment des TN-N-Lokus entfernt, das aus 390 bp der Intronregion 5' von Exon 2, den Exonen 2, 3 und 4 sowie 375 bp der Intronregion 3' von Exon 4, bestand. Die eingefügte Neomycin/Kanamycin-Kassette bestand aus 2877 bp.

Der resultierende 11465 bp lange TN-N Zielvektor bestand aus einem 3047 bp langen kurzen Arm, der mit dem 3' Ende von Intron 1 identisch war, einer einzelnen loxP-Erkennungssequenz, einer Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette und 5541 bp, die dem 5' Ende von Intron 5 homolog waren. Der TN-N Zielvektor wurde zur Herstellung einer konstitutiven TN-N^{-/-} Maus in die ES-Zellen transfiziert.

1.4 Veränderung des TN-N-Lokus in mausembryonalen Stammzellen und Nachweis positiver Klone über Southern-Blot-Analyse

Der TN-N Zielvektor wurde über PmeI linearisiert und 30 µg dieser DNA zur Elektroporation von 1x10⁷ IDG32 ES-Zellen zur homologen Integration in den TN-N-Lokus eingesetzt (vgl. Abb. 4.6). Nach Selektion über Geneticin (G418) wurden 288 resistente Klone gepickt und die genomische DNA aufgereinigt. Über PCR und Southern-Blot-Analysen wurde anschließend die erfolgreiche Rekombination überprüft.

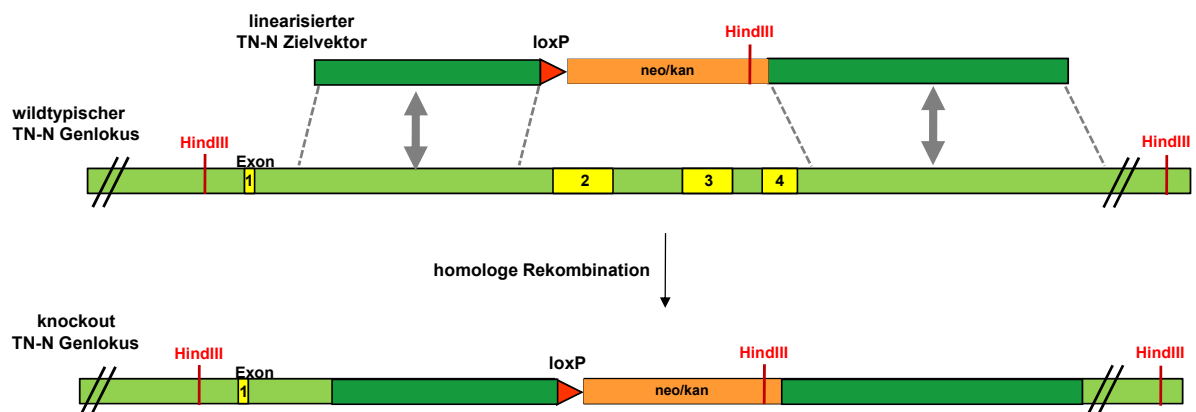


Abb. 4.6: Schematische Darstellung des Rekombinationsereignisses in ES-Zellen. TN-N-Regionen, die als langer und kurzer homologer Arm des Zielvektors dienen, sind dunkelgrün hervorgehoben, die Exone sind als gelbe Kästchen, die loxP-Erkennungssequenz als rotes Dreieck und die Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette (neo/kan) als orangefarbener Kasten dargestellt. Des Weiteren sind die Positionen der Restriktionssequenzen (HindIII) eingezeichnet.

IV. Ergebnisse

Um erfolgreich homolog rekombinierte ES-Zellklone über PCR zu identifizieren, wurden zwei alternative Vorwärtsprimer (TNNgeno FW1 und TNNgeno FW2) konstruiert, die mit der genomischen DNA 127 bp, bzw. 228 bp 5' des kurzen Armes des TN-N Zielvektors hybridisierten. Die beiden alternativen Rückwärtsprimer zur Identifizierung der rekombinierten ES-Zellklone (neo-seq RV1 und neo-seq RV2) hybridisierten innerhalb der ersten 70 bp der Neomycin/Kanamycin-Kassette (vgl. Abb. 4.7 B). Die amplifizierten Knockout-Fragmente der unterschiedlichen Primer-Kombinationen (vgl. Tab. 4.1) sind ca. 3300-3400 bp groß. Als Positivkontrolle wurde auch das Wildtyp-Fragment amplifiziert. Hierzu wurden die gleichen Vorwärtsprimer, wie zur Amplifikation der Knockout-Fragmente verwendet und der entsprechende Rückwärtsprimer (TNNgeno RV1) wurde so gewählt, dass die PCR-Produkte ungefähr die gleiche Größe besaßen, wie das Knockout-PCR-Produkt (vgl. Abb. 4.7 A).

	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Fragmentgröße
Knockout	TNNgeno FW1	neo-seq RV1	3281 bp
		neo-seq RV2	3311 bp
	TNNgeno FW2	neo-seq RV1	3383 bp
		neo-seq RV2	3413 bp
Wildtyp	TNNgeno FW1	TNNgeno RV1	3297 bp
	TNNgeno FW2		3399 bp

Tab. 4.1: Übersicht über die verwendeten Primer-Kombinationen zur Genotypisierung der ES-Zellklone nach homologer Rekombination in ES-Zellen.

Es konnten jedoch weder das wildtypische, noch das Knockout-Fragment spezifisch amplifiziert werden. Auch Veränderungen der MgCl₂ Konzentrationen (0,5-3 mM MgCl₂), der Anlagerungstemperatur (58°C-69°C) und die Verwendung unterschiedlicher Polymerasen (*AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity*, verschiedene *Taq Polymerasen*, *Phusion™ Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase*, *Pfu DNA Polymerase*, *Taq DNA Polymerase*) führte zu keiner erfolgreichen Amplifikation. Daher wurde beschlossen, homolog rekombinierte Klone direkt über Southern-Blot-Analysen nachzuweisen.

Für die Southern-Blot-Analysen wurden über PCR drei verschiedene Sonden amplifiziert. Sonde 1 (Primer: TNN-Sonde-FW1 und TNN-Sonde-RV1) hybridisierte mit der genomischen Region 227 bp 5' des Zielvektors, Sonde 2 (Primer: TNN-Sonde 2 FW und TNN-Sonde 2 RV) hybridisierte 3156 bp 5' des Zielvektors und Sonde 3 (Primer: TNN-Sonde 3 FW und TNN-Sonde 3 RV) hybridisierte 2302 bp 5' des Zielvektors (vgl. Abb. 4.7). Als Template für die PCRs wurde genomische DNA verwendet, die aus Schwanzbiopsien

IV. Ergebnisse

wildtypischer Mäuse isoliert wurde. Die Sonden wurden in den pGEM-TE Vektor kloniert, die Sequenz über Sequenzierung bestätigt und über die beiden NotI Erkennungssequenzen des Vektors wieder isoliert.

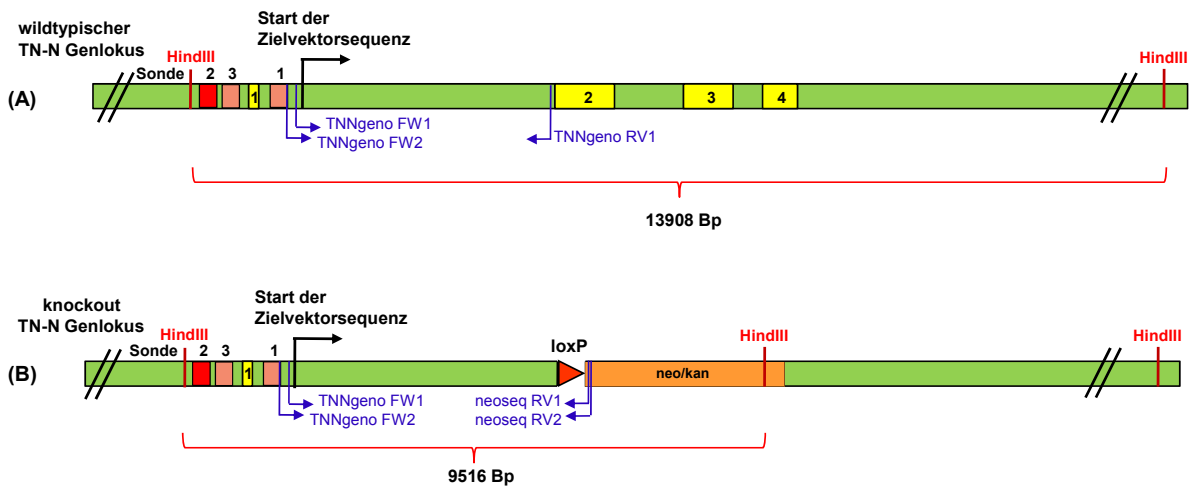


Abb. 4.7: Schematische Darstellung des Nachweises der wildtypischen und Knockout-DNA über PCR und Southern-Blot-Analysen. Die Positionen der Sonden 1 und 3 sind hellrot dargestellt, Sonde 2 ist dunkelrot hervorgehoben. Die verschiedenen Primer sind blau eingezeichnet. Des Weiteren sind die für Southern-Blot-Analysen verwendeten Erkennungssequenzen (HindIII) und die resultierenden DNA Fragmente eingezeichnet. Die Exone sind als gelbe Kästchen, die Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette (neo/kan) als orangener Kasten und die loxP-Erkennungssequenz als rotes Dreieck eingezeichnet.

Alle drei Sonden wurden im Southern-Blot auf Wildtyp-DNA, die zuvor mit HindIII gespalten wurde, getestet. Hierzu wurden die Sonden-Fragmente mit ^{32}P dCTP radioaktiv markiert und die Test-Blots über Nacht bei 60°C mit den radioaktiven Sonden hybridisiert.

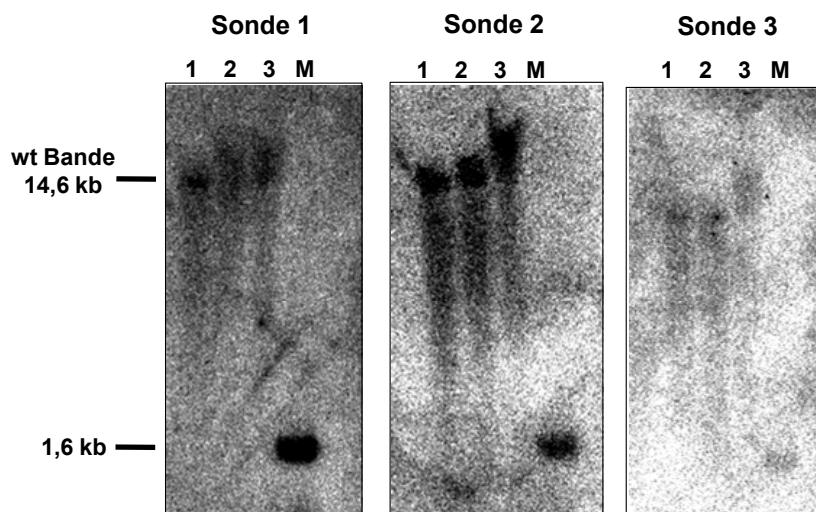


Abb. 4.8: Southern-Blot-Analysen zum Testen der TN-N-Sonden 1, 2 und 3. Es wurden 3 verschiedene DNA Proben (1-3) und der DNA-Marker (M) aufgetragen. Die errechnete Höhe der wildtypischen Banden (wt Bande), sowie die 1,6 kb Markerbande sind markiert.

IV. Ergebnisse

Es wurden genomische DNAs aus drei verschiedenen Präparationen mit HindIII geschnitten, wobei Probe drei nur unvollständig geschnitten war. Mit Sonde 2 konnten die 14,6 kb große Wildtyp-Bande am besten detektiert werden (vgl. Abb. 4.8), weshalb diese Sonde zur Analyse der ES-Zellklone verwendet wurde.

Die genomische DNA der ES-Zellen wurde mit HindIII gespalten, auf eine Nylon Membran gebロットet und die Membran mit ^{32}P radioaktiv markierter TN-N Sonde 2, über Nacht bei 60°C hybridisiert.

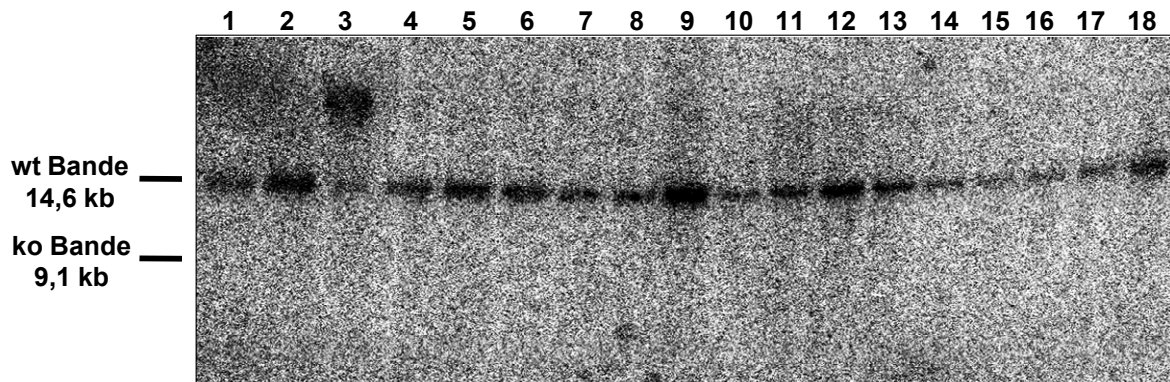


Abb. 4.9: Nachweis der homologen Rekombination im Southern-Blot. Dargestellt ist die DNA von 18 verschiedenen ES-Zellklonen (1-18). Die errechnete Höhe der erwarteten Banden für den Wildtyp (wt Bande) und für den Knockout (ko Bande) sind eingezeichnet. Die DNA in Spur 3 ist nicht vollständig gespalten.

Die HindIII-Restriktion des wildtypischen Allels erzeugte ein Fragment, das im Southern-Blot bei 14,6 kb zu detektieren war, das Knockout-Allel war bei 9,1 kb zu detektieren. In Abb. 4.9 ist ein repräsentativer Blot dargestellt. Die 14,6 kb Bande zum Nachweis des Wildtyp-Lokus war klar zu erkennen, es konnte jedoch für keinen der 288 gepickten ES-Zellklone die 9,1 kb Knockout-Bande nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.9).

2. Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer CHST-12 KO-Maus

Der CHST-12-Genlocus der Maus liegt auf Chromosom 5 und besteht aus 2 Exonen, von denen jedoch nur Exon 2 kodierend ist. Um eventuelle Promoter- oder Enhancer-Regionen 5' von Exon 2 nicht zu zerstören, wurde beschlossen, die loxP-Erkennungssequenz 23 bp vor das Start ATG in das Exon 2 zu setzen, die Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette wurde 673 bp 3' von Exon 2 integriert.

Das pBCM1B8II Plasmid, das aus einem 8,18 kb BamHI-Fragment des CHST-12-Genlocus, welches aus Exon 2 sowie 2523 bp 5' von Exon 2 und 3960 bp 3' von Exon 2 bestand, wurde mit BamHI geschnitten und das 8,18 kb CHST-12 Fragment in den pBlueIIks+ Vektor kloniert. Das daraus resultierende pBlueIIks+/CHST-12 hom Plasmid wurde in pML104/DH10 β Zellen transformiert und elektrokompente Zellen hergestellt, die als CHST-12 hom/pML104/DH10 β Zellen bezeichnet wurden.

2.1 Integration einer 5'loxP-Erkennungssequenz

Um die 5'loxP-Erkennungssequenz in den CHST-12-Lokus einzufügen, wurde über verschachtelte PCR ein 5'CHST-12 loxP-tet-loxP Konstrukt amplifiziert (vgl. Abb. 4.10 und Abb. 4.11 #1). Dieses Konstrukt bestand aus einer loxP-tet-loxP-Kassette, die 5' und 3' mit je 70 bp langen DNA-Sequenzen flankiert wurde, die homolog zu ausgewählten Bereichen des CHST-12-Lokus waren. Als Template für die verschachtelten PCRs diente das Plasmid ploxP-tet-loxP, das eine mit loxP-Erkennungssequenzen flankierte Tetrazyklinsequenz enthielt. Um unspezifische Bindungen der Primer an die loxP-Sequenzen zu verhindern, wurde das Konstrukt in zwei Schritten amplifiziert und die beiden Teilstücke (5'5'CHST-12 homologes Fragment und 5'3'CHST homologes Fragment) anschließend über eine einzelne BamHI-Erkennungssequenz innerhalb der Tetrazyklinsequenz zusammengesetzt.

Das 5'5'CHST-12 homologe Teilstück des 5'CHST-12 loxP-tet-loxP Konstrukts bestand aus 70 bp, die homolog zu den ersten 56 bp von Exon 2, sowie zu den letzten 14 bp des Intron 1 des CHST-12-Gens waren (vgl. Abb. 4.10). Dieser homologen Region schloss sich eine loxP-Erkennungssequenz, eine kurze Linker-Sequenz und die 5' Hälfte der Tetrazyklinsequenz an. Der innere Vorwärtsprimer (CHST12-55-FW2) für die verschachtelte PCR wurde so gewählt, dass er mit der ersten loxP-Erkennungssequenz des ploxP-tet-loxP Templates hybridisierte und dieses um 32 Basen, die homolog zum gewählten CHST-12-Lokus waren, verlängerte. Der äußere Vorwärtsprimer (CHST12-55-FW1) für die zweite PCR überlappte 22 bp mit der Sequenz des inneren Primers, verlängerte das PCR-Produkt um

IV. Ergebnisse

weitere 38 bp, die homolog zum CHST-12-Lokus waren und besaß am 5' Ende eine zusätzliche PmeI-Erkennungssequenz. Der Rückwärtsprimer (tet RV1) hybridisierte innerhalb der Tetrazyklinsequenz und blieb für die innere und äußere PCR-Reaktion gleich. Die erfolgreiche Amplifikation des 519 bp großen PCR-Produkts wurde in einem Agarosegel überprüft.

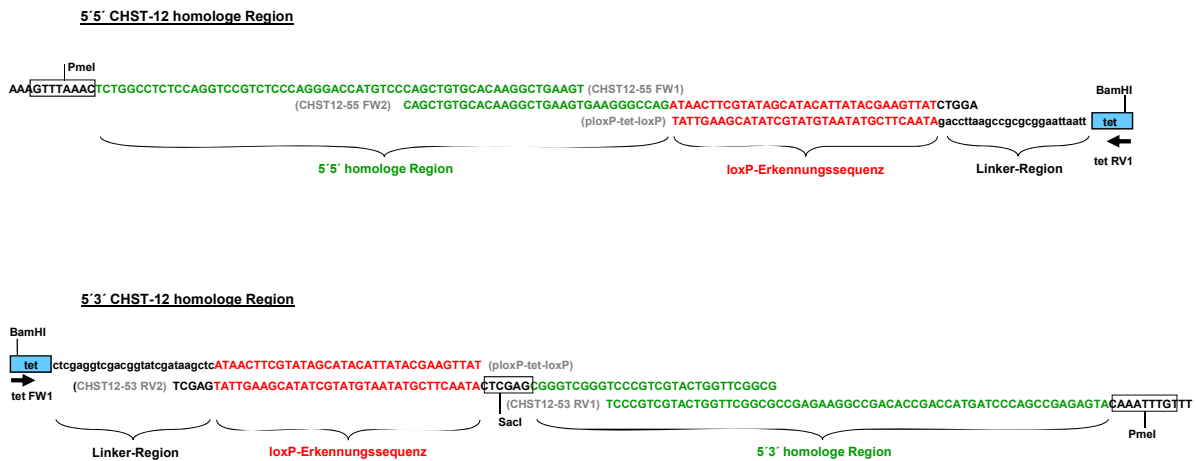


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Klonierung des 5'CHST-12 loxP-tet-loxP Konstrukts über verschachtelte PCR. Das Konstrukt wurde in zwei Schritten hergestellt und die beiden Fragmente (5'5'CHST-12 homologe Region und 5'3'CHST-12 homologe Region) über eine einzelne BamHI-Erkennungssequenz in der Tetrazyklinsequenz (tet) zusammengesetzt. Die Bereiche, in denen die Primer miteinander oder mit der DNA hybridisierten, sind überlagert dargestellt. Die Position der zur weiteren Klonierung verwendeten Restriktionserkennungssequenzen sind hervorgehoben und die Tetrazyklin-spezifischen Primer sind mit Richtungsangaben als schwarze Pfeile dargestellt.

Das 5'3'CHST-12 homologe Teilstück des 5'CHST-12 loxP-tet-loxP Konstrukts bestand aus der 3' Hälfte der Tetrazyklinsequenz, einer kurzen Linker-Region, einer loxP-Erkennungssequenz und 70 bp, die homolog zu den Basen 57-133 des Exon 2 des CHST-12-Gens waren (vgl. Abb. 4.10). Die Basen 60-61 (TGG) wurden hierbei gegen CTC ersetzt, um eine SacI-Erkennungssequenz in den CHST-12-Lokus einzufügen, die in Southern-Blot-Analysen, nach Rekombination in ES-Zellen, die Identifizierung erfolgreich homolog rekombinierter Klone ermöglichen sollte.

Für die verschachtelte PCR dieses Konstrukts wurde der innere Rückwärtsprimer (CHST12-53-RV2) so konstruiert, dass er die 3' gelegene loxP-Erkennungssequenz des ploxP-tet-loxP Templates erkannte und um 30 bp, die homolog zum gewählten CHST12-Lokus waren, verlängerte. Außerdem wurde, wie oben beschrieben, zwischen der loxP-Erkennungssequenz und der 5'3'homologen Region eine zusätzliche SacI-Erkennungssequenz eingefügt. Der äußere Rückwärtsprimer (CHST12-53-RV1) für die

IV. Ergebnisse

zweite PCR überlappte 21 bp mit dem inneren Rückwärtsprimer und verlängerte das erste PCR-Produkt um weitere 40 bp, die dem gewählten 5'3'homologen Bereich entsprachen. Am 3' Ende des Primers wurde eine zusätzliche PmeI-Erkennungssequenz eingefügt. Der verwendete Vorwärtsprimer (tet FW1) innerhalb der Tetrazyklinsequenz wurde so gewählt, dass das 5'5'CHST-12 homologe Fragment mit dem 5'3'CHST-12 homologen Fragment überlappte und über eine einzelne BamHI-Erkennungssequenz innerhalb der Tetrazyklinsequenz zusammengesetzt werden konnte. Die erfolgreiche Amplifikation des 1107 bp großen Fragments wurde in einem Agarosegel überprüft.

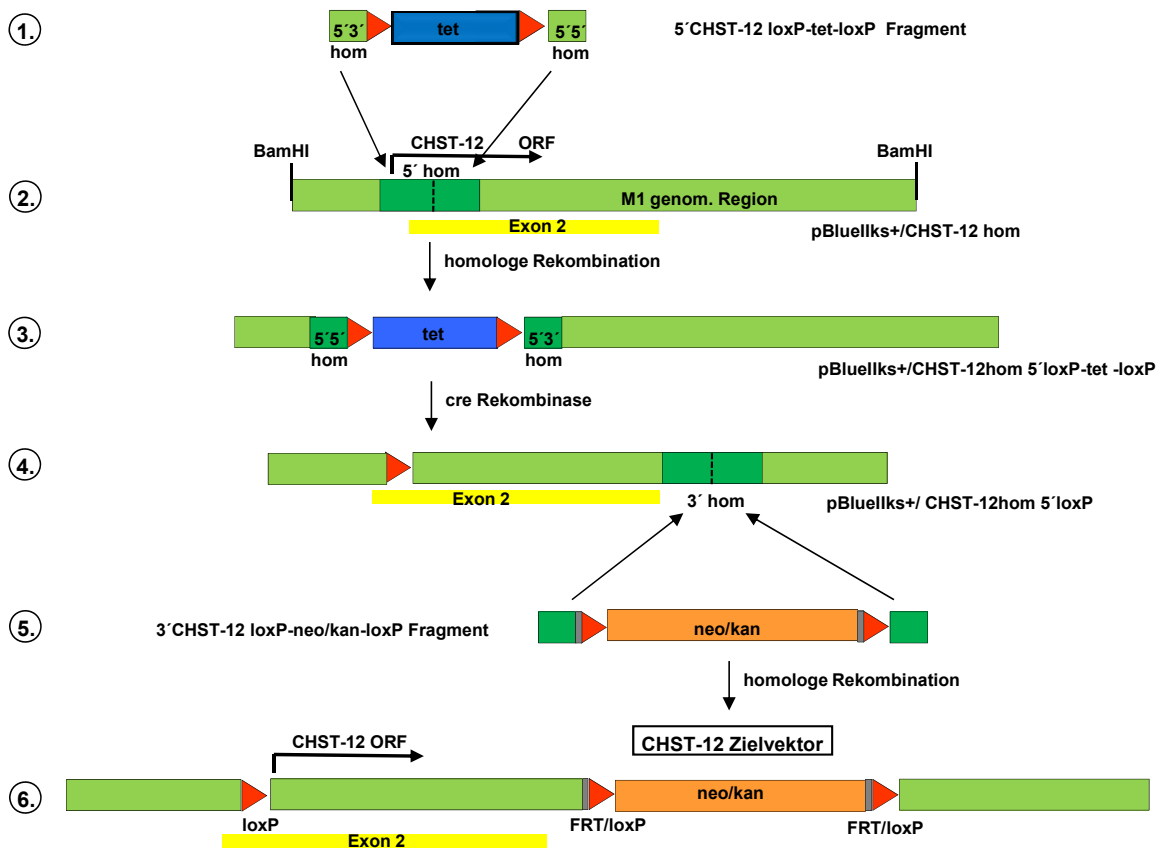


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des CHST12 Zielvektors. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden durchnummeriert und werden im Text erläutert. Die Tetrazyklin-Kassette (tet) ist als blauer, die Neomycin/Kanamycin-Resistenzkassette (neo/kan) als orangener Kasten dargestellt. Als homologe Regionen (hom) verwendete Bereiche sind dunkelgrün, Exon 2 ist als gelber Balken hervorgehoben. Die loxP-Erkennungssequenzen sind als rote Dreiecke, die FRT-Sequenzen als graue Boxen dargestellt.

Die 5' und 3' Teilstücke des 5'CHST12 loxP-tet-loxP Konstrukts wurden über ein präparatives Gel aufgereinigt und nach Adenylierung in den pGEM-TE-Vektor ligiert (pGEM-TE/5'5'CHST-12 hom und pGEM-TE/5'3'CHST-12 hom). Durch Sequenzanalyse wurde die Richtigkeit der Sequenzen und die Orientierung der PCR-Produkte im Vektor

IV. Ergebnisse

überprüft. Mit Hilfe der BamHI-Erkennungssequenz innerhalb der Tetrazyklinsequenz und einer einzelnen NcoI-Erkennungssequenz aus dem pGEM-TE-Vektor konnte pGEM-TE/5'3'CHST-12 hom linearisiert und das 519 bp große 5'3'CHST-12 hom Insert aus dem Vektor isoliert werden. Nach Aufreinigung über ein präparatives Gel wurden die beiden Fragmente zu 5'CHST12 pGEM-TE/loxP-tet-loxP ligiert und die Sequenz über Sequenzanalysen bestätigt.

Um das 5'CHST12 loxP-tet-loxP Fragment in die elektrokompetenten CHST-12 hom/pML104DH10 β Zellen zu elektroporieren wurde das 1612 bp große Insert über PmeI aus dem pGEM-T Easy Vektor ausgeschnitten und 0,5 μ g für die Elektroporation eingesetzt. (vgl. Abb. 4.11 #2). Erfolgreich rekombinierte Klone wurden über Tetrazyklinresistenz selektiert, die DNA isoliert und nach Sequenzanalyse, zum Deletieren der Tetrazyklin-Kassette über das Cre-loxP-System, in BNN 132 Zellen mit endogener Cre-Rekombinase transformiert (vgl. Abb. 4.11 #3). Die daraus resultierende pBlueIIks+/CHST-12 hom 5'loxP DNA wurde isoliert (vgl. Abb. 4.11 #4), die Deletion der Tetrazyklin-Kassette über Sequenzanalyse bestätigt und das Plasmid in pML104/DH10 β Zellen transformiert, um elektrokompetente Zellen herzustellen, die als CHST-12 hom 5'loxP/pML104/DH10 β bezeichnet wurden.

2.2 Integration einer loxP-neo/kan-loxP-Kassette

Um die 3' loxP-neo/kan-loxP-Kassette einzufügen, wurde über verschachtelte PCR ein 3'CHST-12 loxP-neo/kan-loxP Fragment kloniert (vgl. Abb. 4.11 #5 und Abb. 4.12). Dieses Fragment bestand aus einer FRT/loxP-flankierten Neomycin/Kanamycin-Kassette, die 3' und 5' von einer Linker-Region und je 70 bp langen Sequenzen flankiert war, die homolog zur genomischen Sequenz 603 bp stromabwärts von Exon 2 waren. Als Template diente das pM3 neo-kan/pGEM-TE Plasmid, das unter anderem eine Neomycin/Kanamycin-Kassette, die 3' und 5' von FLT und loxP-Sequenzen flankiert wurde, enthielt.

Ebenso wie das 5'CHST-12 loxP-tet-loxP Konstrukt, wurde auch dieses Fragment in zwei Schritten (3'5'CHST-12 homologes Fragment und 3'3'CHST-12 homologes Fragment) amplifiziert, um unspezifische Bindungen der Primer an die loxP-Erkennungssequenzen zu minimieren (vgl. Abb. 4.12).

Zur Amplifikation des 3'5'CHST-12 homologen Teilstücks wurde der innere Vorwärtsprimer (CHST12-35-FW2) so ausgewählt, dass er mit den ersten 5 Basen der ersten FRT-Sequenz des Templates sowie der 14 bp Linker-Region hybridisierte und diese um 42 bp verlängerte, die homolog zur ausgewählten Region des CHST-12-Lokus waren. Der äußere

IV. Ergebnisse

Vorwärtsprimer (CHST12-35-FW1) für die zweite PCR überlappte 21 bp mit der Sequenz des inneren Primers und verlängerte das PCR-Produkt um 28 bp, die homolog zur ausgewählten genomischen CHST-12-Region waren. Zusätzlich wurde eine 5' PmeI-Erkennungssequenz eingefügt. Der Rückwärtsprimer (KOEZ RV2), der für beide PCR-Reaktionen verwendet wurde, hybridisierte innerhalb der Neomycin/Kanamycin-Kassette. Das resultierende 1566 bp große Fragment wurde in einem Agarosegel überprüft.



Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Klonierung des 3'CHST-12 loxP-neo-kan-loxP Konstrukts über verschachtelte PCR. Das Konstrukt wurde in zwei Teilfragmenten (3'5'CHST-12 homologe Region und 3'3'CHST-12 homologe Region) kloniert, die über eine einzelne SacI-Erkennungssequenz innerhalb der Neomycin/Kanamycin-Sequenz (neo/kan) zusammengesetzt wurden. Die Bereiche, in denen die Primer miteinander oder mit der DNA hybridisierten, sind überlagert dargestellt. Die Neomycin/Kanamycin-spezifischen Primer sind mit Richtungsangaben als schwarze Pfeile dargestellt. Zur weiteren Klonierung verwendete Restriktions-Erkennungssequenzen (SacI, PmeI) sind hervorgehoben.

Das 3'3'CHST-12 homologe Teilstück bestand aus der 3' Hälfte der Neomycin/Kanamycin-Kassette, gefolgt von einer FRT/loxP-Sequenz, einer Linker-Sequenz und 70 bp, die homolog zur ausgewählten Sequenz 3' von Exon 2 waren (vgl. Abb. 4.12). Der innere Rückwärtsprimer (CHST12-33-RV2) hybridisierte mit 20 bp der Linker-Sequenz des Templates und verlängerte das PCR-Produkt um 41 bp, die homolog zur Intronsequenz des CHST-12-Lokus waren. Der äußere Rückwärtsprimer (CHST12-33-RV1) der zweiten PCR überlappte 11 bp mit dem inneren Rückwärtsprimer und verlängerte das erste PCR-Produkt um weitere 29 bp, die der ausgesuchten Intronregion entsprachen. Am 3' Ende des Primers wurde eine zusätzliche PmeI-Erkennungssequenz eingefügt. Der Vorwärtsprimer (KOEZ FW2) beider PCR-Reaktionen, innerhalb der Neomycin/Kanamycin-Kassette, wurde so gewählt, dass das PCR-Produkt mit dem 3'5'CHST-12 homologen Fragment überlappte und eine einzelne SacI-Erkennungssequenz in der Neomycin/Kanamycin-Kassette besaß,

IV. Ergebnisse

über die die beiden Fragmente später ligiert werden konnten. Das 1702 bp große PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel analysiert.

Die 3'5'CHST-12 und 3'3'CHST-12 homologen Fragmente wurden nach Adenylierung in den pGEM-TE-Vektor ligiert (pGEM-TE/3'5'CHST-12 hom, pGEM-TE/3'3'CHST-12 hom), die Richtigkeit der Sequenz über Sequenzanalysen bestätigt und die Orientierung der Inserts im Vektor bestimmt. Durch Restriktion mit SacI wurde pGEM-TE/3'3'CHST-12 hom linearisiert und aus pGEM-TE/3'5'CHST-12 hom das 1566 bp große Insert isoliert. Die beiden Fragmente wurden über ein präparatives Gel aufgereinigt und zu pGEM-TE/CHST-12 loxP-neo-kan-loxP ligiert (vgl. Abb. 4.11 #5). Das Plasmid wurde sequenziert und das 3189 bp große CHST-12 loxP-neo-kan-loxP Insert über PmeI aus dem pGEM-TE Vektor ausgeschnitten. Nach Aufreinigung wurden 0,5 µg DNA zur Elektroporation der zuvor hergestellten CHST-12 hom 5'loxP/pML104/DH10β Zellen verwendet.

Der aus der homologen Rekombination des CHST-12 loxP-neo-kan-loxP Fragments in die CHST-12 hom 5'loxP DNA resultierende CHST-12 Zielvektor bestand aus 8,18 kb des CHST-12-Lokus, die das Exon 2 einschlossen. Im Exon 2 wurde 23 bp vor dem Start ATG eine einzelne loxP-Erkennungssequenz integriert, der unmittelbar eine SacI-Erkennungssequenz folgte. 603 bp 3' von Exon 2 wurde eine FRT/loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Kassette integriert (vgl. Abb. 4.11 #5).

Dieser Vektor kann nun zur Transfektion von Maus ES-Zellen verwendet werden.

Projekt 2

Analyse der CHST-14 KO-Maus

Um die Funktion der Dermatan-spezifischen Sulfotransferase (CHST-14) *in vivo* zu untersuchen, wurde in unserem Labor eine CHST-14 KO-Maus (CHST-14^{-/-}) generiert. Da diese Sulfotransferase unter anderem für die Sulfatierung der Chondroitin/Dermatansulfat-Proteoglykane verantwortlich ist und bekannt ist, dass diese Glykoproteine einen negativen Einfluss auf die Regeneration des ZNS haben, sollte die funktionelle Regeneration nach Rückenmarkläsionen in CHST-14^{-/-} Mäusen näher untersucht werden (M5-CB2-KO Linie). Des Weiteren sollte der Einfluss der fehlenden Sulfatierung auf das Verhalten der CHST-14^{-/-} Mäuse analysiert werden (M5-CB2-KO/F Linie).

1. Phänotypische Analyse der CHST-14^{-/-} Mäuse

Zuerst wurden die Tiere nach grobanatomischen Gesichtspunkten und in Bezug auf die Geburtsrate untersucht. Schon mit bloßem Auge waren die CHST-14^{-/-} Mäuse beider Linien von ihren wildtypischen Geschwistern zu unterscheiden, da sie merklich kleiner (vgl. Abb. 4.13) und leichter waren (vgl. Abb. 4.14).



Abb. 4.13: Größenunterschied der CHST-14^{-/-} und Wildtyp-Mäuse. Gezeigt sind zwei fünf Wochen alte Weibchen aus demselben Wurf; links Wildtyp (+/+), rechts CHST-14^{-/-} (-/-).

IV. Ergebnisse

Der Gewichtsunterschied war bei Tieren unterschiedlichen Alters und bei beiden Geschlechtern zu beobachten. Nach Beobachtungen der Tierpflegerin (Eva Kronberg), konnte man schon zum Zeitpunkt der Geburt einen Wurf in normal große, kleine und winzige Tiere unterscheiden, wobei die winzigen Tiere immer als CHST-14^{-/-} genotypisiert wurden. Im Alter von 0-3 Monaten, war im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern bei den CHST-14^{-/-} Männchen ein Gewichtsunterschied von 13% und bei den CHST-14^{-/-} Weibchen von 17% festzustellen. Im Alter von 4-6 Monaten wiesen die CHST-14^{-/-} Männchen, im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern, einen Gewichtsunterschied von 17%, die CHST-14^{-/-} Weibchen von 21% auf. In der Zeitspanne von 7-12 Monaten waren die CHST-14^{-/-} Männchen um 25% leichter als ihre wildtypischen Geschwister, die Weibchen wogen durchschnittlich 14% weniger. Bei Tieren über einem Jahr lagen die Gewichtsunterschiede der beiden Genotypen bei den Männchen bei 22%, bei den Weibchen bei 14% (vgl. Abb. 4.14).

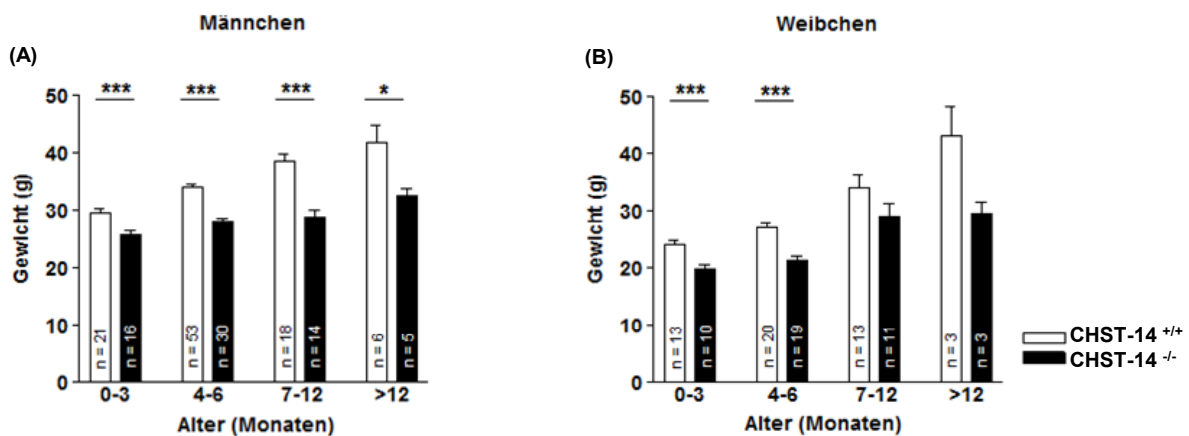


Abb. 4.14: Altersabhängige Gewichtsunterschiede der CHST-14^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern. Abgebildet ist das Gewicht der Männchen (A) und Weibchen (B) in unterschiedlichen Altersgruppen als Gruppenmittelwerte \pm SEM. Wildtypen (CHST-14^{+/+}) sind als weiße, CHST-14^{-/-} Tiere als schwarze Balken dargestellt. Die Anzahl der verwendeten Tiere (n) pro Gruppe und Zeitpunkt ist in den entsprechenden Balken notiert. *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05 (unpaired t-test).

Wurde das Genotypen-Verhältnis verschiedener Würfe betrachtet, war festzustellen, dass die Geburtsrate der CHST-14^{-/-} Tiere nicht der Mendelschen Verteilung entsprach und der Wert für die CHST-14^{-/-} Mäuse geringer war. Die Nachkommen heterozygoter Verpaarungen wurden an zwei verschiedenen Embryonaltagen (E 15,5 und E 18,5) sowie nach der Geburt (>P1) genotypisiert und das Verhältnis der unterschiedlichen Genotypen zueinander bestimmt. Bei beiden untersuchten pränatalen Zeitpunkten entsprach die Geburtsrate der Nachkommen mit 26,32% und 24,53% annähernd der Mendelschen Regel (vgl. Tabelle 4.2), während postnatal die Anzahl der CHST14^{-/-} Tiere auf 12,24% verringert war.

IV. Ergebnisse

	+/+	+/-	-/-
E 15,5	6 (31,6%)	8 (42,1%)	5 (26,32%)
E 18,5	19 (35,85%)	21 (39,62%)	13 (24,53%)
> P1	154 (31,95%)	269 (55,81%)	59 (12,24%)

Tabelle 4.2: Genotypen-Verteilung der Nachkommen aus heterozygoten Verpaarungen zu unterschiedlichen prä- und postnatalen Zeitpunkten. Angegeben ist die Anzahl der Tiere aus mehreren Würfen und in Klammern die errechnete Anzahl in Prozent. Untersucht wurden die pränatalen Zeitpunkte E 15,5 und E 18,5 und postnatal > P1. (+/+ Wildtyp; +/- heterozygote Mäuse; -/- Knockout).

Eine weitere Auffälligkeit der CHST-14^{-/-} Tiere zum Zeitpunkt der Geburt war eine Deformation des Schwanzes. Nach Aussage der Tierpflegerin Eva Kronberg, war der Schwanz gekringelt, glättete sich einige Tage nach der Geburt jedoch wieder. Bei der M5-CB2-KO/F Linie, die zweimal auf C57BL/6J Hintergrund rückgekreuzt wurde, war dieses Merkmal jedoch auch im adulten Tier zu beobachten, wobei die Stärke der Ausprägung von Tier zu Tier variierte (vgl. Abb. 4.15).



Abb. 4.15: Deformation des Schwanzes bei den CHST-14^{-/-} Mäusen der M5-CB2-KO/F Linie. Abgebildet ist der Schwanz einer ein Jahr alten CHST-14^{-/-} Maus.

Einige CHST14^{-/-} Mäuse wiesen sich durch die Ausbildung von Elefantenzähnen aus. Hierbei wuchsen die unteren oder oberen Nagezähne schneller, als sie sich abnutzten und konnten so bis zu über 1 cm lang werden, wobei das Ausmaß des Fehlwuchses von Tier zu Tier variierte. Im Gegensatz zur Deformation des Schwanzes war dies bei beiden Mauslinien zu beobachten, jedoch waren auch hier nicht alle CHST14^{-/-} Tiere betroffen.

2. Untersuchungen zur Beteiligung der CHST-14 an der Regeneration des ZNS

Nach Verletzungen des ZNS bildet sich eine Gliazarbe, die reich an Chondroitinsulfat-Proteoglykanen ist, die mitverantwortlich für die schlechte Regeneration der Axone nach Verletzungen des ZNS sind (Fawcett et al., 1989; McKeon et al., 1991, 1995; Dou und Levine, 1994; Friedlander et al., 1994; Smith-Thomas et al., 1994, 1995; Emerling und Lander, 1996). Da CHST-14 eine der Sulfotransferasen ist, die für die Sulfatierung dieser Proteoglykane verantwortlich sind und in einem Vorversuch gezeigt werden konnte, dass CHST-14-mRNA nach Läsionen des Rückenmarks in wildtypischen C57BL/6J Mäusen an der Läsionsstelle signifikant hochreguliert ist (Akyüz und Schachner, unveröffentlichte Daten), sollte die Beteiligung der CHST-14 an der Regeneration des ZNS in CHST-14^{-/-} Tieren genauer untersucht werden.

2.1 Funktionelle Regeneration nach Rückenmarksläsion

Um die funktionelle Regeneration nach Läsionen des Rückenmarks zu untersuchen, wurden die motorischen Fähigkeiten der wildtypischen und CHST-14^{-/-} Tiere im *beam walking* Test, im Stift Test (Apostolova et al., 2006) und mit Hilfe der *open field locomotion* Skala (BBB-Skala nach Joshi und Fehlings, 2002) bewertet. Die Leistungen der Tiere wurden vor der Läsion sowie eine, drei und sechs Wochen nach der Läsion analysiert.

Vor der Läsion waren die Werte der beiden Genotypen für alle gemessenen Parameter ähnlich (vgl. Abb. 4.16 A-D) und auch eine Woche nach der Läsion war der Grad der Beeinträchtigung der Bewegungsfähigkeit in beiden Gruppen, für alle betrachteten Parameter, vergleichbar.

Der BBB-Wert, ein Maß für die Fähigkeit der Mäuse zu laufen, lag sowohl für CHST-14^{-/-} Mäuse als auch für die wildtypischen Geschwister im unläsionierten Zustand bei 21 und eine Woche nach der Läsion bei ca. 2 (vgl. Abb. 4.16 A). Vergleich man die BBB-Werte der beiden Gruppen drei Wochen und eine Woche nach der Läsion miteinander, stellte man zwar sowohl bei Wildtypen als auch bei CHST-14^{-/-} Tieren eine leichte Verbesserung fest, die CHST-14^{-/-} erholten sich jedoch signifikant schlechter (BBB ca. 3) als ihre wildtypischen Geschwister (BBB ca. 6). Auch sechs Wochen nach der Läsion lag der BBB-Wert der CHST-14^{-/-} Mäuse bei ca. 4, während der Wert der Wildtypen mit ca. 7 signifikant höher lag. (vgl. Abb. 4.13 A).

Der *footstepping* Winkel diente als Parameter für die Fähigkeit der Mäuse mit der Fußsohle aufzutreten (*plantar stepping*) und vergrößerte sich bei beiden Genotypen eine Woche nach

IV. Ergebnisse

der Läsion, im Vergleich zum unläsionierten Zustand, um ca. 120° auf 145° (vgl. Abb. 4.16 B). Eine Woche nach der Läsion war sowohl bei den Wildtypen, als auch bei den CHST-14^{-/-} Mäusen eine deutliche Paralyse der hinteren Extremitäten zu beobachten. Beide Gruppen zeigten auch drei und sechs Wochen nach der Läsion eine deutliche Beeinträchtigung in ihrer Fähigkeit zum *plantar stepping*. Der *footstepping* Winkel zeigte drei Wochen nach der Läsion, mit ca. 130° bei CHST-14^{-/-} Tieren und ca. 120° beim Wildtyp, keine signifikanten Unterschiede. Sechs Wochen nach der Läsion war in CHST-14^{-/-} Tieren kaum eine Verbesserung des *footstepping* Winkel zu beobachten (ca. 120°), während die wildtypischen Mäuse zu diesem Zeitpunkt in der Lage waren, einen *footstepping* Winkel von ca. 95° zu erreichen (vgl. Abb. 4.16 B).

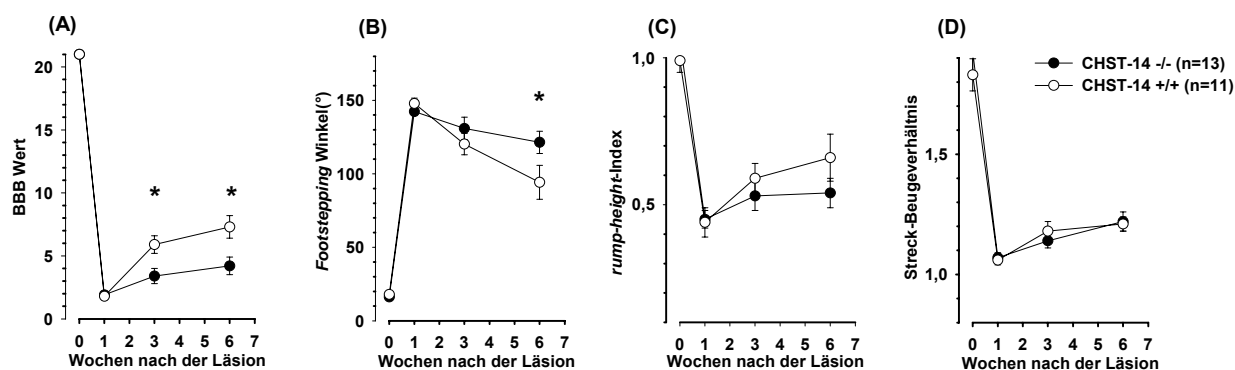


Abb. 4.16: Zeitlicher Verlauf und Grad der funktionellen Regeneration nach Rückenmarksläsion in CHST-14^{-/-} und CHST14^{+/+} Mäusen. Dargestellt sind BBB-Wert (A), *footstepping* Winkel (B), *rump-height*-Index (C) und Streck-Beugeverhältnis im Stift-Test (D) vor der Läsion (Tag 0) und eine, drei und sechs Wochen nach der Läsion. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} sind als schwarze Kreise, die Werte für CHST-14^{+/+} als weiße Kreise dargestellt. n gibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp an. *p < 0,05 (*one-way ANOVA* mit *Tukey posthoc* Tests).

Die Fähigkeit der Tiere das eigene Körpergewicht während der Lokomotion zu tragen, wurde über den *rump-height* Index bestimmt. Dieser Parameter verschlechterte sich bei beiden Genotypen von 1 im unläsionierten Tier auf ca. 0,45 eine Woche nach der Läsion (vgl. Abb. 4.16 C). Auch drei und sechs Wochen nach der Läsion konnten keine signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Der Wert der CHST-14^{-/-} Mäuse lag zu beiden Zeitpunkten bei ca. 0,5, der Wert für die Wildtypen stieg innerhalb dieses Zeitraums von ca. 0,6 auf ca. 0,7 leicht an (vgl. Abb. 4.16 C).

Mit Hilfe des Streck-Beugeverhältnisses im Stift-Test wurde getestet, ob die Tiere in der Lage waren, ihre Extremitäten ohne Unterstützung des Körpergewichts zu bewegen. Das Streck-Beugeverhältnis verschlechterte sich von 1,8 im unläsionierten Tier auf ca. 1,1 eine Woche nach der Läsion (vgl. Abb. 4.16 D). Für das Streck-Beugeverhältnis war drei und

IV. Ergebnisse

sechs Wochen nach der Läsion weder zwischen den Genotypen, noch für die betrachteten Zeitpunkte ein Unterschied zu erkennen. Drei Wochen nach der Läsion lag das Streck-Beugeverhältnis beider Gruppen bei ca. 1,15 und sechs Wochen nach der Läsion bei ca. 1,2 (vgl. Abb. 4.16 D).

Für alle untersuchten Parameter wurden die *Recovery* Indizes für die Zeitpunkte drei und sechs Wochen nach der Läsion berechnet (vgl. Abb. 4.17). Dieser Wert dient als Abschätzung der erfolgten Regeneration der einzelnen Mäuse, für die verschiedenen analysierten Parameter. Die Durchschnittswerte für die unterschiedlichen Parameter der beiden Genotypen wiesen auf eine schlechtere Regeneration der CHST-14^{-/-} Tiere hin.

Die *Recovery* Indizes der BBB-Werte lagen für den Wildtyp eine und sechs Wochen nach der Läsion bei ca. 21% bzw. 30%, bei den CHST-14^{-/-} Mäusen mit 8% (eine Woche nach der Läsion) und 11% (sechs Wochen nach der Läsion) signifikant niedriger (vgl. Abb. 4.17 A).

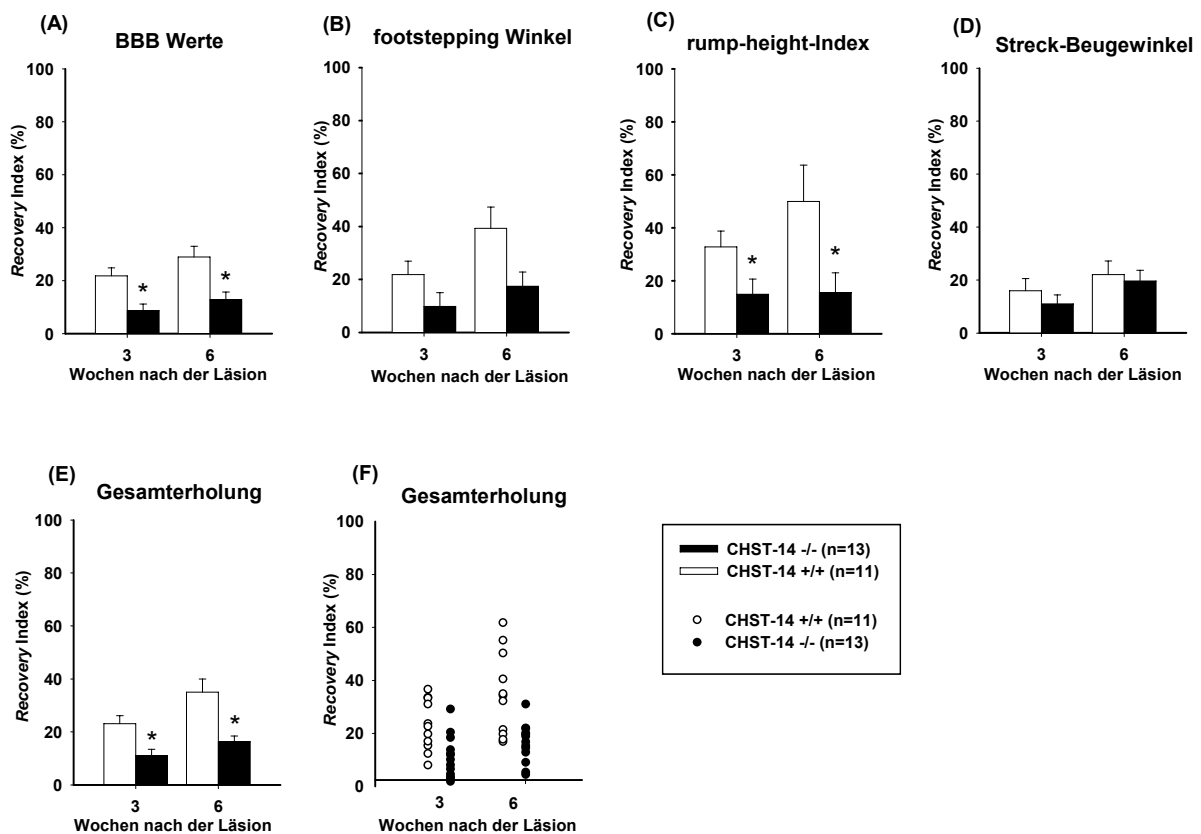


Abb. 4.17: Recovery Indizes von CHST-14^{-/-} und CHST14^{+/+} Mäusen. Dargestellt sind die BBB-Werte (A), *footstepping* Winkel (B), *rump-height*-Index (C) und Streck-Beugeverhältnis im Stift-Test (D) sowie die Gesamterholung als Gruppenmittelwerte \pm SEM (A-E) und individuelle Mittelwerte (F) drei und sechs Wochen nach der Läsion. Die Werte für CHST-14^{-/-} sind als schwarze, die Werte für CHST-14^{+/+} als weiße Balken dargestellt. n gibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp an. *p < 0,05 (*one-way ANOVA* mit *Tukey posthoc* Tests).

IV. Ergebnisse

Beim *footstepping* Winkel konnte zwischen den *Recovery* Indizes der CHST-14^{-/-} (ca. 9%) und CHST-14^{+/+} Mäuse (ca. 11%) drei Wochen nach der Läsion kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Sechs Wochen nach der Läsion stieg der *Recovery* Index bei den CHST-14^{+/+} Tieren auf ca. 40% an, während der Wert bei den CHST-14^{-/-} Tieren mit ca. 18% signifikant geringer war (vgl. Abb. 4.17 B).

Die *Recovery* Indizes für den *rump-height* Index zeigten zu beiden betrachteten Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Während der Wildtyp drei Wochen nach der Läsion einen Wert von ca. 33% erreichte, erreichten die CHST-14^{-/-} Geschwister nur einen Wert von ca. 15%. Sechs Wochen nach der Läsion stieg der Wert der Wildtypen auf ca. 50% an, während für die CHST-14^{-/-} Tiere mit einem Wert von ca. 15% keine Verbesserung, im Vergleich zu drei Wochen nach der Läsion, zu erkennen war (vgl. Abb. 4.17 C).

Für das Streck-Beugeverhältnis war im *Recovery* Index zu beiden betrachteten Zeitpunkten mit jeweils unter 20% kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen (vgl. Abb. 4.17 D).

Die Gesamterholung berechnete sich aus den Mittelwerten der *Recovery* Indizes der einzelnen Parameter. Während der Wert drei Wochen nach der Läsion für die Wildtypen bei ca. 22% lag, war er für die CHST-14^{-/-} Geschwister mit ca. 10% signifikant niedriger. Auch sechs Wochen nach der Läsion war der *Recovery* Index der CHST-14^{-/-} Tiere mit ca. 17% signifikant geringer als bei den Wildtypen, die einen Wert von ca. 38% erreichten (vgl. Abb. 4.17 E,F).

Sowohl die *Recovery* Indizes der einzelnen Parameter, wie BBB-Wert, *footstepping* Winkel, *rump-height* Index und Streck-Beugeverhältnis, als auch die Gesamterholung der Tiere ließen eine signifikant schlechtere funktionelle Erholung der CHST-14^{-/-} Mäuse, im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern, erkennen.

2.2 Morphologische Veränderungen des Rückenmarks nach Läsion

2.2.1 Bestimmung des Rückenmarkdurchmessers

CHST-14^{-/-} Tiere sind deutlich kleiner als ihre wildtypischen Geschwister (s. S. 93). Um zu untersuchen, ob der Durchmesser des Rückenmarks der CHST-14^{-/-} Tiere im Vergleich zum Wildtyp geringer ist, wurde der Durchmesser des Gesamtrückenmarks sowie der weißen und grauen Substanz in transversalen Rückenmarksschnitten bestimmt. Die Zellkerne der Rückenmarksquerschnitte wurden mit *Cresyl Violet* (Nissl) angefärbt und gleichzeitig wurde

IV. Ergebnisse

das Myelin mit *Luxol Fast Blue* dargestellt. Anschließend wurden die Flächen der grauen und weißen Substanz sowie des Gesamtrückenmarks der einzelnen Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

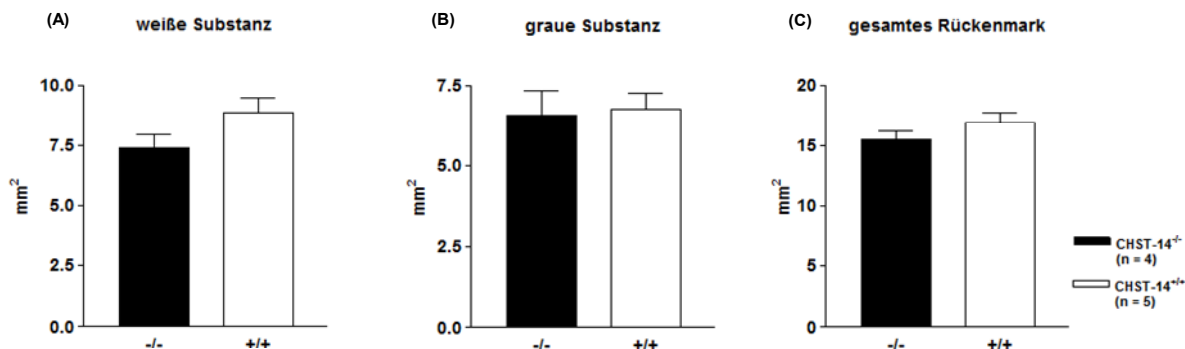


Abb. 4.18: Durchmesser des Rückenmarks der CHST-14^{-/-} und Wildtyp Mäuse sechs Wochen nach der Läsion. Die Flächen für weiße Substanz (A), graue Substanz (B) und des gesamten Rückenmarks (C) wurden als Gruppenmittelwerte \pm SEM in transversalen Rückenmarksschnitten bestimmt. Die Werte für CHST-14^{-/-} (-/-) sind als schwarze, die Werte für CHST-14^{+/+} (+/+) als weiße Balken dargestellt. n gibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp an.

Es konnten für graue und weiße Substanz sowie für das Gesamtrückenmark keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Auch wenn die Fläche der weißen Substanz in transversalen Rückenmarksschnitten bei CHST-14^{-/-} Mäusen tendenziell geringer war (7,4 mm²) als im Wildtyp (8,9 mm²), erreichte der Unterschied keine Signifikanz (vgl. Abb. 4.18 A). Für die graue Substanz wurden in CHST-14^{-/-} Mäusen eine Fläche von 6,6 mm² und für den Wildtyp von 6,7 mm² bestimmt (vgl. Abb. 4.18 B). Für das Gesamtrückenmark ergab sich für die Wildtypen ein Durchmesser von 17 mm² und für die CHST-14^{-/-} Geschwister von 15,4 mm² (vgl. Abb. 4.18 C).

2.2.2 Veränderung der Dichte der Mikroglia im Rückenmark nach Läsion

Mikroglia sind die Immunzellen des ZNS (Kim und de Vellis, 2005), die bei Verletzungen des ZNS ihren Aktivitätsstatus ändern (Hanisch und Kettenmann, 2007). Diese „aktivierten“ Mikroglia sind an der Entfernung der Zelltrümmer, an Entzündungsprozessen und an der Wundheilung beteiligt, indem sie die Gliosis, die zur Bildung der Gliazarbe führt sowie die neuronale Regeneration und die Gefäßneubildung regulieren (Thomas, 1992).

Bei morphologischen Analysen des Hippokampus der CHST-14^{-/-} Mäuse wurde in verschiedenen Regionen des Gehirns eine erhöhte Anzahl an Mikroglia festgestellt (Lackzynska und Schachner, unveröffentlichte Daten).

IV. Ergebnisse

Daher wurde die Anzahl der Mikroglia in transversalen Rückenmarksschnitten von CHST-14^{-/-} Mäusen und ihren wildtypischen Geschwistern sechs Wochen nach der Läsion bestimmt. Nach Immunfärbung der Rückenmarksschnitte mit Mikroglia-spezifischen anti-Iba1-Antikörper und Kernfärbung mit Bis-benzimid wurde die Dichte der Iba1-positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop stereologisch ermittelt.

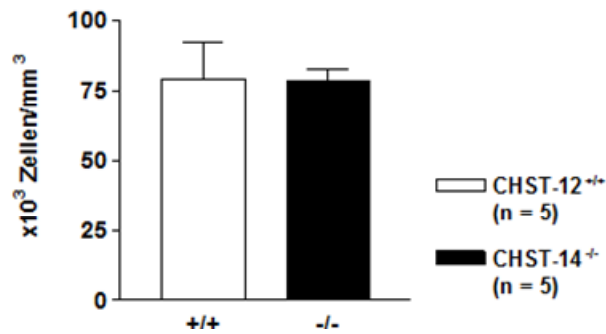


Abb. 4.20: Anzahl der Mikroglia im Rückenmark sechs Wochen nach der Läsion. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} (-/-) sind als schwarze, die Werte für CHST-14^{+/+} (+/+) als weiße Balken dargestellt. n gibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp an.

Es konnte jedoch kein Unterschied in der Anzahl der Mikroglia sechs Wochen nach der Läsion zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Sowohl für Wildtypen als auch für CHST-14^{-/-} Tiere wurden durchschnittlich 75×10^3 Zellen/mm³ gezählt (vgl. Abb. 4.20).

2.2.3 Regeneration des läsierten Rückenmarks gemessen an der monoaminergen Re-Innervierung

Katecholaminerge Neurone findet man in Regionen des Nervensystems, die unter anderem an der Regulation der Bewegungen beteiligt sind. Alle katecholaminergen Neurone besitzen das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH), das den ersten Schritt in der Katecholaminsynthese katalysiert und als spezifischer Marker dieses Neuronen-Typs verwendet wird. Um abschätzen zu können, ob die schlechtere Regeneration der CHST-14^{-/-} Mäuse auf eine verminderte monoaminerge Re-Innervierung caudal der Läsionsstelle zurückzuführen ist, wurden die katecholaminergen Axone im lumbalen Rückenmark gezählt, die durch eine 250 μ m caudal zur Läsionsstelle willkürlich festgelegte Grenze projizierten.

Parasagittale Schnitte des Rückenmarks von CHST-14^{-/-} und Wildtyp-Mäusen wurden mit anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

IV. Ergebnisse

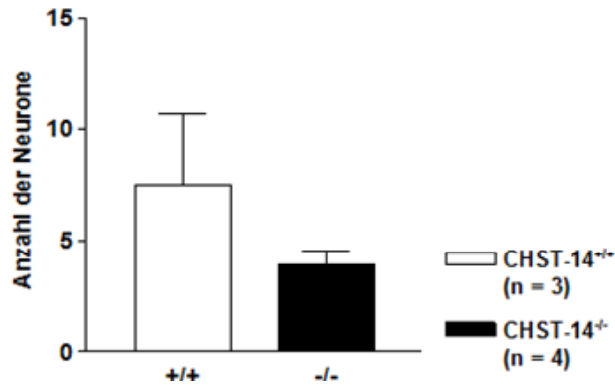


Abb. 4.21: Monoaminerge Re-Innervierung in rückenmarksläsionierten CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäusen. Die Werte für CHST-14^{-/-} (-/-) sind als schwarze, die Werte für CHST-14^{+/+} (+/+) als weiße Balken in Form von Gruppenmittelwerten ± SEM dargestellt. n gibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp an. (Wilcoxon-Mann-Whitney Test).

Sechs Wochen nach der Läsion konnten 250 µm caudal der Läsionsstelle für den Wildtyp durchschnittlich 7,5 und für CHST-14^{-/-} Tiere durchschnittlich 3,9 Tyrosinhydroxylase-positive Axone gemessen werden. Dies ließ zwar eine Tendenz erkennen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (vgl. Abb. 4.21).

2.2.4 Veränderung der Regenerationsfähigkeit rückenmarksläsionierter CHST-14^{-/-} Mäuse nach Chondroitinase-Behandlung

Es ist bekannt, dass durch den Einsatz von Chondroitinase ABC nach Läsionen des ZNS, die funktionelle Regeneration verbessert wird (Moon et al., 2001; Bradbury et al., 2002; Caggiano et al., 2005; Houle et al., 2006; Cafferty et al., 2007). Daher sollte überprüft werden, wie sich die funktionelle Regeneration der CHST-14^{-/-} und wildtypischen Mäuse nach Chondroitinase-Behandlung verändert.

Es wurden fünf CHST-14^{-/-} und fünf wildtypische Tiere läsiert und unmittelbar nach der Läsion ca. 2 mm distal der Läsionsstelle 1 µl Chondroitinase ABC (10 U/ml) injiziert. Alle Tiere wachten aus der Narkose auf, über Nacht starb jedoch eine CHST-14^{-/-} Maus und zwei Tage nach der Operation starb eine weitere CHST-14^{-/-} Maus. Drei Tage nach der ersten OP bekamen die Tiere erneut ca. 2 mm distal der Läsionsstelle Chondroitinase ABC injiziert. Während alle Wildtypen diese zweite Injektion überlebten, starb in der ersten Nacht nach der zweiten Behandlung eine weitere CHST-14^{-/-} Maus, die beiden anderen CHST-14^{-/-} Tiere starben innerhalb der zwei folgenden Tage.

Da die CHST-14^{-/-} Tiere nach Chondroitinase-Behandlung eine 100%ige Sterberate aufwiesen, war eine funktionelle Analyse nicht möglich.

2.3 Differentielle Expression der HNK-1-Sulfotransferase-Familienmitglieder an der Läsionsstelle

Um zu überprüfen, ob der Verlust der CHST-14 durch ein anderes Mitglied der HNK-1-Sulfotransferase-Familie kompensiert wird, wurde die relative mRNA-Expression der einzelnen Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie im Rückenmark eine und sechs Wochen nach der Läsion mittels qRT-PCR untersucht. Zur genaueren Analyse der Verletzung wurden drei Bereiche des Rückenmarks unterschieden, nämlich die Läsionsstelle (L) selbst, sowie je 5 mm Gewebe rostral (R) und caudal (C) der Läsionsstelle. Pro Genotyp, Zeitpunkt und Rückenmarksregion wurden je vier läionierte Tiere und als Kontrollgruppe pro Genotyp drei unläionierte Tiere analysiert.

Die aus jeweils 1 µg extrahierter Gesamt-RNA resultierenden cDNAs wurden mittels qPCR vermessen. Um die erhaltenen Ct-Werte direkt miteinander vergleichen zu können, wurden die Messungen aller Gene anhand von Aliquots derselben cDNAs vorgenommen. Die Ct-Werte wurden anhand der Messwerte der Referenzgene Aktin, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) in unläionierten Wildtypen normalisiert. Die normalisierten Ct-Werte wurden anschließend relativ zum entsprechenden unläionierten Genotyp berechnet. Die erhaltenen Daten der qRT-PCR wurden *three-way ANOVA* Analysen für wiederholte Messungen unterzogen, wobei Genotyp und Zeitpunkt nach der Läsion als Faktoren zwischen den Gruppen und die drei untersuchten Bereiche des Rückenmarks (R, L, C) als Faktoren innerhalb einer Gruppe betrachtet wurden.

2.3.1 Differentielle Expression der Haushaltsgene nach Rückenmarksläsion

Für die Haushaltsgene Aktin, GAPDH und HPRT war eine und sechs Wochen nach der Läsion sowohl in CHST-14^{-/-} Tieren, als auch im Wildtyp, im Vergleich zu unläioniertem Rückenmark, eine Dysregulation festzustellen.

Die Aktin-Expression war im Wildtyp eine Woche nach der Läsion an der Läsionsstelle 2,6-fach, in ChST-14^{-/-} Tieren 2,5-fach erhöht. Sechs Wochen nach der Läsion war Aktin an der Läsionsstelle sowohl im Wildtyp als auch in CHST-14^{-/-} Tieren nur noch 1,5-fach hochreguliert. Rostral der Läsionsstelle war die Aktin-Expression sowohl eine als auch sechs Wochen nach der Läsion, in beiden Genotypen, um den Faktor 1,3 schwach hochreguliert. Caudal war die Expression eine Woche nach der Läsion im Wildtyp 1,3-fach, in CHST-14^{-/-} Tieren 1,6-fach erhöht. Sechs Wochen nach der Läsion war, im Vergleich zu den entsprechenden unläionierten Genotypen, keine Dysregulation messbar (vgl. Abb. 4.22 A).

IV. Ergebnisse

Für GAPDH konnte nur für den Zeitpunkt eine Woche nach der Läsion an der Läsionsstelle eine schwache negative Dysregulation um den Faktor 0,8 festgestellt werden, ein genotypischer Unterschied war nicht zu erkennen. Rostral und caudal der Läsionsstelle sowie sechs Wochen nach der Läsion, war keine Dysregulation erkennbar (vgl. Abb. 4.22 B).

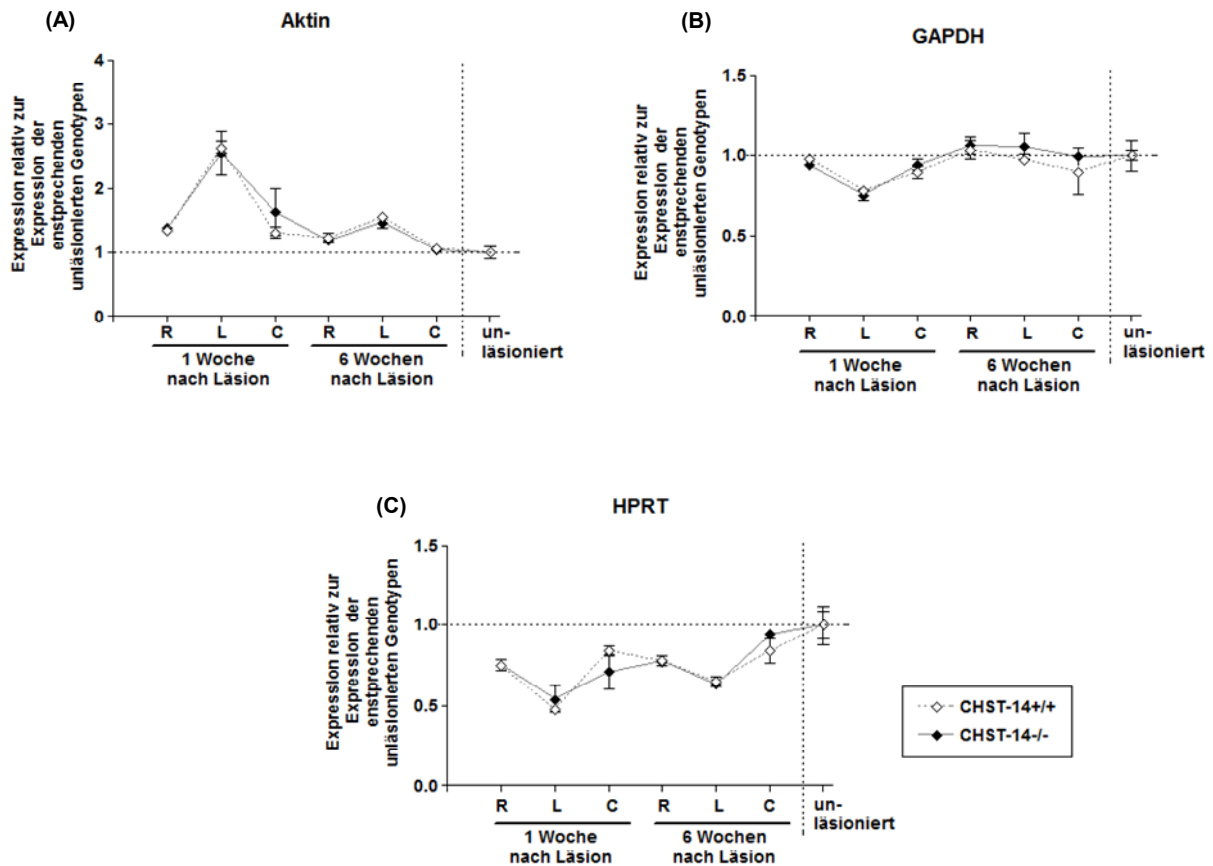


Abb. 4.22: Relative Expression der Haushaltsgene Aktin (A), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (B) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) (C) in CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Tieren eine und sechs Wochen nach Rückenmarksläsion. Es wurden drei Regionen analysiert: Läsionsstelle (L), rostral (R) und caudal (C) der Läsionsstelle. Die Ct-Werte wurden auf die Expression von Aktin, GAPDH und HPRT normalisiert, daraus die Mittelwerte gebildet und nach der *standard curve* Methode analysiert und relativ zu den entsprechenden unläsionierten Genotypen betrachtet. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} Tiere sind als schwarze, die für den Wildtyp als weiße Rauten dargestellt.

Die Expression von HPRT war im Vergleich zum unläsioniertem Rückenmark nach der Läsion in allen drei Regionen und zu beiden Zeitpunkten unterschiedlich stark runterreguliert. Rostral der Läsionsstelle wurde in CHST-14^{-/-} Tieren und ihren wildtypischen Geschwistern eine Woche nach der Läsion eine negative Dysregulation um den Faktor 0,3 und direkt an der Läsionsstelle um den Faktor 0,5 festgestellt. Caudal der Läsionsstelle war die HPRT-Expression im Wildtyp 0,2-fach und in CHST-14^{-/-} Tieren 0,3-fach herunterreguliert (vgl. Abb. 4.22 C). Sechs Wochen nach der Läsion war die Expression rostral der Läsionsstelle in

IV. Ergebnisse

beiden Genotypen um den Faktor 0,2 dysreguliert, direkt an der Läsionsstelle um den Faktor 0,3. Caudal der Läsion war die HPRT-Expression in CHST-14^{-/-} Tieren nicht dysreguliert, in den wildtypischen Geschwistern wurde eine geringe Runterregulation um den Faktor 0,2 gemessen.

Weder eine noch sechs Wochen nach der Läsion konnte für eines der drei analysierten Haushaltsgene in den drei untersuchten Regionen des Rückenmarks genotypische Expressionsunterschiede festgestellt werden. Jedoch zeigten alle Haushaltsgene nach Rückenmarksläsionen positionsabhängige Expressionsunterschiede.

2.3.2 Differentielle Expression der CHST-14 nach Rückenmarksläsion

Um die relative Expression der CHST-14 im läsierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} Tiere zu bestimmen, wurden sowohl die Ct-Werte der Wildtypen, als auch die Ct-Werte der CHST-14^{-/-} Tiere, relativ zum unläsierten Wildtyp, berechnet.

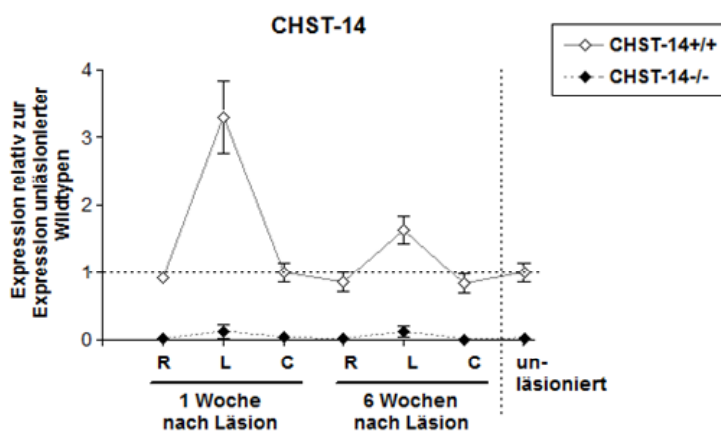


Abb. 4.23: Relative CHST-14-Expression in läsiertem Rückenmark von CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Tieren eine und sechs Wochen nach Rückenmarksläsion. Es wurden drei Regionen analysiert: Läsionsstelle (L), rostral (R) und caudal (C) der Läsionsstelle. Die Ct-Werte wurden auf die Expression Aktin, GAPDH und HPRT normalisiert, daraus die Mittelwerte gebildet und nach der *standard curve* Methode analysiert und relativ zum unläsierten Wildtyp betrachtet. Die als Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} Tiere sind als schwarze, die für den Wildtyp (CHST-14^{+/+}) als weiße Rauten dargestellt.

Im Rückenmark der CHST-14^{-/-} Tiere lagen die CHST-14-mRNA-Werte an der Nachweisgrenze. Im Wildtyp war die Expression des Enzyms an der Läsionsstelle, eine Woche nach der Läsion, um den Faktor 3,3 hochreguliert, sechs Wochen nach der Läsion um den Faktor 1,6 hochreguliert. *Two-way ANOVA* Analysen für wiederholte Messungen

IV. Ergebnisse

bestätigten diesen Positionseffekt im Wildtyp an der Läsionsstelle eine und sechs Wochen nach der Läsion. Rostral und caudal der Läsion war im Wildtyp weder eine noch sechs Wochen nach der Läsion, ein Unterschied in der CHST-14-Expression festzustellen (vgl. Abb. 4.23).

2.3.3 Differentielle Expression der HNK-1-Sulfotransferase-Familie im Rückenmark von CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäusen

Zunächst wurde die relative mRNA-Expression der einzelnen Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie im unläsionierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} und Wildtyp Mäuse analysiert.

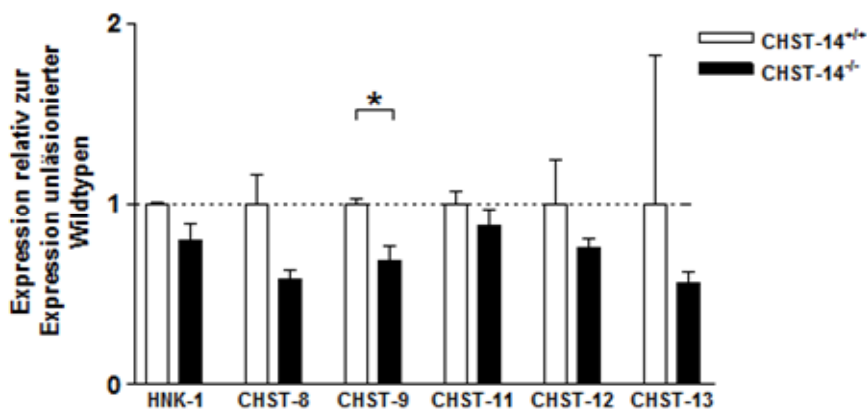


Abb. 4.24: Relative Expression der Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie im unläsionierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} Mäuse. Die Ct-Werte wurden auf die Expression Aktin, GAPDH und HPRT normalisiert, daraus die Mittelwerte gebildet und nach der *standard curve* Methode analysiert und relativ zum unläsionierten Wildtyp betrachtet. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} Tiere sind als schwarze, die für den Wildtyp (CHST-14^{+/+}) als weiße Balken dargestellt. HNK-1, HNK1-Sulfotransferase; * $p < 0,05$ (*unpaired t-test*).

Für alle analysierten Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie konnte im unläsionierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} Mäuse, im Vergleich zu wildtypischen Mäusen, eine Runterregulation der entsprechenden mRNAs festgestellt werden. HNK-1-ST, CHST-9 und CHST-12 waren 0,7-0,8-fach runterreguliert, die Dysregulation war jedoch nicht signifikant. Auch für CHST-11, für die eine Dysregulation um den Faktor 0,9 und für CHST-13, für die eine Dysregulation um den Faktor 0,6 gemessen wurde, konnten keine signifikanten Unterschiede zur Expression im Wildtyp festgestellt werden. Nur CHST-9 war mit einer

Dysregulation um den Faktor 0,6 im Vergleich zur Expression im Rückenmark der Wildtypen, signifikant herunterreguliert (vgl. Abb. 4.24).

2.3.4 Differentielle Expression der HNK-1-Sulfotransferase-Familie nach Rückenmarksläsion

Die relative mRNA-Expression der einzelnen Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie im läsierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} und Wildtyp-Mäuse zeigte nur für CHST-12 einen signifikanten genotypischen Unterschied.

Die Expression der HNK-1-Sulfotransferase war im Wildtyp stärker dysreguliert als in CHST-14^{-/-} Tieren. Eine Woche nach der Läsion wurde rostral und caudal der Läsionsstelle eine negative Regulation um den Faktor 0,2 und an der Läsionsstelle um den Faktor 0,8 gemessen. In CHST-14^{-/-} Tieren war die HNK-1-Sulfotransferase rostral und caudal der Läsionsstelle nicht dysreguliert, an der Läsionsstelle jedoch um den Faktor 0,5 runterreguliert. Sechs Wochen nach der Läsion konnte rostral der Läsionsstelle für den Wildtyp kein Unterschied in der HNK-1-Sulfotransferase-Expression gemessen werden, an der Läsionsstelle war die Expression um den Faktor 0,4 und caudal der Läsion um den Faktor 0,2 runterreguliert. In den in CHST-14^{-/-} Mäusen wurde rostral und caudal der Läsionsstelle eine leichte Hochregulation um den Faktor 1,1 (rostral), bzw. 1,3 (caudal) festgestellt. An der Läsionsstelle war die Expression der HNK-1-Sulfotransferase um den Faktor 0,1 leicht runterreguliert. Die genotypischen Unterschiede in der Expression waren zu keinem Zeitpunkt signifikant (vgl. Abb. 4.25 A).

Die relative Expression der CHST-8 war in den wildtypischen Mäusen eine Woche nach der Läsion an der Läsionsstelle 0,8-fach, rostral der Läsionsstelle 0,2-fach runterreguliert und caudal der Läsionsstelle war kein Unterschied in der Expression im Vergleich zum unläsierten Wildtyp festzustellen. Sechs Wochen nach der Läsion war die CHST-8-Expression im Wildtyp mit einer negativen Dysregulation von 0,4 schwächer runterreguliert als eine Woche nach der Läsion, rostral der Läsionsstelle fand man die Expression des Enzyms 1,3-fach hochreguliert und caudal der Läsionsstelle 0,3-fach runterreguliert. In CHST-14^{-/-} Tieren wurde eine Woche nach der Läsion rostral der Läsionsstelle eine Hochregulation der Expression um den Faktor 1,3 gemessen, an der Läsionsstelle eine Runterregulation von 0,6 und caudal gab es keinen Unterschied im Vergleich zum unläsierten CHST-14^{-/-} Rückenmark. Sechs Wochen nach der Läsion war die Expression der CHST-8 rostral und caudal der Läsionsstelle nicht dysreguliert, an der Läsionsstelle wurde eine negative 0,3-fache Regulation gemessen (vgl. Abb. 4.25 B).

IV. Ergebnisse

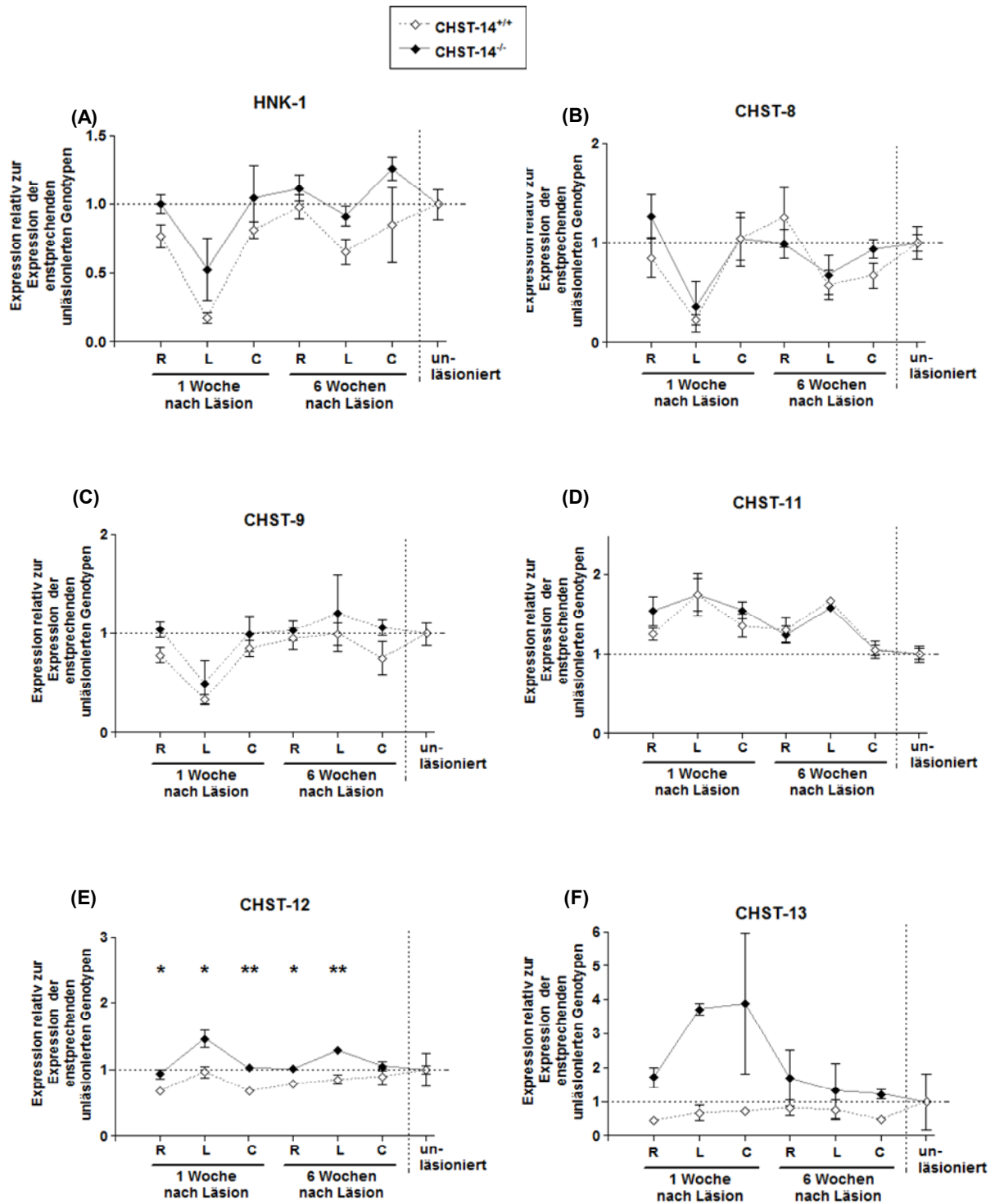


Abb. 4.25: Relative Expression der einzelnen Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie in läsiertem Rückenmark von CHST-14^{-/-} und CHST^{+/+} Tieren eine und sechs Wochen nach Rückenmarksläsion. Es wurden drei Regionen analysiert: Läsionsstelle (L), rostral (R) und caudal (C) der Läsionsstelle. Die Ct-Werte wurden auf die Expression Aktin, GAPDH und HPRT normalisiert, daraus die Mittelwerte gebildet und nach der *standard curve* Methode analysiert und relativ zum entsprechenden unläsierten Genotyp betrachtet. Die Gruppenmittelwerte ± SEM für CHST-14^{-/-} Tiere sind als schwarze, die für den Wildtyp (CHST-14^{+/+}) als weiße Rauten dargestellt. HNK1, HNK-1-Sulfotransferase ** p < 0,01; * p < 0,05 (*unpaired t-test*).

IV. Ergebnisse

Die relative Expression der CHST-9 war im Wildtyp eine Woche nach der Läsion rostral und caudal der Läsionsstelle nur schwach runterreguliert (0,2-fach rostral und 0,15-fach caudal), an der Läsionsstelle selbst wurde eine 0,7-fache Runterregulation gemessen. Sechs Wochen nach der Läsion war rostral der Läsionsstelle und an der Läsionsstelle selbst keine Dysregulation festzustellen, caudal der Läsionsstelle war CHST-9 um den Faktor 0,25 runterreguliert. In den CHST-14^{-/-} Mäusen war rostral und caudal der Läsionsstelle, weder eine noch sechs Wochen nach der Läsion, ein Unterschied in der CHST-9-Expression im Vergleich zum unläsionierten CHST-14^{-/-} Rückenmark zu erkennen. An der Läsionsstelle war die CHST-9-mRNA eine Woche nach der Läsion 0,5-fach runterreguliert, sechs Wochen nach der Läsion war eine leichte Hochregulation um den Faktor 1,2 zu erkennen (vgl. Abb. 4.25 C).

Die CHST-11-Expression war nach Rückenmarksläsion in CHST-14^{-/-} Mäusen und den wildtypischen Geschwistern ähnlich. An der Läsionsstelle wurde bei beiden Genotypen, eine Woche nach der Läsion, eine Hochregulation um den Faktor 1,7 und sechs Wochen nach der Läsion um den Faktor 1,6 gemessen. Eine Woche nach der Läsion war die CHST-11-Expression rostral und caudal der Läsionsstelle im Wildtyp etwas geringer als in den CHST-14^{-/-} Mäusen, im Wildtyp war die Expression im Vergleich zum unläsionierten Genotyp um den Faktor 1,3 in CHST-14^{-/-} Tieren um den Faktor 1,5 erhöht. Sechs Wochen nach der Läsion war rostral der Läsionsstelle in beiden Genotypen eine Hochregulation um den Faktor 1,3 zu erkennen, caudal konnten, im Vergleich zum entsprechenden unläsionierten Genotyp, keine Unterschiede in der CHST-11-Expression festgestellt werden (vgl. Abb. 4.25 D).

Die relative Expression der CHST-12 zeigte als einziges Mitglied der HNK-1-Sulfotransferase-Familie einen signifikanten genotypischen Unterschied. Im wildtypischen Rückenmark war eine Woche nach der Läsion rostral und caudal der Läsionsstelle eine leichte Runterregulation um den Faktor 0,3 zu erkennen, während in CHST-14^{-/-} Tieren keine Dysregulation gemessen wurde. An der Läsionsstelle war eine Woche nach der Läsion für den Wildtyp keine Dysregulation feststellbar, in CHST-14^{-/-} Mäusen war die CHST-12-Expression 1,5-fach erhöht. Auch sechs Wochen nach der Läsion war die Expression der CHST-12 in CHST-14^{-/-} Rückenmark nur an der Läsionsstelle (Faktor 1,3) hochreguliert. Im Wildtyp war die Expression sechs Wochen nach der Läsion um den Faktor 0,1-0,2 leicht verringert (vgl. Abb. 4.25 E).

Die CHST-13-Expression lag an der Nachweisgrenze, weshalb keine verlässlichen Aussagen über die Regulation der Expression dieser Sulfotransferase getroffen werden konnten (vgl. Abb. 4.25 F).

IV. Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass lediglich für ein Mitglied der HNK-1-Sulfotransferase-Familie, nämlich für die CHST-12, ein signifikanter, genotypischer Expressionsunterschied im Rückenmark läsionierter CHST-14^{-/-} Tiere festzustellen war.

3. Verhaltensanalyse der CHST-14^{-/-} Mäuse

Um die Auswirkungen des Fehlens der CHST-14 in der Maus auf das Verhalten zu untersuchen, wurden CHST-14^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern unter unterschiedlichen Verhaltens-Aspekten getestet.

Für die die Verhaltensversuche wurde die bereits zweimal auf C57BL/6J Hintergrund rückgekreuzte M5-CB2-KO/F Mauslinie verwendet.

3.1 Explorations- und Angstverhalten

3.1.1 *Open field*

Im *open field* wurde das Explorations- und Angstverhalten der Mäuse untersucht, indem sie in eine offene Arena gesetzt wurden und analysiert wurde, wieviel Zeit sie an der Schutz gebenden Wand verbrachten, bzw. wie oft sie sich in die schutzlose Mitte der Arena wagten.

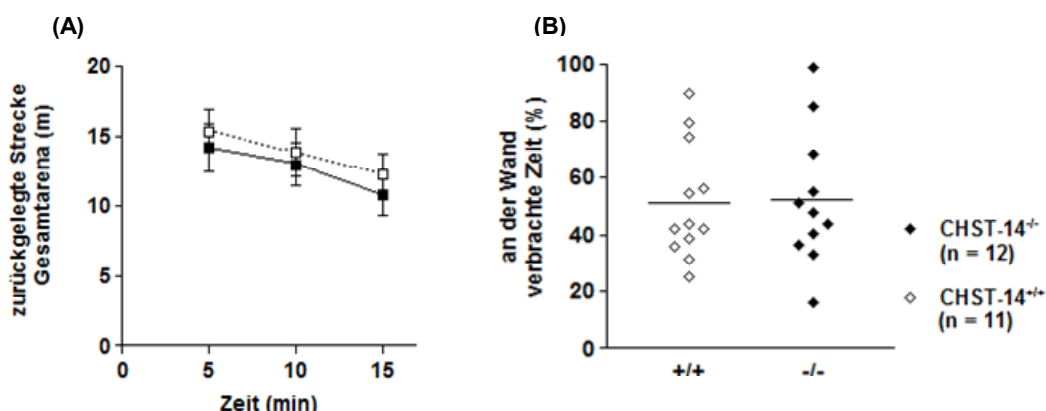


Abb. 4.26: *Open field*. Dargestellt sind die zurückgelegten Strecke in der Gesamtarena (A) als Gruppenmittelwerte \pm SEM sowie die an der Wand verbrachte Zeit (B) als individuelle Mittelwerte mit den Gruppenmittelwerte als horizontale Linie. Die Werte für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. Die Anzahl der analysierten Tiere (n) ist in (B) angegeben.

IV. Ergebnisse

Bei den CHST-14^{-/-} Mäusen und den Wildtypen konnte im *open field* weder bei der zurückgelegten Strecke noch bei der Zeit, die die Tiere an der Wand verbrachten, ein Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. In den ersten fünf Minuten des Tests legten die Wildtypen durchschnittlich 15 Meter, die CHST-14^{-/-} Mäuse durchschnittlich 14 Meter zurück.

Im Zeitraum 5-10 min legten beide Genotypen durchschnittlich 13 Meter zurück und im Zeitraum 10-15 min legten die wildtypischen Mäuse 12 Meter und die CHST-14^{-/-} Mäuse durchschnittlich 10 Meter zurück (vgl. Abb. 4.26 A). Bei der Zeit, die sich die Tiere im offenen Zentrum der Arena, bzw. an der Schutz gebenden Wand aufhielten, waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu erkennen. Sowohl die CHST-14^{-/-} Mäuse als auch die Wildtypen verbrachten etwa 50% der Zeit an der Wand (vgl. Abb. 4.26 B). Auch die durchschnittliche Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere in den ersten fünf Minuten des Versuchs, als auch während der Gesamtversuchsdauer, an der Wand und in der Mitte der Arena bewegten, zeigte keine genotypischen Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 *Elevated plus maze*

Der *elevated plus maze* ist ein weiterer Test, mit dem das Angstverhalten der Mäuse untersucht wird. Hierzu wurde ihre Neigung bewertet, die offenen Arme, die als der angstauslösendste Teil des Labyrinths galten, zu erkunden.

Sowohl CHST-14^{-/-} Mäuse als auch die wildtypischen Geschwister verbrachten ca. 58% der Zeit auf dem geschlossenen Arm (vgl. Abb. 4.27 A), die Wildtypen verbrachten jedoch etwas mehr Zeit auf dem offenen Arm (18%) als die CHST-14^{-/-} Geschwister (10%) (vgl. Abb. 4.27 B). Während sich die Wildtypen 33% der Zeit in der Mitte des plusförmigen Labyrinths aufhielten, verbrachten die CHST-14^{-/-} Mäuse mit 18% signifikant weniger Zeit in der Mitte (vgl. Abb. 4.27 C). Auch bei den Eintritten in den geschlossenen Arm konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Während die Wildtypen in den 15 Minuten des Tests die offenen Arme durchschnittlich 11mal den betraten, betraten die CHST-14^{-/-} Mäuse ihn durchschnittlich nur achtmal (vgl. Abb. 4.27 D). Den offenen Arm betraten beide Genotypen durchschnittlich dreimal (vgl. Abb. 4.27 E). Bei der Anzahl der Gesamteintritte in die vier Arme zeigte sich für die CHST-14^{-/-} Tiere mit durchschnittlich 10 Gesamteintritten eine geringere Lokomotion im Vergleich zu den Wildtypen, für die durchschnittlich 13 Gesamteintritte gezählt werden konnten (vgl. Abb. 4.27 F).

IV. Ergebnisse

Beim *self grooming* und *rearing* Verhalten konnte kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

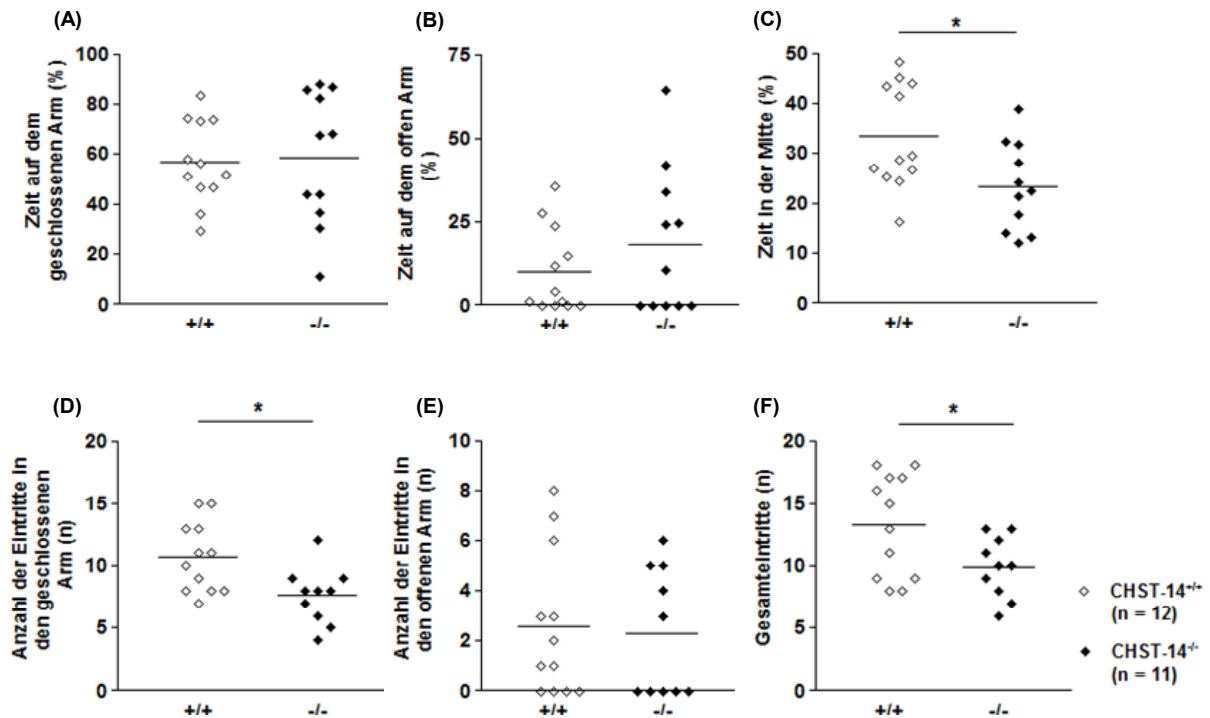


Abb. 4.27: Aufenthalt der CHST-14^{-/-} und ihrer CHST-14^{+/+} Geschwister auf den offen und geschlossenen Armen, sowie in der Mitte der *elevated plus maze* Arena. Dargestellt ist die verbrachte Zeit auf dem geschlossenen Arm (A), dem offenen Arm (B) und in der Mitte der Arena (C), sowie die Anzahl der Eintritte in den geschlossenen (D) und offenen Arm (E) und die Anzahl der Gesamteintritte (F) als individuelle Mittelwerte. Die Werte für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. Die Gruppenmittelwerte sind als horizontale Linien eingezeichnet. Die Anzahl der analysierten Tiere (n) ist in (F) angegeben. * p < 0,05 (*Mann-Whitney Test*).

Um Aussagen über die Ängstlichkeit der Mäuse machen zu können, wurde die Zeit betrachtet, die die Tiere bis zum ersten ungeschützten *head dip* brauchten. Es zeigte sich, dass die CHST12^{-/-} Tiere, im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern, etwas vorsichtiger waren und länger brauchten, bis sie den ersten ungeschützten *head dip* machten. CHST12^{-/-} Tiere machten den ersten ungeschützten *head dip* nach durchschnittlich 76 sec, die Wildtypen nach 32 sec. (vgl. Abb. 4.28 A). Die Zeit bis zum ersten geschützten *head dipping* war mit etwa 186 sec beim Wildtyp und 148 sec bei CHST12^{-/-} Tiere nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Abb. 4.28 B). Als nächstes wurde die Summe aller *head dippings* berechnet und daraus die Prozent der ungeschützten und geschützten *head dippings* ermittelt. Auch wenn der Wert keine Signifikanz erreicht fällt auf, dass die CHST-14^{-/-} Mäuse, mit durchschnittlich 38,8% zu mehr ungeschützten *head dips* tendierten als die CHST-14^{+/+} Geschwister mit 24,0% (vgl. Abb. 4.28 C).

IV. Ergebnisse

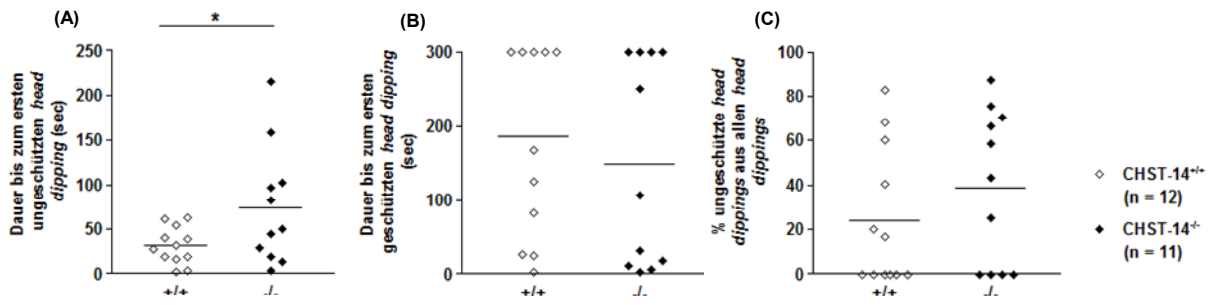


Abb. 4.28: Head dipping Verhalten der CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäuse im *elevated plus maze*. Dargestellt ist die Dauer bis zum ersten ungeschützten (A), und bis zum ersten geschützten *head dipping* (B) sowie die 5 der ungeschützten *head dippings* aus allen *head dippings* (C) als individuelle Mittelwerte. Die Werte für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. Die Gruppenmittelwerte sind als horizontale Linien eingezeichnet, die Anzahl der analysierten Tiere (n) ist in (C) angegeben. * p < 0,05 (*unpaired t-test*).

3.1.3 Neues Objekt

Mit diesem Test wurde die Neugierde der Mäuse gegenüber unbekanntem Objekten untersucht, wobei die Stressfaktoren, die auf die Maus einwirkten, durch die Durchführung des Tests im Heimkäfig der Maus, so gering wie möglich gehalten wurden. Dadurch konnten mit diesem Test das basale Explorationsverhalten, sowie die basale Furcht der Maus bestimmt werden.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Explorationsverhalten der beiden Genotypen festgestellt werden. Die Wildtypen verbrachten durchschnittlich 15% der Zeit auf der Seite des Objektes und 56% auf der Seite gegenüber dem Objekt. Die CHST-14^{-/-} Mäuse hielten sich mit ca. 11% der Zeit etwas kürzer auf der Seite des Objektes auf, die Zeit gegenüber dem Objekt war mit ca. 53% den Wildtypen entsprechend (vgl. Abb. 4.29 A, B). Wurde die Zeit betrachtet, die die Mäuse brauchten, bis sie zum ersten Mal an dem unbekanntem Objekt schnüffelten, zeigt sich statistisch betrachtet kein signifikanter Unterschied, auch wenn die CHST-14^{-/-} Mäuse mit durchschnittlich 96 Sekunden länger brauchten als die Wildtypen mit durchschnittlich 38 Sekunden (vgl. Abb. 4.29 C). Die Zeit, die Mäuse insgesamt am Objekt schnüffelten, wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf. CHST-14^{-/-} Mäuse schnüffelten durchschnittlich ca. 2 min, Wildtypen etwa 4 min am Objekt (vgl. Abb. 4.29 D).

IV. Ergebnisse

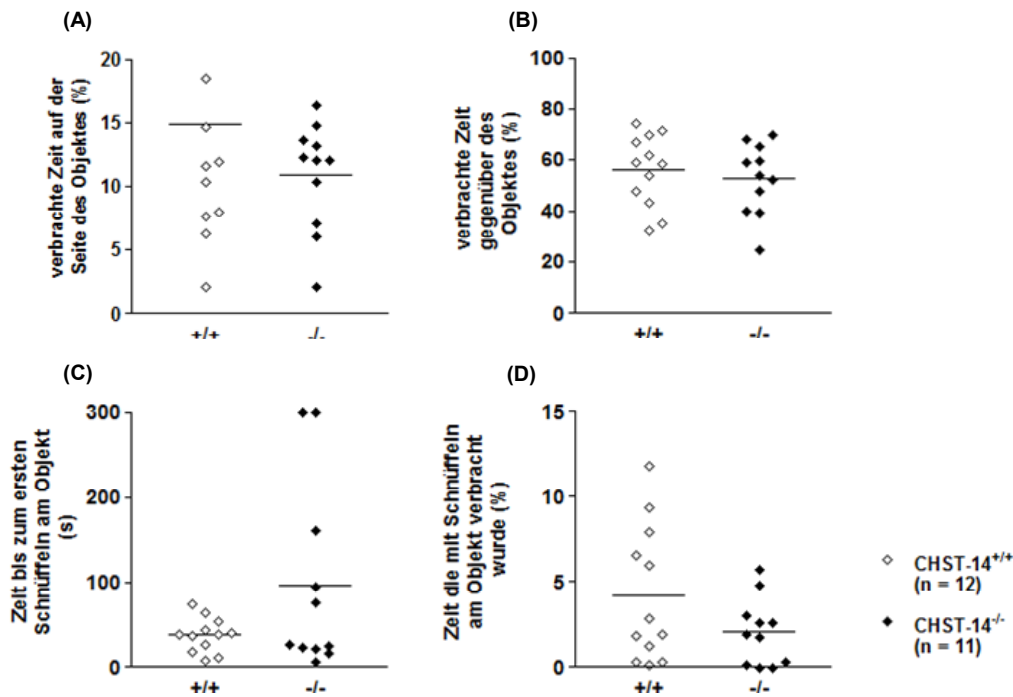


Abb. 4.29: Explorationsverhalten der CHST-14^{-/-} und Wildtyp-Mäuse im „neues Objekt“ Test. Dargestellt ist die verbrachte Zeit auf der Seite des Objekts (A) und gegenüber des neuen Objekts (B) sowie die Zeit die die Tiere brauchten, bis sie zum ersten Mal am neuen Objekt schnüffelten (C) und die Dauer des Schnüffeln am Objekt (D) als individuelle Mittelwerte. Die Werte für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. Die Gruppenmittelwerte sind als horizontale Linien eingezeichnet, die Anzahl der analysierten Tiere (n) ist in (D) angegeben.

3.2. Motorkoordination

3.2.1 Pole Test

Mit dem *Pole* Test wurde die Motorkoordination der Mäuse anhand ihrer Fähigkeit, sich auf einem senkrechten Stab um 180° zu drehen und kopfüber daran herunter zu klettern, getestet.

Hierbei schnitten die CHST-14^{-/-} Mäuse signifikant schlechter ab als ihre wildtypischen Geschwister (vgl. Abb. 4.30). In der Wildtyp-Gruppe waren schon beim ersten Versuch fünf von 12 Mäusen in der Lage sich in den oberen beiden Levels um 180° zu drehen und den Stab Kopf voran herunter zu klettern. Im Laufe der drei durchgeführten Versuche ist ein deutlicher Lerneffekt festzustellen und im dritten Durchgang schafften es zehn aus 12 Tieren die Aufgabe zu erfüllen.

Die CHST-14^{-/-} Mäuse konnten sich nur sehr selten um 180° drehen und rutschten den Stab mehr rückwärts oder seitlich herunter, als dass sie ihn herunter kletterten. Im ersten Versuch

IV. Ergebnisse

erfüllte eine aus 13 Mäusen die Aufgabe, im letzten Durchgang waren es immer noch nur vier aus 13 Tieren, die den Stab koordiniert kopfüber herunterklettern konnten.

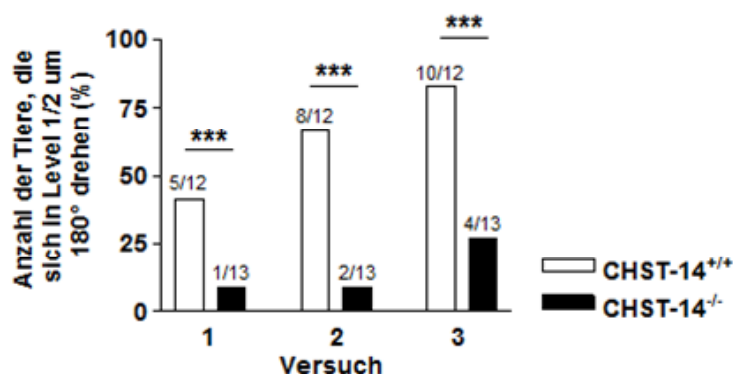


Abb. 4.30: Fähigkeit der Tiere sich im Pole Test um 180° zu drehen und den Stab kopfüber herunter zu klettern. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM der CHST12^{-/-} Mäuse sind als schwarze, die der Wildtypen als weiße Balken dargestellt. Die Anzahl der Tiere, die die Aufgabe erfüllten und die Anzahl der getesteten Tiere sind oberhalb der entsprechenden Balken notiert. *** $p < 0,001$ (Fisher exact probability test).

3.2.2 Rotarod Test

Im Rotarod Test wurde die Motorkoordination der Tiere getestet, indem man überprüfte, wie lange sich die Tiere auf einem sich immer schneller drehenden Stab (Maximalgeschwindigkeit 40 upm) halten konnten.

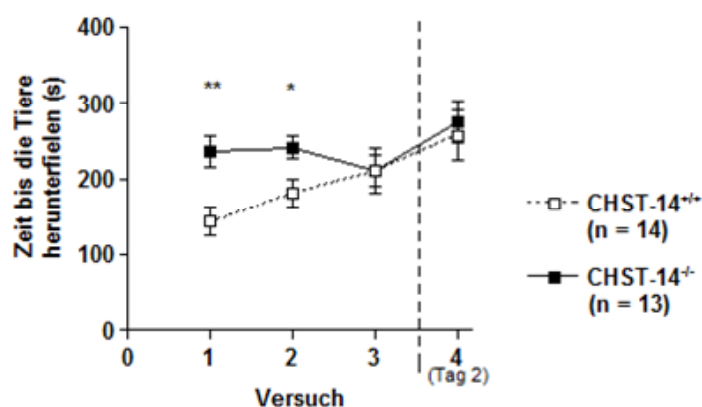


Abb. 4.31: Leistung der CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäuse im Rotarod Test. Dargestellt ist die Zeit, bis die Tiere vom Rotor fielen. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} Tiere sind als schwarze, die für den Wildtyp als weiße Kästchen dargestellt. n beschreibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Newman-Keul post-hoc Test nach two-way ANOVA für wiederholte Messungen).

IV. Ergebnisse

Es wurden drei Durchgänge, mit jeweils mindestens 90 min Pause zwischen den Wiederholungen, durchgeführt. Unterzog man den Parameter „Zeit, bis die Tiere vom Rotor herunterfielen“ *two-way ANOVA* Analysen für wiederholte Messungen, bekam man Hinweise auf einen genotypischen Effekt ($F_{1,33} = 3.6$; $P = 0.06$), sowie auf einen Zusammenhang zwischen Genotyp und Versuchsanzahl ($F_{3,99} = 2.65$; $P < 0.05$).

Im ersten und zweiten Durchgang hielten sich die CHST-14^{-/-} Mäuse mit ca. 239 Sekunden deutlich länger auf dem Rotor als die CHST-14^{+/+} Mäuse mit durchschnittlich 144 Sekunden (1. Versuch) bzw. 180 Sekunden im zweiten Versuch. Im dritten Versuch konnten sich beide Genotypen ca. 211 Sekunden auf dem Rotor halten und auch beim vierten Versuch am Folgetag zeigten CHST-14^{-/-} Mäuse und die wildtypischen Geschwister mit etwa 270-280 Sekunden die gleiche Leistung (vgl. Abb. 4.31).

3.3 Sozialverhalten

3.3.1 Resident-Intruder-Test

Mit Hilfe des *Resident-Intruder-Tests* wurde das Aggressivitätsverhalten der Mäuse untersucht.

Konfrontierte man CHST-14^{-/-} Mäuse und ihre wildtypischen Geschwister mit fremden Männchen in ihrem Heimkäfig, konnte kein Unterschied im Verhalten beider Gruppen gegenüber dem Eindringling festgestellt werden. Weder die Wildtypen noch die CHST-14^{-/-} Tiere griffen das fremde Männchen während der zehn Minuten des Testes an (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Urin-Markierung

Urin-Markierungen sind ein wichtiger Bestandteil im Sozialverhalten männlicher Mäuse. Durch das gezielte Verteilen von Urintropfen, wird das Revier markiert und gleichzeitig werden Weibchen über die Anwesenheit eines paarungsbereiten Männchens informiert.

Die CHST-14^{+/+} und CHST-14^{-/-} Mäuse wurden zu fremden Weibchen gesetzt, die sie, nur durch eine Trennwand getrennt, beschnüffeln konnten und ihr Verhalten wurde für 30 min beobachtet.

IV. Ergebnisse

Two-way ANOVA Analysen für wiederholte Messungen zeigten in Bezug auf die zurückgelegte Strecke einen signifikanten Effekt zwischen den Genotypen ($F_{1,20} = 3.9$; $P < 0.05$), d.h., die CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtypen eine geringere Bewegungsaktivität (vgl. Abb. 4.32).

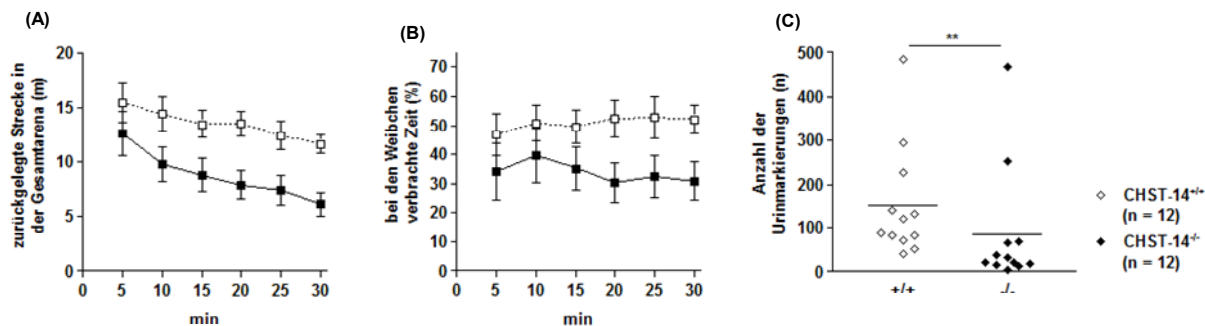


Abb. 4.32: Attraktivität der Weibchen auf CHST12^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäuse im Urin-Markierungstest. Dargestellt sind die zurückgelegte Strecke in der Gesamtarena (A) und die bei den Weibchen verbrachte Zeit (B) als Gruppenmittelwerte \pm SEM, die Anzahl der Urin-Markierungen (C) sind als individuelle Mittelwerte (der Gruppenmittelwert als horizontale Linie) dargestellt. Die Werte für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. Die Anzahl der analysierten Tiere (n) ist in (C) angegeben. ** $p < 0.01$ (two-way ANOVA für wiederholte Messungen).

Wurde die Zeit betrachtet, die die beiden Gruppen bei den Weibchen verbrachten, war ebenfalls ein signifikanter genotypischer Effekt ($F_{1,20} = 5.0$; $P < 0.05$) zu erkennen. Während die Wildtypen ca. 51% der Zeit bei den Weibchen verbrachten, zeigten sich die CHST12^{-/-} Tiere, mit durchschnittlich 31% bei den Weibchen verbrachter Zeit, deutlich weniger interessiert (vgl. Abb. 4.32 B). Dieses fehlende Interesse spiegelte sich auch in der Anzahl der Urin-Markierungen wieder. Bis auf zwei Tiere, die knapp 300 bzw. 500 Markierungen setzten, lag die Anzahl der Markierungen bei den CHST12^{-/-} Mäusen deutlich unter 100. Auch bei den Wildtypen waren drei Tiere, die deutlich mehr Markierungen setzten als die anderen Wildtypen, der durchschnittliche Wert lag für diese Gruppe jedoch bei ca. 150 Markierungen (vgl. Abb. 4.32 C).

3.4 Lernen und Gedächtnis

3.4.1 Spontane Alternation im Y-Labyrinth

Mit diesem Test wurde das Arbeitsgedächtnis der Tiere untersucht. Mäuse haben das Bestreben immer neue Dinge zu erkunden. Daher wäre zu erwarten, dass sie in einem

IV. Ergebnisse

Y-förmigen Labyrinth die drei Arme abwechselnd aufsuchen, was bedeutet, dass sie in der Lage sein müssen sich zu erinnern, in welchem Arm sie zuvor waren.

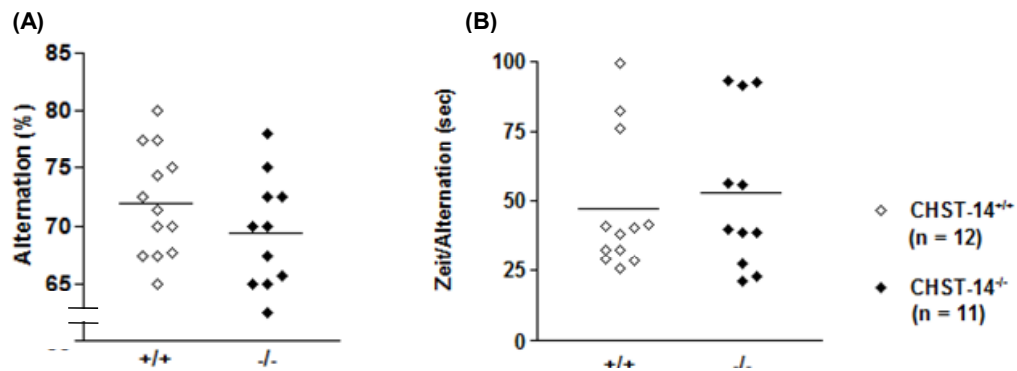


Abb. 4.33: Spontane Alternation der CHST-14^{+/+} und CHST-14^{-/-} Mäuse im Y-Labyrinth. Dargestellt sind die Alternation in Prozent (A), sowie die für eine Alternation benötigte Zeit (B) als individuelle Mittelwerte. Die für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. Die Gruppenmittelwerte sind als horizontale Linien eingezeichnet, die Anzahl der analysierten Tiere (n) ist in (B) angegeben.

Die CHST-14^{+/+} und CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten keine Unterschiede bei der Häufigkeit der Alternation und waren gleichermaßen in der Lage sich zu erinnern, welchen Arm sie als Letztes aufgesucht haben. Die Wildtypen alternierten durchschnittlich 72%, die CHST-14^{-/-} Mäuse 69% (vgl. Abb. 4.33 A). Auch bei der Zeit, die die Tiere durchschnittlich pro Alternation benötigten, ist mit 47 Sekunden für den Wildtyp und 53 Sekunden für die CHST-14^{-/-} Mäuse kein signifikanter Unterschied festzustellen (vgl. Abb. 4.33 B).

3.4.2 One trial spatial learning Test

Der *one trial spatial learning* Test wurde verwendet, um das räumliche Lernen, bzw. Gedächtnis zu untersuchen, indem die Tiere lernen und sich einen Tag später daran erinnern müssen, in welcher Hälfte der in zwei Räume unterteilten Arena und welcher Ecke sich Weibchen befanden.

Am ersten Tag (Lernen) wurden die Mäuse für 20 Minuten in die Arena gesetzt und analysiert, wieviel Zeit sie in der Zielzone der Weibchen und in der Zielzone ohne Weibchen verbrachten. Die CHST-14^{-/-} Tiere hielten sich mit ca. 37% der Zeit genauso lange in der Zielzone der Weibchen auf, wie die Wildtypen mit ca. 38%. Beide Genotypen verbrachten mit je ca. 14% deutlich weniger Zeit in Zielzone ohne Weibchen (vgl. Abb. 4.34 A). Beim Recall am nächsten Tag wurden in die Zielzone der Weibchen keine Weibchen gesetzt. Die Wildtypen verbrachten in beiden Zielzonen je ca. 20% der Zeit und es war keine Präferenz

IV. Ergebnisse

für eine der beiden Zonen festzustellen. Die CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten hingegen eine Präferenz für die Zielzone mit Weibchen. Sie hielten sich durchschnittlich 23% der Zeit in der Zielzone auf, in der am Vortag die Weibchen saßen, während sie nur etwa 14% der Zeit in der Zielzone ohne Weibchen verbrachten (vgl. Abb. 4.34 B).

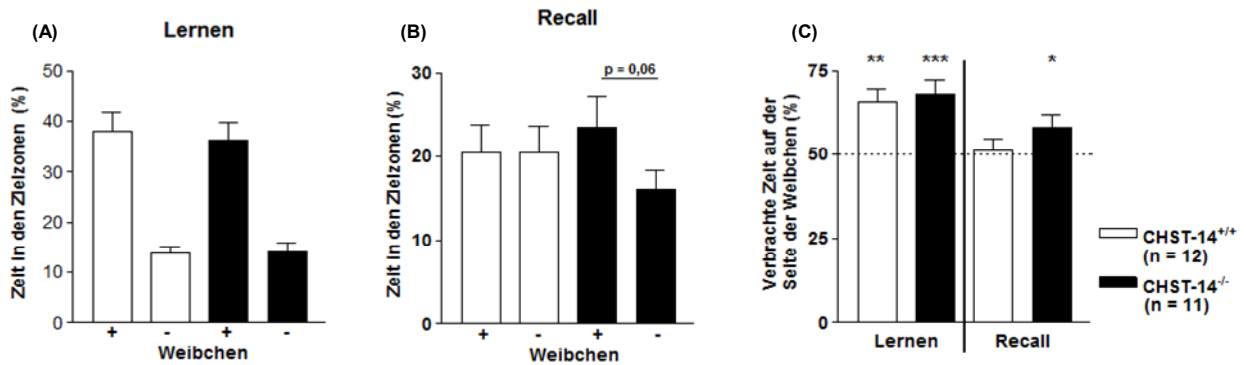


Abb. 4.34: Aufenthalt der CHST14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäuse in den Zielzonen im *one trial spatial learning* Test. Dargestellt ist die verbrachte Zeit in der Zielzone mit Weibchen (+ Weibchen) und ohne Weibchen (- Weibchen) während des Lern-Versuches (A) und des Recalls (B) sowie die verbrachte Zeit in der Zielzone mit Weibchen im Lern-Versuch und im Recall (C) als Gruppenmittelwerte \pm SEM. Die Werte der CHST12^{-/-} Mäuse sind als schwarze, die Werte der Wildtypen als weiße Balken dargestellt. Die Anzahl (n) der getesteten Tiere pro Genotyp ist in (C) angegeben. $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ verglichen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% (*Wilcoxon signed-rank Test*). Die gestrichelte Linie in (C) gibt die Wahrscheinlichkeit von 50% an.

Die Arena war durch eine Trennwand in zwei Hälften geteilt, die über einen Durchgang verbunden waren. Wurde die Aufenthaltsdauer der Tiere in der Hälfte der Weibchen im Lernversuch und im Recall miteinander verglichen, war im Lernversuch bei beiden Genotypen eine deutliche Präferenz für die Hälfte der Weibchen zu erkennen. Die Wildtypen verbrachten mit 68% der Zeit und die CHST-14^{-/-} Mäuse mit ca. 66% der Zeit signifikant mehr Zeit in dieser Hälfte, als in der Hälfte ohne Weibchen.

Beim Recall war diese Präferenz bei den Wildtypen nicht mehr zu erkennen, sie verbrachten nur etwa 51% der Zeit in der Hälfte der Weibchen. Die CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten mit ca. 58% der in der Hälfte der Weibchen verbrachten Zeit noch eine Präferenz für diese Seite (vgl. Abb. 4.34 C).

Der Präferenz-Index für den Weibchen-Quadrant berechnete sich als Quotient aus der verbrachten Zeit im Weibchen-Quadrant und der Summe aus der verbrachten Zeit im Weibchen-Quadrant und ohne-Weibchen-Quadrant.

Während die CHST-14^{-/-} Tiere im Recall außer in den ersten fünf Minuten mit durchschnittlich 59% eine deutliche Präferenz für den Weibchen-Quadrant zeigten, zeigten die wildtypischen

IV. Ergebnisse

Geschwister nur in den ersten 10 Minuten mit etwa 58% eine Präferenz für den Weibchen-Quadrant. Die letzten 20 Minuten zeigten die Wildtypen nur einen Präferenz-Index von 45% für den Weibchen-Quadrant und hielten sie sich etwas mehr im ohne-Weibchen-Quadrant auf (vgl. Abb. 4.35 A).

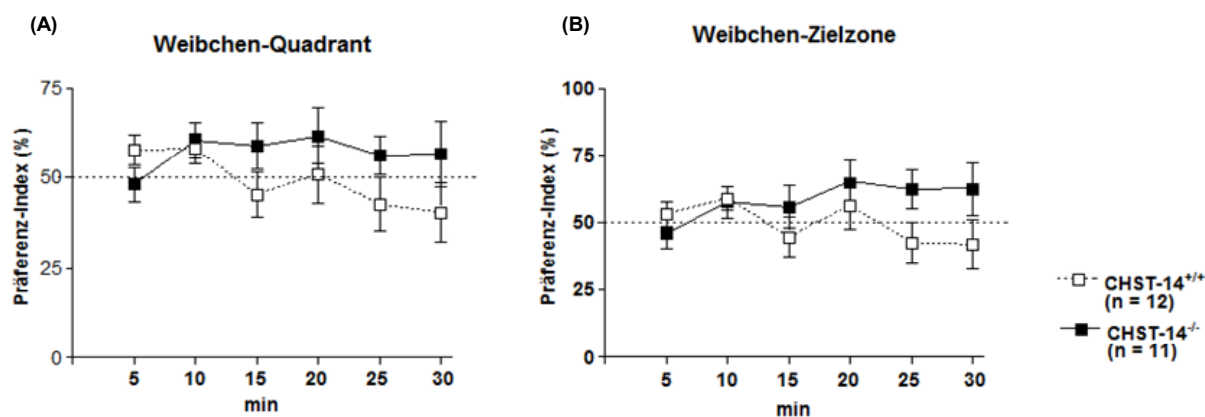


Abb. 4.35: Präferenz Index der CHST14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäuse im *one trial spatial learning* Test. Dargestellt ist der Präferenz-Index für den Weibchen-Quadrant (A) und die Weibchen-Zielzone (B) als Gruppenmittelwerte \pm SEM. Die Werte für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. Die Anzahl der analysierten Tiere (n) ist in (B) angegeben. (Newman-Keul post-hoc Test nach *two-way ANOVA* für wiederholte Messungen). Die gestrichelte Linie gibt die Wahrscheinlichkeit von 50% an.

Der Präferenz-Index für die Weibchen-Zielzone berechnete sich als Quotient aus der verbrachten Zeit in der Zielzone der Weibchen und der Summe aus der verbrachten Zeit in der Zielzone der Weibchen und in der Zielzone ohne Weibchen.

Die Wildtypen zeigten in den ersten 10 Minuten des Recalls einen Präferenz-Index von ca. 56% für die Weibchen-Zielzone, in den letzten 20 Minuten des Experiments fiel der Wert auf durchschnittlich 46% ab. Die CHST-14^{-/-} Mäuse hingegen zeigten in den ersten 5 Minuten des Recalls einen Präferenz-Index von nur etwa 46%, in den folgenden 10 Minuten steigerte sich der Wert auf durchschnittlich 57% und erreichte in den letzten 15 Minuten des Versuchs einen Wert von ca. 63% (vgl. Abb. 4.35. B).

3.4.3 Fear conditioning and extinction

Extinction ist eine Form des Gedächtnisses, das Konditionierung voraussetzt. Bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau, lernten die Mäuse am ersten Versuchstag, durch leichte Stromschläge, eine *fear conditioning* Kammer mit einer negativen Erfahrung zu assoziieren

IV. Ergebnisse

(*Conditioning*/Konditionierung). Am Folgetag wurden die Tiere erneut in diese Kammer gesetzt und sollten sich an die negative Erfahrung erinnern. Indem man sie 30 min in der Kammer ließ, ohne sie erneuten Stromschlägen auszusetzen, sollten sie wiederum lernen, dass ihnen nichts passiert und am dritten Tag, bei erneutem Kontakt mit der Kammer kein erhöhtes Angstverhalten mehr zeigen.

Diese Fähigkeit, das Verhalten an eine sich ändernde Umwelt anzupassen, wurde mit dem *Fear conditioning and extinction* Test untersucht. Als Parameter für die Angst wurde hierbei das *freezing*-Verhalten der Mäuse ausgewertet.

Wie erwartet zeigten beide Gruppen im Konditionierungsversuch am ersten Tag, vor dem ersten Stromschlag kein *freezing* und nach den beiden Stromschlägen war sowohl bei den CHST-14^{+/+} als auch bei den CHST-14^{-/-} Mäusen *freezing*-Verhalten festzustellen, wobei kein Unterschied in der Häufigkeit zwischen den beiden Genotypen (ca. 4,3%) festgestellt werden konnte.

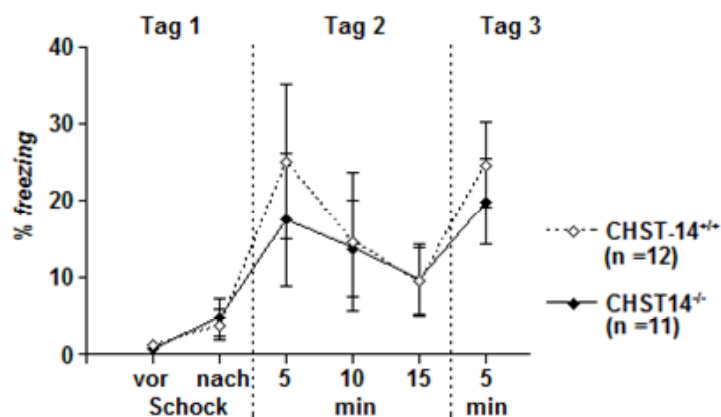


Abb. 4.36: Verhalten der CHST-14^{+/+} und CHST-14^{-/-} Mäuse im *Fear conditioning and extinction* Test. Dargestellt ist das *freezing*-Verhalten vor und nach dem Stromschlag am ersten Tag sowie am zweiten und dritten Tag. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} Tiere (-/-) sind als schwarze, die für den Wildtyp (+/+) als weiße Rauten dargestellt. n gibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp an.

Konfrontierte man die Tiere am nächsten Tag erneut mit der *fear conditioning* Kammer, reagierten sowohl CHST-14^{+/+} als auch CHST-14^{-/-} Mäuse mit verstärktem *freezing*. Die Wildtypen zeigten in den ersten 5 Minuten 25% der Zeit *freezing*, was sich im Laufe der 15 Minuten des Versuches auf ca. 10% *freezing* reduzierte. Bei den CHST-14^{-/-} Geschwistern war in den ersten 5 Minuten für 18% der Zeit *freezing*-Verhalten zu beobachten, der Wert glich sich aber nach 15 Minuten mit 10% *freezing*, dem Wert der Wildtypen an. Als die Mäuse am dritten Tag erneut in die *fear conditioning* Kammer gesetzt

IV. Ergebnisse

wurden, zeigten sie das gleiche *freezing*-Verhalten, wie in den ersten 5 Minuten des zweiten Tages. (vgl. Abb. 4.36).

3.5 Stress

3.5.1 Tail suspension Test

Mit dem *tail suspension* Test wurde ein Parameter untersucht, den die Verhaltensbiologen als *depression* oder *learned helplessness* bezeichnen. Dies bezeichnet das Bestreben einer Maus, sich aus einer misslichen Lage zu befreien, bzw. ob die Maus irgendwann erkennt, dass die Situation ausweglos ist und aufgibt.

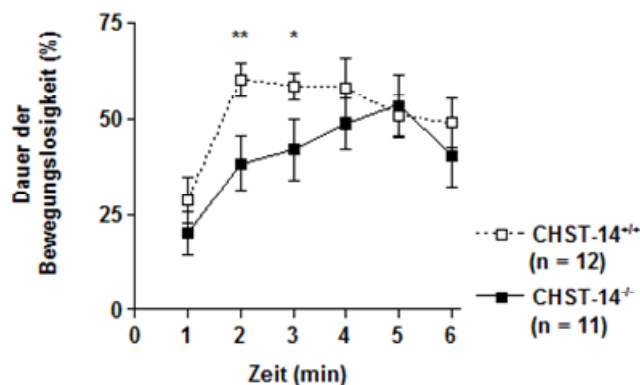


Abb. 4.37: Dauer der Bewegungslosigkeit der CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäuse im *tail suspension* Test. Dargestellt ist die Zeit, die die Mäuse bewegungslos verharrten. Die Gruppenmittelwerte \pm SEM für CHST-14^{-/-} Tiere sind als schwarze, die für den Wildtyp als weiße Kästchen dargestellt. n gibt die Anzahl der analysierten Tiere pro Genotyp an.

In diesem Versuch wurde dieses Bestreben daran gemessen, wie lange die Maus, die frei schwingend am Schwanz aufgehängt wurde, mit den Vorder- und Hinterbeinen strampelt, bzw. regungslos verharrt. *Two-way ANOVA* Analysen für wiederholte Messungen zeigten einen signifikanten Unterschied der Genotypen in Bezug auf die Dauer der Bewegungslosigkeit ($F_{1,26} = 4.8$; $P < 0.05$). Zu Beginn war kein Unterschied zwischen CHST-14^{-/-} und CHST-14^{+/+} Mäusen festzustellen, beide Gruppen versuchten sich kräftig frei zu strampeln und waren in der ersten Minute nur ca. 25% der Zeit bewegungslos. Nach zwei Minuten gaben die Wildtypen jedoch deutlich auf und hingen schon ca. 60% der Zeit ohne Befreiungsversuche. Die CHST-14^{-/-} Mäuse brauchten hingegen wesentlich länger um aufzugeben. Nach zwei Minuten hingen sie nur ca. 38% der Zeit still und erst nach fünf Minuten verharrten sie, wie die Wildtypen, ca. 50% der Zeit regungslos (vgl. Abb. 4.37).

V. Diskussion

Projekt 1

Konstruktion der Zielvektoren zur Generierung einer konstitutiven TN-N KO-Maus und einer konditionalen CHST-12^{flox/flox} Maus

1. Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer TN-N KO-Maus

TN-N ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Tier zeitlich und räumlich reguliert exprimiert wird (Scherberich et. al., 2003; Neidhardt et. al., 2003). In Niere, Milz und im Gehirn konnte eine Kolokalisation von TN-N mit TN-C beobachtet werden und es wird vermutet, dass der überraschend milde Phänotyp der TN-C Knockout-Maus mit der Kompensation durch TN-N in einigen Geweben zusammen hängt (Scherberich et. al., 2003). Um die Rolle von TN-N *in vivo* genauer untersuchen zu können, sollte eine TN-N Knockout-Maus generiert werden.

Der TN-N-Genlocus besteht aus 22 Exonen und 21 Introns, von denen Exon 1 nicht kodierend ist. Zur Herstellung der TN-N KO-Maus sollten die Exone 2-4 deletiert werden. Dies hatte den Hintergrund, die Transkription aller potentiellen mRNAs zu verhindern, denn Untersuchungen der TN-N-Gensequenz auf potentielle Start-ATGs zeigten, dass dem ersten ATG in Exon 2 insgesamt vier weitere ATG in den Exonen 2 und 3 folgten, die im Leserahmen lagen und als potentieller Translationsstart dienen könnten. Da außerdem zwischen Exon 3 und 4 eine nur 766 bp große Intronregion folgte, wurde entschieden auch Exon 4 zu deletieren. So sollte sichergestellt werden, dass eventuelle regulatorische

V. Diskussion

Elemente in der Intronregion zwischen Exon 3 und 4 durch die Integration der Neomycin/Kanamycin-Kassette nicht zerstört werden.

Der TN-N Zielvektor sollte so konstruiert werden, dass 5' von Exon 2 eine einzelne loxP-Erkennungssequenz und 3' von Exon 4 eine FRT/loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette integriert war. Der genomische TN-N-Genlokus, der aus den Exonen 2-4 sowie ausreichend großen Intronsequenzen 5' von Exon 2 und 3' von Exon 4 bestand, wurde erfolgreich aus einer λ -ko2 Phagenbibliothek isoliert.

Eine einzelne loxP-Erkennungssequenz 5' von Exon 2 konnte über homologe Rekombination in den TN-N genomischen Lokus integriert werden. Der Versuch, die FRT/loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette über homologe Rekombination 3' von Exon 4 zu integrieren, war jedoch auch nach mehrfacher Wiederholung nicht erfolgreich. Sequenzierung der TN-N homologen Bereiche, des 3' TN-N loxP-neo/kan-loxP Fragments und der Zielsequenz zeigten, dass Fehler in der Sequenz nicht als Ursache für die erfolglose Rekombination in Frage kommen. Neben Fehlern in der Sequenz könnten auch Sekundärstrukturen wie z.B. Haarnadelstrukturen in Frage kommen, des Weiteren könnte der ausgesuchte homologe Bereich Elemente enthalten, die die homologe Rekombination in Bakterien beeinträchtigen könnten. Die Bakterien können als Ursache ausgeschlossen werden, da die gleichen Bakterien auch für die Integration der 5' loxP-Erkennungssequenz und zur Klonierung des CHST-12 Zielvektors verwendet wurden und in diesen Beispielen die homologe Rekombination erfolgte.

Da die FRT/loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette nicht in den TN-N-genomischen Lokus rekombinierte, wurde die Strategie geändert und anstelle des konditionalen TN-N Zielvektors ein konstitutiver TN-N-Knockout Zielvektor hergestellt, in dem der genomische Bereich der Exone 2-4 erfolgreich gegen die Neomycin/Kanamycin-Kassette ausgetauscht wurde. 5' der Neomycin/Kanamycin-Kassette befindet sich eine einzelne loxP-Erkennungssequenz, die durch die alternative Strategie nicht entfernt wurde.

Dieser TN-N Zielvektor wurde zur Transfektion mausembryonaler Stammzellen verwendet und die genomische DNA aus 288 über Neomycin-Resistenz selektierten ES-Zellklonen, auf erfolgreiche homologe Rekombination des Zielvektors in den TN-Lokus überprüft. Die Genotypisierung der ES-Zellklone mittels PCR führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Trotz der Verwendung unterschiedlicher Primer, $MgCl_2$ Konzentrationen (0,5-3 mM $MgCl_2$), Hybridisierungstemperaturen (58°C-69°C) und Polymerasen, konnte kein Fragment in der berechnete Größe amplifiziert werden. Eine mögliche Ursache könnten eventuelle Sekundärstrukturen der DNA sein, die sich trotz einer Dissoziationstemperatur von 95°C nicht aufgelöst haben und eine Anlagerung der Primer verhindern.

V. Diskussion

Ein Problem könnte auch die Größe der erwarteten PCR Produkte sein, die mit ca. 3,3 kb für eine PCR aus genomischer DNA sehr groß waren. Da sich aber die Wildtyp DNA von der Knockout-DNA nur durch die Sequenz der integrierten Neomycin/Kanamycin-Kassette unterscheidet, musste zur Identifizierung erfolgreich rekombinierter Klone ein Primer so gewählt werden, dass er innerhalb der Neomycin/Kanamycin-Sequenz bindet und der zweite Primer musste außerhalb der Zielvektor-Sequenz lokalisiert sein. Da der kurze homologe Arm des TN-N Zielvektors jedoch schon 3047 Bp lang war, war es nicht möglich das PCR-Produkt kleiner zu wählen.

Die Analyse der 288 ES-Zellklone über Southern-Blot zeigte, dass keiner der ES-Zellklone den TN-N Zielvektor homolog in das TN-N-Genom integriert hatte. Es konnte nur das wildtypische Allel nachgewiesen werden, jedoch nie das Knockout-Allel.

Die Zugänglichkeit des Genlokus ist von entscheidender Bedeutung für die homologe Rekombination (Haines und Brodeur, 1998). Wäre die genomische Region durch sekundäre DNA Strukturen nicht zugänglich oder wäre das TN-N Gen in ES-Zellen inaktiviert, könnte dies die Effizienz der homologen Rekombination deutlich beeinträchtigen. Des Weiteren ist homologe Rekombination ein seltenes Ereignis. Zur Herstellung der TN-RKO-Maus wurden in 1100 analysierten ES-Zellklonen drei homolog rekombinierte Klone identifiziert, was eine Erfolgseffizienz von ca. 0,25% bedeutet (Neidhardt, 2001). Dies bedeutet, dass für die Konstruktion der TN-N Knockout-Maus mehr ES-Zellklone *gescreent* werden müssen, um einen homolog rekombinierten Klon zu identifizieren. Der zeitliche Rahmen dieser Doktorarbeit war hierfür jedoch nicht mehr ausreichend.

2. Konstruktion des Zielvektors zur Herstellung einer CHST-12 KO-Maus

Die Kohlenhydrat-Sulfotransferase-12 (CHST-12) gehört zur Familie der HNK-1-Sulfotransferasen und ist mitverantwortlich für die Sulfatierung der Chondroitin-Reste in den Glykosaminoglykan-Ketten der Chondroitinsulfat-Proteoglykane. Die CHST-12^{-/-} Maus bietet die Möglichkeit, die Bedeutung der Sulfatierung, bzw. den Einfluss der fehlenden Sulfatierung *in vivo* zu untersuchen. Der erste Schritt in der Herstellung der KO-Maus besteht in der Konstruktion des Zielvektors.

Das CHST-12-Gen besteht aus 2 Exonen, von denen aber nur Exon 2 kodierend ist. Somit kann mit der Deletion des zweiten Exons die Translation eines funktionellen Proteins verhindert werden. Die 5' loxP-Erkennungssequenz wurde über homologe Rekombination

V. Diskussion

erfolgreich in das Exon 2 integriert. Der Integrationsort wurde deshalb nicht innerhalb der Intronregion 5' von Exon 2 gewählt, weil eventuelle Promotor- oder Enhancer-Elemente, die in dieser Intronregion liegen könnten, nicht zerstört werden sollten. Somit sollte sichergestellt werden, dass das funktionelle Protein in der CHST-12^{flox/flox} Maus noch gebildet werden kann. Gleichzeitig wurde jedoch darauf geachtet, dass der loxP-Integrationsort 5' des Start-ATG liegt, um nach Cre-Expression und erfolgreicher Exzision des loxP-flankierten Exons, in der CHST-12^{-/-} Maus, die Translation des Proteins zu verhindern. 3' von Exon 2 wurde über homologe Rekombination eine FRT/loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette integriert.

Der in dieser Arbeit hergestellte CHST-12 Zielvektor bietet somit die Möglichkeit den CHST-12-Genlocus in mausembyonalen Stammzellen so zu verändern, dass -nach *in vitro* Expression der Cre-Rekombinase- ES Zellen entstehen, die entweder einen konstitutiven CHST-12 KO- oder einen konditionalen loxP-flankierten CHST-12-Lokus besitzen. Diese manipulierten ES-Zellen können, nach Injektion in die Blastozyste, zur Herstellung der entsprechenden CHST-12^{-/-} oder CHST-12^{flox/flox} Mäuse verwendet werden.

Projekt 2

Analyse der CHST-14 KO-Maus

Phänotypische Analyse der CHST-14^{-/-} Mäuse

CHST-14^{-/-} Mäuse sind deutlich kleiner und leichter als ihre wildtypischen Geschwister. Sie werden mit geringerer Mendelscher Frequenz geboren und einige adulte Tiere zeichnen sich durch Zahnfehlstellungen aus. In der M5-CB2-KO/F Linie, die zweimal auf C57BL/6J Hintergrund rückgekreuzt wurde, besitzen einige Tiere außerdem deformierte Schwänze, die bei den CHST-14^{-/-} Tieren der M5-CB2-KO Linie, die nur einmal auf C57BL/6J rückgekreuzt wurde, nur direkt nach der Geburt beobachtet werden konnten.

Die Chondroitinsulfat-Proteoglykane Decorin und Biglycan spielen bei der Zahnentwicklung, besonders bei der Zahnschmelzbildung, eine bedeutende Rolle (Matsuura et al., 2001; Goldberg et. al., 2005). Decorin^{-/-} Mäuse zeigten eine Verzögerung in der Zahnschmelzbildung, während Biglycan^{-/-} Mäuse eine beschleunigte Zahnschmelzbildung

V. Diskussion

aufwiesen. Biglycan bindet den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (*fibroblast growth factor-2*; FGF-2) und den *transforming growth factor β* (TGF β) (Weber et al., 2001; Kinsella et al., 1997), Decorin bindet den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) (Csordas et al., 2000; Iozzo et al., 1999). Goldberg et al., (2005) postulieren, dass Biglycan auch direkt an Membran-Rezeptoren binden kann und dadurch Signaltransduktion und Zellmetabolismus beeinflusst, so wie es auch für Decorin gezeigt werden konnte (Csordas et al., 2000; Iozzo et al., 1999). Wie genau diese Bindung von Biglycan und Decorin an die Rezeptoren stattfindet ist nicht bekannt. Da Sulfatierungsmuster die Spezifität eines Liganden erhöhen ist nicht auszuschließen, dass die sulfatierten Chondroitin- bzw. Dermatansulfate der Glykosaminketten dieser Glykoproteine bei der Rezeptor-Bindung eine wichtige Rolle spielen und so die fehlende oder unzulängliche Sulfatierung zu Zahnfehlbildungen führt.

Die bei den CHST-14^{-/-} Mäusen beobachtete verringerte Geburtsrate und das verringerte Gewicht dieser Tiere, wurde auch für die Biglycan/Decorin Doppelknockout-Maus beschrieben (Corsi et al., 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Knochensubstanz der Doppelknockouts reduziert ist (Ameys und Young, 2002). Messungen der Knochendichte der CHST-14^{-/-} Mäuse, könnte Aufschluss darüber geben, ob das geringere Gewicht und die geringere Größe CHST-14^{-/-} Tiere auf eine reduzierte Knochensubstanz zurückzuführen ist.

Dass einige Phänotypen, wie die Elefantenzähne oder der deformierte Schwanz, nur bei einigen Tieren zu erkennen ist, könnte mit dem gemischten genetischen Hintergrund der Tiere zusammenhängen, da diese bisher nur einmal bzw. zweimal auf C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt wurden. Einen reinen genetischen Hintergrund erhält man jedoch erst nach ca. 11 Rückkreuzungen.

Untersuchungen zur Beteiligung der CHST-14 an der Regeneration des ZNS

Nach Verletzungen des ZNS bildet sich eine Gliaarbe, die unter anderem reich an Chondroitinsulfat-Proteoglykanen ist. Da die Entfernung der Glykosaminoglykan-Ketten den inhibierenden Einfluss dieser CSPGs mindert, wird davon ausgegangen, dass die GAG-Reste eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung der Regeneration des ZNS spielen (Mc Keon et al., 1995; Zuo et al 1998; Silver and Miller 2004). Diese Vermutung wird dadurch bestätigt, dass Chondroitinase-Behandlung nach Läsionen des ZNS in Ratten zu einer Verbesserung der funktionellen Regeneration führt (Bradbury et al., 2002; Caggiano et al., 2005).

V. Diskussion

Im Hinblick auf diese Befunde, wurde erwartet, dass durch die Deletion der CHST-14, eine bessere funktionelle Regeneration eintritt, da die Menge an sulfatierten Dermatansulfaten reduziert sein sollte. Überraschenderweise war die funktionelle Regeneration nach Rückenmarksläsion in CHST-14^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu rückenmarksläsionierten Wildtypen, verschlechtert. Der überraschende Befund, dass das Fehlen der CHST-14 im läsionierten Rückenmark in Bezug auf die Regeneration nachteilig war, warf nun die Frage auf, ob zwischen der Rolle der Chondroitinsulfat und Dermatansulfate bezüglich der Regeneration des ZNS unterschieden werden muss, d.h. ob die Dermatansulfate bei der Regulierung des Axonwachstums nach Verletzungen die gleiche inhibierende Funktion besitzen, wie die Chondroitinsulfate. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die fehlende Sulfatierung die Eigenschaften der Moleküle so verändert, dass die noch stärker inhibierend auf die Regeneration der Nervenzellen wirken.

Eine Methode, die motorischen Fähigkeiten von Ratten und Mäusen nach Rückenmarksläsionen zu bewerten, ist die BBB-Skala für die *open field*-Lokomotion. In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der Mäuse zum *plantar stepping* mit Hilfe eines weiteren Parameters, nämlich des *footstepping* Winkels (Apostolova et al., 2006) analysiert. Zusätzlich wurden noch komplexere Motorfunktionen als das *plantar stepping* untersucht. Zum einen der rump-height Index, der als Maß für die Fähigkeit der Tiere das eigene Körpergewicht während der Lokomotion zu tragen dient und zum anderen der Streck-Beugewinkel im Stift-Test, der die Fähigkeit der Mäuse bewertet, ihre Extremitäten ohne Unterstützung des Körpergewichts zu bewegen. Sowohl der BBB-Wert, als auch die numerischen Parameter, die für die funktionellen Analysen verwendet wurden, hängen mit der Schwere der Läsion und somit mit dem Volumen der Glianarbe zusammen (Kloose et al., 2005; Apostolova et al., 2006). Es konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden, ob die Regenerationsfähigkeit mit der Größe der sich bildenden Glianarbe korrelierte, da das Gewebe an der Glianarbe nach Anfertigung der Cryoschnitte zerrissen und unvollständig war, und so das Narbenvolumen nicht bestimmt werden konnte. Hierfür müssten weitere Tiere läsioniert und neue Cryoschnitte angefertigt werden, die zur Bestimmung des Narbenvolumens geeignet sind. Die schlechtere Regeneration ist jedoch nicht auf eine unterschiedliche Größe des Rückenmarks der beiden Genotypen zurückzuführen, denn nicht nur der Gesamtdurchmesser, sondern auch die weiße und graue Substanz war zwischen CHST-14^{-/-} Mäusen und Wildtypen identisch.

Mikroglia sind nach Verletzungen des ZNS u.a. an der Regulation der Gliosis, die zur Bildung der Glianarbe führt, beteiligt. Des Weiteren war bekannt, dass die Dichte der Mikroglia in der Hirnrinde, im Hippokampus und im Cerebellum der CHST-14^{-/-} Mäuse im Vergleich zum Wildtyp um 30% erhöht ist (Laczynska und Schachner, unveröffentlichte Daten). Daher

V. Diskussion

wurde die Mikroglia-Antwort nach Läsionen des Rückenmarks untersucht, da eine verstärkte Mikroglia-Antwort die Regeneration beeinflussen könnte. Bei der Betrachtung der Dichte der Iba-1 positiven Zellen sechs Wochen nach der Läsion, war jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen. Dies zeigt, dass es keinen Unterschied in der Mikroglia-Antwort der CHST-14^{-/-}Mäuse nach Rückenmarksläsionen im Vergleich zum Wildtyp gibt.

Monoaminerge absteigende Bahnen im Vorder- und Hinterstrang des Rückenmarks die ihren Ursprung in der *formatio reticularis*, den Raphekernen, dem *locus coeruleus*, dem *pretectum* und der *substantia nigra* haben, modulieren die Erregbarkeit der Rückenmark-Schaltkreise, die rhythmisch koordinierte Bewegungen auslösen und kontrollieren (Fouad und Pearson 2004). Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Fähigkeiten zur Regeneration zwischen den beiden Genotypen durch Unterschiede in der monoaminergen Re-Innervierung des Rückenmarks caudal der Läsionsstelle zu erklären sind, wurden katecholaminerge (TH-positive) Axone gezählt, die durch eine willkürliche Grenze 250 µm caudal der Läsionsstelle projizieren. Hierbei konnte im Vergleich zu wildtypischen Mäusen, eine Tendenz für eine schlechtere monoaminerge Re-Innervierung des Rückenmarks der CHST-14^{-/-} Mäuse nach Läsionen festgestellt werden. Diese Tendenz müsste durch die Analyse weiterer Tiere bestätigt werden, dies war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchführbar, da aufgrund der reduzierten Geburtsrate, nicht genügend CHST-14^{-/-} Mäuse zur Verfügung standen. Die schlechtere Re-Innervierung durch katecholaminerge Zellen wäre auf jeden Fall eine Erklärung für die schlechtere Regenerationsfähigkeit der CHST-14^{-/-} Mäuse.

Da in Ratten gezeigt werden konnte, dass Chondroitinase-Behandlung nach Läsionen zu einer Verbesserung der funktionellen Regeneration führt (Moon et al., 2001; Bradbury et al., 2002; Caggiano et al., 2005; Galtrey et al., 2007), sollte die Regeneration der CHST-14^{-/-} Mäuse und ihrer wildtypischen Geschwister nach Chondroitinase-Behandlung untersucht werden. Bislang wurde diese Behandlung nur an Ratten beschrieben und für die Injektion des Enzyms in Mäuse war nichts bekannt. Daher wurden die bei der Ratte eingesetzten Mengen auf die durchschnittliche Größe und das Gewicht einer Maus umgerechnet und 1 µl Chondroitinase ABC mit einer Konzentration von 10 U/ml für die Injektionen eingesetzt. Um zu gewährleisten, dass das Enzym vom Rückenmark aufgenommen werden kann und nicht außerhalb des Rückenmarks wegdiffundiert, wurde zum einen das Volumen so gering wie möglich gehalten und zum anderen die Injektion langsam über einen Zeitraum von ca. drei Minuten vorgenommen. Die erste Injektion erfolgte hierbei unmittelbar nach der Läsion. Da das Enzym *in vivo* jedoch nur etwa vier Tage aktiv ist (Crespo et al., 2007), wurde entschieden, drei und sechs Tage nach der ersten Injektion das Enzym ein weiteres Mal zu

V. Diskussion

injizieren. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass von allen Chondroitinsulfat-Proteoglykane, die während der Bildung der Glianarbe exprimiert werden, die GAG-Ketten abgebaut werden.

Die funktionelle Regeneration der CHST-14^{-/-} und wildtypischen Mäuse nach Chondroitinase-Behandlung konnte nicht untersucht werden, da die CHST-14^{-/-} Mäuse die Chondroitinase-Behandlung nicht überlebten. Dass die Tiere als Folge des operativen Eingriffs gestorben sind wurde ausgeschlossen, da Tiere, die ohne Chondroitinase-Behandlung am Rückenmark läsiert wurden, den Eingriff genauso gut überstanden, wie die Wildtypen. Aus dem gleichen Grund kann auch eine Unverträglichkeit der Narkose ausgeschlossen werden, zumal die Tiere alle aus der Narkose erwachten und während und nach der Operation in Bezug auf Atmung nicht auffällig waren. Dass die eingesetzte Dosis der Chondroitinase ABC für die im Vergleich zum Wildtyp kleineren CHST-14^{-/-} Mäuse zu hoch war kann ausgeschlossen werden, da zwei Tiere die zweite Injektion für zwei Tage überlebten und in der Literatur kein Hinweis auf einen toxischen Effekt der Chondroitinase ABC gefunden wurde. Eine weitere Erklärung für das Sterben der CHST-14^{-/-} Tiere könnte sein, dass diese die Chondroitinase ABC nicht vertrugen. In der Literatur konnten jedoch keine Hinweise auf die Metabolisierung der Chondroitinase ABC gefunden werden, die einen Zusammenhang mit CHST-14 erklären könnten.

Es ist wahrscheinlich, dass der Verlust der CHST-14 durch ein anderes Mitglied der HNK-1-Sulfotransferase-Familie kompensiert wird, was auch die schlechtere funktionelle Regeneration der CHST-14^{-/-} Mäuse, nach Läsionen des Rückenmarks, erklären würde. Um dies zu untersuchen wurden qRT PCRs mit läsiertem Rückenmark der CHST-14^{-/-} Mäuse und der Wildtypen durchgeführt. Hierbei wurden drei Regionen, nämlich die Läsionsstelle sowie je 5 mm Gewebe rostral und caudal der Läsionsstelle und zwei Zeitpunkte, nämlich eine und sechs Wochen nach der Läsion, unterschieden.

Für die verwendeten Haushaltsgene Aktin, GPDH und HPRT konnte kein genotypischer Unterschied in der Expression festgestellt werden. Die Expression von Aktin war eine Woche nach der Läsion an der Läsionsstelle stark hochreguliert, sechs Wochen nach der Läsion war nur noch eine leichte Dysregulation festzustellen. Die GAPDH-Expression war eine Woche nach der Läsion an der Läsionsstelle runterreguliert, sechs Wochen nach der Läsion war keine Dysregulation mehr festzustellen. Für HPRT konnte nach der Läsion in allen analysierten Regionen und Zeitpunkten eine Runterregulation gemessen werden, die an der Läsionsstelle am stärksten war. Diese Dysregulation der Haushaltsgene war nicht überraschend, da in den ersten zehn Tagen nach der Läsion umfassende Umstrukturierungen des Gewebes stattfinden, die zur Bildung der Glianarbe führen und die

V. Diskussion

Hochregulierung von Aktin erklären. Die Runterregulation von GAPDH, HPRT und RPII kann mit dem massiven Zellsterben an der Läsionsstelle erklärt werden.

Die gemessene CHST-14-Expression im läsierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} und wildtypischen Mäuse entsprach den Erwartungen. In einem Vorversuch, der auch als Grundlage der Läsionsexperimente diente, konnte gezeigt werden, dass CHST-14 im wildtypischen Rückenmark an der Läsionsstelle eine und drei Wochen nach der Läsion hochreguliert ist. Diese Beobachtung konnte bestätigt werden. Wie erwartet, lag die CHST-14-Expression in den CHST-14^{-/-} Mäusen an der Nachweisgrenze und bestätigt, dass kein funktionelles CHST-14-Transkript gebildet wird und entsprechend auch kein funktionelles Protein.

Die Expression der Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie ist im Rückenmark unläsierten CHST-14^{-/-} Mäuse im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert, was darauf hinweist, dass im unläsierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} Mäuse keine Kompensation durch ein anderes Mitglied der HNK-1-Sulfotransferase-Familie stattfindet.

Während für alle analysierten Sulfotransferasen ein Positionseffekt gemessen werden konnte, konnte im läsierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} Mäuse, im Vergleich zum läsierten Wildtyp, nur für CHST-12 ein signifikanter genotypischer Unterschied festgestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp war die Expression eine Woche nach der Läsion in allen drei untersuchten Regionen hochreguliert, sechs Wochen nach der Läsion konnte an der Läsionsstelle und rostral der Läsionsstelle eine Hochregulation gemessen werden. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass der Verlust der CHST-14 im Rückenmark nach Läsionen durch die CHST-12 kompensiert wird. Mikami et al., (2003) konnten zeigen, dass bei der Substratspezifität für CHST-14 eine deutliche Präferenz für Dermatan festzustellen ist, während CHST-12 Dermatan und Chondroitin gleichermaßen sulfatiert (vgl. S. 9, Abb. 1.2) Daher könnte CHST-12 tatsächlich den Verlust der CHST-14 kompensieren. Dieser Kompensationseffekt würde auch die schlechtere funktionelle Regeneration der CHST-14^{-/-} Mäuse nach Rückenmarksläsion erklären.

Verhaltensanalyse der CHST-14^{-/-} Mäuse

Explorations- und Angstverhalten

Das Explorations- und Angstverhalten der Mäuse wurde im *open field*, im *elevated plus maze* und im „neues Objekt“ Test bestimmt.

Die Konfrontation der Maus mit einer neuen Umgebung führt zu einer Konfliktsituation, in der unterschiedliche Motivationen -je nach Testbedingungen verschieden stark- auf das Verhalten des Tieres einwirken. Die unbekannte Umgebung wird sowohl den Explorationstrieb, als auch einen Angsttrieb auslösen (Montgomery, 1955), was zu einem Konfliktverhalten führt, das aus Annäherungs- und Vermeidungskomponenten besteht.

Im *open field* zeigten CHST-14^{-/-} Tiere, im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern, ein normales Explorations- und Angstverhalten. Das Explorationsverhalten wurde hierbei über die Lokomotion bestimmt, wobei jedoch auch eine gewisse Angstkomponente mitberücksichtigt werden musste, die dem Explorationsdrang entgegenwirkt. Es wurde jedoch versucht, den Angsteinfluss im *open field* so gering wie möglich zu halten, so dass die Lokomotion fast ausschließlich auf den Explorationsdrang zurückzuführen war. Sowohl die zurückgelegte Strecke in der Gesamtarena, als auch die durchschnittliche Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere am Rand und im Zentrum der Arena fortbewegten ließ keine Unterschiede erkennen. Angst-korrelierte Parameter wie Thigmotaxis (in diesem Versuch der Kontakt zur Wand) und das Betreten der Mitte der Arena zeigten keine Unterschiede zwischen CHST-14^{-/-} Tieren und den Wildtypen.

Im *elevated plus maze* konnten die Beobachtungen bezüglich des Angstverhaltens teilweise bestätigt werden. Diesem Versuch liegt die Tatsache zu Grunde, dass Mäuse freie Flächen und erhöhte Orte meiden. Als Bewertungskriterien für das Angstverhalten wurde zum einen die Lokomotion, als auch die Eintritte und die Aufenthaltsdauer auf den offenen und geschlossenen Armen bewertet. Beide Genotypen verbrachten etwa gleich viel Zeit auf dem offenen, bzw. geschlossenen Arm, jedoch zeigten die CHST-14^{-/-} Mäuse geringere Lokomotion, wenn man die Anzahl der Gesamteintritte in die offenen und geschlossenen Arme betrachtet. Zusätzlich war zu beobachten, dass die CHST-14^{-/-} Tiere weniger Zeit in der Mitte des plusförmigen Labyrinthes verbrachten. In diesem Bereich findet das *risk assessment* statt, d.h., die Tiere bewerten anhand von *stretched attend postures* (SAP) und *head dippings* ihre Umgebung und das damit einhergehende Risiko. CHST-14^{-/-} Mäuse brauchten im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistern etwa doppelt so lange, bis sie den ersten ungeschützten *head dip* wagten, während bei der Dauer bis zum ersten geschützten *head dip* kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen war. Die

V. Diskussion

verringerte Lokomotion, in Kombination mit dem verringerten *risk assessment*, könnte auf ein vermindertes Neugierverhalten und verminderte Neugier-induzierte Exploration der CHST-14^{-/-} Tiere hinweisen.

Im „neues Objekt“ Test war kein signifikanter Unterschied im Explorations- und Angstverhalten der Mäuse festzustellen. Hierbei wurde bewertet, wieviel Zeit die Tiere auf der Seite oder gegenüber des neuen, unbekanntes Objektes verbrachten und wie lange es dauerte, bis sie mit dem Objekt das erste Mal in Kontakt kamen. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz dahingehend, dass die CHST-14^{-/-} Mäuse länger brauchten, bis sie das erste Mal am neuen Objekt schnüffelten und sie verbrachten tendenziell auch weniger Zeit auf der Seite des Objektes. Dies würde das schon im *elevated plus maze* beobachtete verminderte Neugierverhalten und die verminderte Neugier-induzierte Exploration bestätigen.

Es ist allerdings anzumerken, dass diese drei Tests nicht den gleichen Neuigkeitswert und das gleiche Maß an Umwelteinflüssen beinhalteten. Während der „neues Objekt“ Test im Heimkäfig und im Dunkeln durchgeführt wurde und so den geringsten Neuigkeitswert zeigte, war im *open field* Test, bei dem die Tiere aus dem Heimkäfig in eine neue Arena gesetzt wurden und der außerdem im Hellen stattfand, der größte Neuigkeitswert gegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Explorations- und Angstverhalten der CHST-14^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistern keine Auffälligkeiten zeigte, jedoch war ein verringertes Neugierverhalten und eine verminderte Neugier-induzierte Exploration der CHST-14^{-/-} Tiere festzustellen.

Motorkoordination

Die Motorkoordination der Mäuse wurde im *Pole* Test und im *Rotarod* Test bestimmt. Hierbei ist zu bemerken, dass der *Pole* Test, bei dem sich die Mäuse auf einem senkrechten Stab um 180° drehen und ihn dann kopfüber herunter klettern mussten, der motorisch anspruchsvollere Test war.

Die CHST-14^{-/-} Tiere waren kaum in der Lage, die Aufgabe im *Pole* Test zu erfüllen. Während bei den Wildtypen schon im ersten der drei Durchgänge, fast die Hälfte der Tiere in der Lage war sich zu drehen und den Stab herunter zu klettern, war dies bei den CHST-14^{-/-} Mäusen nicht einmal im dritten Durchlauf der Fall. Sie waren kaum in der Lage sich koordiniert zu drehen und rutschten vielmehr seitlich oder rückwärts den Stab herunter, oder sie fielen einfach nur vom Stab.

V. Diskussion

Im *Rotarod* Test hingegen zeigten die CHST-14^{-/-} Tiere eine bessere Leistung als ihre wildtypischen Geschwister. Während sich die Wildtypen im ersten und zweiten Versuch nur etwa 150-180 Sekunden auf dem Rotor halten konnten, kamen die CHST-14^{-/-} Mäuse in den ersten beiden Versuchen auf ca. 240 Sekunden. Jedoch ist bei den CHST-14^{-/-} Tieren, im Gegensatz zu den Wildtypen, keine Leistungssteigerung zu erkennen. Während sich die Wildtypen von etwa 140 Sekunden im ersten Versuch, auf ca. 270 Sekunden im vierten Durchlauf steigerten, ist bei den CHST-14^{-/-}-Tieren mit ca. 280 Sekunden in allen vier Durchläufen, kaum eine Steigerung der Leistung zu erkennen.

Die im *Pole* Test beobachtete Beeinträchtigung der Motoroordination könnte in der physiologischen Konstitution der CHST-14^{-/-} Mäuse begründet sein. Wie beschrieben, sind die CHST-14^{-/-} Tiere deutlich kleiner und leichter als ihre wildtypischen Geschwister und ihre schlechte Leistung im *Pole* Test könnte auch eine geringere Kraft dieser Tiere als Ursache haben. Die geringere Kraft würde für den *Rotarod* Test keine so entscheidende Rolle spielen, außerdem stellt sich die Frage, ob das geringe Gewicht der CHST-14^{-/-}-Tiere in diesem Versuch vielleicht ein Vorteil ist.

NG2, Biglycan und Decorin sind Chondroitinsulfat-Proteoglykane, die in der Skelettmuskulatur exprimiert sind (Bianco et al., 1990). Die Ullrich's-Krankheit (*Ullrich's disease*) zeichnet sich neben Auszehrungserscheinungen und gesteigerter Flexibilität der Gelenke auch durch Muskelschwäche aus. Die Hauptursache dieses Krankheitsbilds ist eine Deletion im Kollagen-VI-Gen (Camacho Vanegas et al., 2001; Demir et al., 2002; Higuchi et al., 2001), es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass NG2 in der Membran der Skelettmuskeln dieser Patienten reduziert ist (Higashi et al., 2006). Decorin wird während der Differenzierung der Skelettmuskeln exprimiert, Biglycan Expression findet man in Myotuben während der fötalen Muskelformation und im adulten Muskel im Endomysium und in der neuromuskulären Endplatte (Bianco et. al.,1990; Bowe et. al., 2000). Bei der Muskeldystrophie Typ Duchenne konnte ein Anstieg dieser Chondroitinsulfat-Proteoglykane im Skelettmuskel festgestellt werden (Fadic et. al., 2006). Besonders interessant ist hierbei die Rolle von Decorin als protektives Molekül, das die Muskelfasern umgibt. Die im Pole Test vermutete fehlende Kraft, könnte also auch durch eine Muskelschwäche bedingt sein, die wiederum auf fehlende oder veränderte Sulfatierung der Chondroitinsulfat-Proteoglykane NG2 und/oder Decorin zurückzuführen sein könnte. Jedoch ist festzuhalten, dass die Tiere ansonsten keine Auffälligkeiten in Bezug auf Kraft oder Probleme, die auf die Muskulatur zurückzuführen sein könnten, zeigten.

V. Diskussion

Sozialverhalten

Es wurde zum Einen die Aggressivität der Mäuse gegenüber anderen Männchen im *resident-intruder* Test untersucht und zum Anderen das Verhalten Weibchen gegenüber im Urin-Markierungs Test.

Mit dem *resident-intruder* Test wurde das Revierverhalten der Männchen untersucht, indem sie mit einem fremden Männchen in ihrem Heimkäfig konfrontiert wurden. Es wäre zu erwarten, dass der Heimkäfig gegenüber Eindringlingen verteidigt wird. Anhand der Dauer bis zum ersten Angriff und durch die Beobachtung, ob der Angriff von *resident* oder *intruder* ausging, konnte auf die Aggressivität der Tiere geschlossen werden. Es konnte jedoch keine wirklich Aussage über das Aggressivitätsverhalten der Tiere getroffen werden, da keine Angriffe stattfanden, weder von den *residents*, noch von den *intrudern*.

Im Urin-Markierungs Test wurde anhand der Urin-Markierungen, die die Männchen in Gegenwart von Weibchen setzten und anhand der Aufenthaltsdauer bei den Weibchen, das Revierverhalten untersucht. Urin-Markierungen spielen im Sozialverhalten der Mäuse eine wichtige Rolle (Hurst et. al 1987). Sie markieren ihr Territorium, informieren Weibchen über die Anwesenheit eines paarungsbereiten Männchens und es dient der Taxierung von Dominanz, wobei dominante Männchen stärker markieren als unterlegene Männchen. CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten, im Vergleich zum Wildtyp, ein deutlich reduziertes Revierverhalten. Sie zeigten nicht nur eine geringere Lokomotion, sie verbrachten auch weniger Zeit bei den Weibchen und setzten weniger Urin-Markierungen. Dies könnte an einem generell geringeren Interesse der CHST-14^{-/-} Tiere gegenüber Weibchen liegen oder an olfaktorischen Beeinträchtigungen, wodurch sie die Weibchen nicht so gut erkennen könnten. Dem widersprechen jedoch die Beobachtungen aus dem *one trial spatial learning* Test, in dem die CHST-14^{-/-} Mäuse genauso viel oder sogar mehr Zeit bei den Weibchen verbrachten, wie die Wildtypen. Vielmehr könnte das Verhalten die Beobachtungen aus den Explorations- und Angstverhaltens-Test bestätigen und auf ein reduziertes Neugierverhalten und eine verminderte Neugier-induzierte Exploration schließen lassen.

Lernen und Gedächtnis

Veränderungen im Lernen und Gedächtnis der CHST-14^{-/-} Mäuse wurde mit drei verschiedenen Versuchsansätzen analysiert. Das Arbeitsgedächtnis wurde anhand der spontanen Alternation im Y-Labyrinth bewertet, das Langzeitgedächtnis im *one trial spatial learning* Test, außerdem wurde ein *fear conditioning and extinction* Versuch durchgeführt.

V. Diskussion

Das Arbeitsgedächtnis ist für kurzfristige Speicherung von Informationen zuständig und hilft Informationen gleichzeitig festzuhalten und in Beziehung zu setzen. Im Y-Labyrinth wird das Arbeitsgedächtnis anhand der Fähigkeit der Mäuse zur Alternation bewertet. Die Maus kann sich, wenn sie aus einem der drei Arme kommt, jedes Mal neu entscheiden, welchen Arm sie als nächstes erkunden möchte. Auf der Grundlage, dass Mäuse dazu tendieren, Neues erkunden zu wollen, sollte eine Alternation auftreten, wenn sie in der Lage, sind sich daran zu erinnern, welchen Arm sie als letztes aufgesucht hatten. Die CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp keinen Unterschied in der Häufigkeit der Alternation, was auf ein intaktes Arbeitsgedächtnis schließen ließ.

Im *one trial spatial learning* Test sollten sich die Mäuse in einem Lern-Versuch die Position der Weibchen in einer in zwei Räume unterteilten Arena merken und sich am Folgetag, im Recall-Versuch ohne Weibchen, an die Position der Weibchen des Lern-Versuchs erinnern und die Ecke aufsuchen, in der die Weibchen platziert waren. Die Präferenz für die Ecke der Weibchen war im Lern-Versuch für beide Genotypen deutlich ausgeprägt. Im Recall zeigten die CHST-14^{-/-} Mäuse im Vergleich zum Wildtyp jedoch ein tendenziell besseres Langzeitgedächtnis und hielten sich länger in der Zielzone der Weibchen auf, während bei den Wildtypen keine Präferenz für diese Zone zu erkennen war. Dies zeigt, dass die CHST-14^{-/-} Tiere nicht nur in der Lage waren zwischen den beiden Räumen zu unterscheiden, sondern sich auch die richtige Ecke zu merken, in der die Weibchen im Lern-Versuch platziert waren. Es muss jedoch festgehalten werden, dass die Wildtypen in diesem Versuch deutlich schlechter abschnitten, als erwartet. Aus anderen Studien ist bekannt, dass die C57BL/6J Wildtypen normalerweise deutlich besser in der Lage sind, sich an die Position der Weibchen zu erinnern (Fellini et. al., 2008). Eine mögliche Erklärung für dieses unerwartete Verhalten der Wildtypen könnte der gemischte genetische Hintergrund sein, da die Tiere erst zweimal auf C57B/L6J Hintergrund rückgekreuzt wurden. Weitere Rückkreuzungen auf C57BL/6J Hintergrund würden wahrscheinlich zum erwarteten Verhalten der Wildtypen im *one trial spatial learning* Test führen. Ob sich dadurch der in diesem Versuch festgestellte Unterschied zwischen den Genotypen bestätigt ist wahrscheinlich, da beide Genotypen in diesem Experiment den gleichen „unreinen“ genetischen Hintergrund besaßen.

Im *fear conditioning and extinction* Test wurden *long* und *short term extinction* der Tiere untersucht. Das *freezing*-Verhalten der Mäuse ist eine gängige und leicht messbare Reaktion, die als Hinweis für *fear conditioning* verwendet wird (Blanchard und Blanchard 1988; Graef 1996). *Freezing* wird hierbei, abgesehen von atmungsbedingten Bewegungen, durch das Fehlen jeglicher Bewegung definiert (Fanselow, 1990; Paylor et al., 1994). Die Wildtypen und die CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten im Konditionierungsversuch das gleiche

V. Diskussion

Verhalten und reagierten auf den Stromschlag mit erhöhtem *freezing*-Verhalten. Am zweiten Tag waren beide Genotypen in der Lage sich an den Stromschlag zu erinnern, was sich in einem deutlich erhöhten *freezing*-Verhalten während der ersten fünf Minuten des Versuchs äußerte und auf normale *short term extinction* schließen lässt. Im Laufe der Zeit wurde das *freezing* jedoch deutlich weniger und die Tiere lernten, dass die Kammer keine Gefahr mehr darstellt. Als die Tiere am dritten Tag erneut in die Kammer gesetzt wurden, zeigten sowohl CHST-14^{-/-} Mäuse als auch die Wildtypen eine Beeinträchtigung der *long term extinction*. Das *freezing*-Verhalten war in den fünf Minuten des Versuchs genauso stark ausgeprägt, wie in den ersten fünf Minuten des zweiten Tages. Diese Beobachtung war für die Wildtypen überraschend, denn auch hier ist aus anderen Studien bekannt, dass C57BL/6J Mäuse in der ersten fünf Minuten des Versuches am dritten Tag, ein geringeres *freezing*-Verhalten zeigen als in den ersten fünf Minuten des Versuches am zweiten Tag. Auch hier könnte wieder der genetische Hintergrund der Tiere verantwortlich sein, der im *one trial spatial learning* Test beschrieben wurde.

Stress

Durch das Aufhängen der Maus am Schwanz, ohne dass diese die Möglichkeit hat, sich aus dieser Situation zu befreien, wird ein Verhalten analysiert, das als *depression* oder *learned helplessness* bezeichnet wird. Der *tail suspension* Test basiert auf der Tatsache, dass Tiere, die vorübergehendem, unentrinnbarem Stress ausgesetzt sind (in diesem Versuchsaufbau indem sie am Schwanz aufgehängt wurden) Immobilitäts-Verhalten entwickeln. CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten im *tail suspension* Test im Vergleich zu den Wildtypen, eine verstärkte Stressantwort, d.h. sie waren in den ersten vier Minuten des sechsminütigen Versuchs deutlich weniger bewegungslos als die Wildtypen.

Die Einflüsse der CSPGs auf das Verhalten wurden bisher noch nicht genauer untersucht. Zwar wurden Knockout-Mäuse für die CSPGs Decorin, Biglycan (Goldberg et. al., 2005), Brevican (Brakebusch et. al., 2001), Neurocan (Zhou et. al., 2001) und TN-R (Weber et. al., 1999) veröffentlicht, aber nur für Brevican und TN-R wurde der mögliche Einfluss der Proteine auf das Verhalten untersucht. Brevican^{-/-} Mäuse wurden in Bezug auf Lernen und Gedächtnis untersucht, es konnten jedoch keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Brakebusch et. al., 2001). TN-R^{-/-} Mäuse zeigten deutliche motorische Defizite im Pole Test und im Rotarod Test (Freitag et. al., 2003). Im Pole Test waren die TN-R^{-/-} Mäuse, ebenso wie die CHST-14^{-/-} Tiere, im ersten Versuch kaum in der Lage sich am Stab um 180° zu drehen, im Gegensatz zu CHST-14^{-/-} Mäusen zeigten die TN-R^{-/-} Tiere im Laufe der drei Durchgänge jedoch eine Steigerung ihrer Leistung. TN-R^{-/-} Mäuse zeigten

V. Diskussion

im *elevated plus maze* außerdem ein verringertes Explorationsverhalten und geringeres *risk assessment*. Dieses Verhalten, das auf ein reduziertes Neugierverhalten und/oder auf eine verminderte Neugier-induzierte Exploration hinweisen könnte, wurde auch bei den CHST-14^{-/-} Tiere gefunden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust der CHST-14 in Mäusen, nach Läsionen des Rückenmarks zu einer schlechteren funktionellen Regeneration führt. Dies ist wahrscheinlich auf eine Kompensation durch die CHST-12 zu erklären, die im läsierten Rückenmark der CHST-14^{-/-} Tiere verstärkt exprimiert wird. Des Weiteren scheint CHST-14 einen Einfluss auf das Verhalten der Mäuse zu haben. CHST-14^{-/-} Mäuse zeigten ein verringertes Neugier-induziertes Explorationsverhalten, eine verstärkte Stressantwort und Auffälligkeiten bei der Motorkoordination.

Weiteres Rückkreuzen der M5-CB2-KO/F Linie ist nötig, um die Verhaltensdaten der Mäuse zu bestätigen. Des Weiteren können Untersuchungen des Expressionsmusters und der Sulfatierung der unterschiedlichen Chondroitinsulfat-Proteoglykane in den CHST-14^{-/-} Mäusen, weitere Einblicke in die Rolle und Bedeutung der Sulfatierung durch die CHST-14, in Bezug auf die funktionelle Regeneration, ermöglichen.

VI. Zusammenfassung

Chondroitinsulfat-Proteoglykane sind ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und spielen unter anderem eine bedeutende Rolle bei Axonwachstum, Zell-Migration und Plastizität des Nervensystems. Die unterschiedlichen Glykosaminoglykan-Seitenketten, die diese Proteoglykane dekorieren, können durch Sulfatierung modifiziert werden. Die 4-O-Sulfatierung dieser Zucker-Seitenketten wird unter anderem durch die Mitglieder der HNK-1-Sulfotransferase-Familie katalysiert. Es sind bislang sieben Mitglieder dieser Familie bekannt, namentlich HNK-1-Sulfotransferase, CHST-8, CHST-9, CHST-11, CHST-12, CHST-13 und CHST-14, die spezifisch unterschiedliche Kohlenhydrat-Epitope sulfatieren.

Ein Projekt dieser Arbeit bestand in der Analyse der kürzlich generierten CHST-14 Knockout-Maus (CHST-14^{-/-} Maus). Die CHST-14^{-/-} Mäuse waren im Vergleich zum Wildtyp kleiner, leichter und wurden mit geringerer Mendelscher Häufigkeit geboren. Neugeborene CHST-14^{-/-} Tiere besaßen einen deformierten Schwanz, der auch bei adulten Tieren, die zweimal auf C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt wurden, zu beobachten war. Eine weitere Auffälligkeit der CHST-14^{-/-} Mäuse war die Ausbildung von Elefantenzähnen, die bei einigen Tieren unterschiedlich stark ausgeprägt waren.

Chondroitinsulfat-Proteoglykane spielen nach Verletzungen des ZNS eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung der Regenerationsprozesse. An der Läsionsstelle kommt es zur Bildung einer Glianarbe, die reich an Chondroitinsulfat-Proteoglykanen ist und das Haupthindernis bei der Axonregeneration darstellt. Die Tatsache, dass die Applikation von Chondroitinase ABC nach Verletzungen des ZNS zu einer Verbesserung der funktionellen Regeneration führt (Moon et al., 2001; Bradbury et al., 2002, Caggiano et al., 2005), deutet darauf hin, dass der negative Einfluss nicht nur vom Kernprotein, sondern auch von den GAG-Ketten vermittelt wird.

Es wurden Rückenmarksläsionen durchgeführt und die funktionelle Regeneration der CHST-14^{-/-} Tiere im Vergleich zu wildtypischen Geschwistern analysiert. Überraschenderweise regenerierten die CHST-14^{-/-} Mäuse schlechter als die Wildtypen. Die schlechtere Regeneration war nicht auf den Durchmesser des Rückenmarks zurückzuführen, auch wenn die CHST-14^{-/-} Tiere deutlich kleiner waren als die Wildtypen. Morphologische Untersuchungen zeigten, dass sich der Durchmesser des Rückenmarks der beiden Genotypen nicht unterscheidet und es auch bei der Größe der grauen und weißen Substanz

VI. Zusammenfassung

in transversalen Rückenmarksschnitten keinen Unterschied gibt. Die monoaminerge Re-Innervierung des Rückenmarks nach der Läsion, zeigte ebenfalls keine Unterschiede. Die Regenerationsfähigkeit nach Chondroitinase-Behandlung konnte nicht untersucht werden, da die CHST-14^{-/-} Mäuse die Behandlung nicht überlebten.

Die differentielle Genexpression der einzelnen Mitglieder dieser Familie im Rückenmark nach Läsion wurde mittels qRT-PCR untersucht. CHST-12 zeigte als einziges Mitglied einen genotypischen Unterschied in der Expression an der Läsionsstelle, sowie rostral und caudal der Läsionsstelle und war im Knockout, im Vergleich zum Wildtyp, hochreguliert. Dies deutet auf die Kompensation des Verlusts der CHST-14 durch die CHST-12 hin, was auch die schlechtere Regeneration der CHST-14^{-/-} Mäuse nach Rückenmarksläsion erklären könnte.

Zusätzlich wurden die CHST-14^{-/-} Tiere verhaltensbiologisch untersucht. Es konnten keine Unterschiede im Explorations- und Angstverhalten zwischen den Genotypen festgestellt werden, jedoch war ein verringertes Neugierverhalten und eine verminderte Neugier-induzierte Exploration der CHST-14^{-/-} Tiere zu erkennen. Die Motorkoordination der Knockouts war im *Pole* Test stark beeinträchtigt, während sie im *Rotarod* Test eine deutlich bessere Leistung als die Wildtypen zeigten. Im Urin-Markierungs Test setzten die Knockouts weniger Markierungen und zeigten eine verringerte Lokomotion und im *one trial spatial learning* Test wurde ein tendenziell besseres Langzeitgedächtnis der CHST-14^{-/-} Tiere beobachtet. Da die Wildtypen in diesem Versuch jedoch eine deutlich schlechtere Leistung zeigten, als in vorherigen Versuchen und die analysierten Tiere nur zweimal auf C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt wurden, müssen diese Beobachtungen durch zusätzliche Versuche nach weiteren Rückkreuzungen bestätigt werden. Des Weiteren war bei den Knockouts eine verstärkte Stressantwort im *tail suspension* Test zu beobachten.

Ein zweites Projekt bestand in der Konstruktion der Zielvektoren zur Herstellung einer konditionalen CHST-12 defizienten Maus und einer konstitutiven TN-N Knockout-Maus.

Auf Basis der homologen Rekombination wurde ein Zielvektor konstruiert, bei dem in das Exon 2 des CHST-12-Gens eine loxP-Erkennungssequenz und in die genomische Region 3' von Exon 2 eine FRT/loxP-flankierte Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette integriert wurde. Dieser Zielvektor kann nun zur Manipulation der ES-Zellen eingesetzt werden.

Zur Herstellung des konstitutiven TN-N Knockouts wurden die Exone 1-4 durch eine Neomycin/Kanamycin-Selektionskassette ersetzt. Der Vektor wurde zur Transfektion mausembryonaler Stammzellen (ES-Zellen) verwendet und nach G418-Selektion wurden die homologe Integration des Zielvektors in den TN-N-Lokus der resistenten ES-Zellen untersucht. Es wurden 288 Klone über PCR und Southern-Blots analysiert, doch es konnte für keinen der Klone eine erfolgreiche Rekombination nachgewiesen werden.

VII. Literaturverzeichnis

Abo, T., and Balch, C. M. (1981). A different antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.* 127: 1024–1029.

Abremski, K., R. Hoess, and N. Sternberg. (1983). Studies on the properties of P1 sitespecific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32:1301-1311.

Apostolova I, Irintchev A, Schachner M. (2006). Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J Neurosci.* 2006 Jul 26;26(30):7849-59.

Ameye L, Young MF. (2002). Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology.* 2002 Sep;12(9):107R-16R. Review.

Argos, P., A. Landy, K. Abremski, J. B. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R. H. Hoess, M. L. Kahn, B. Kalionis, S. V. Narayana, and L. S. Pierson. (1986). The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* 5:433-440.

Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Shearer, M.C., Adcock, K.H., Pesheva, P., Fawcett, J.W., (2002). Versican is upregulated in CNS injury and is a product of oligodendrocyte lineage cells. *J. Neurosci.* 22, 2225–2236.

Asher, R.A., Morgenstern, D.A., Fidler, P.S., Adcock, K.H., Oohira, A., Braistead, J.E., Levine, J.M., Margolis, R.U., Rogers, J.H., Fawcett, J.W., (2000). Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *J. Neurosci.* 20, 2427–2438.

Aspberg, A., S. Adam, G. Kostka, R. Timpl, and D. Heinegard. (1999). Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J. Biol. Chem.* 274:20444–20449.

Aspberg, A., R. Miura, S. Bourdoulous, M. Shimonaka, D. Heinegard, M. Schachner, E. Ruoslahti, and Y. Yamaguchi. (1997). The C-type lectin domains of lecticans, a family of aggregating chondroitin sulfate proteoglycans, bind tenascin-R by protein-protein interactions independent of carbohydrate moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10116–10121.

Aspberg A, Binkert C, Ruoslahti E (1995). The versican C-type lectin domain recognizes the adhesion protein tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10590–10594.

VII. Literaturverzeichnis

- Baenziger JU, Green ED. (1988).** Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta.* 1988 Jun 9;947(2):287-306.
- Bakker H, Friedmann I, Oka S, Kawasaki T, Nifant'ev N, Schachner M, Mantei N. (1997).** Expression cloning of a cDNA encoding a sulfotransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *J Biol Chem.* 1997 Nov 21;272(47):29942-6.
- Bandtlow CE, Zimmermann DR (2000).** Proteoglycans in the developing brain—new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80:1267–1290.
- Bartsch, U. (1996).** The extracellular matrix molecule tenascin-C: expression in vivo and functional characterization in vitro. *Prog. Neurobiol.* 49:145-168.
- Bartsch, U., Pesheva, P., Raff, M., and Schachner, M. (1993).** Expression of janusin (J1-160/180) in the retina and optic nerve of the developing and adult mice. *Glia* 9: 57–69.
- Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L, Huntley GW. (2000).** Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.* 2000 Nov;10(11):473-82.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. (1990).** Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990 Nov;38(11):1549-63.
- Biglami, A., R. Asher, and G. Perides (1992).** Co-localization of hyaluronic acid and chondroitin sulfate proteoglycan in rat cerebral cortex. *Brain Res.* 1992 May 1;579(1):173-7.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. (1988).** Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol.* 1988;39:43-68. Review.
- Bourdon, M.A., C.J. Wikstrand, H. Furthmayr, T.J. Matthews, and D.D. Bigner (1983).** Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer Res.* 43(6): 2796{2805.
- Bovolenta P, Feraud-Espinosa I. (2000).** Nervous system proteoglycans as modulators of neurite outgrowth. *Prog Neurobiol.* 2000 Jun;61(2):113-32.
- Bowman KG, Bertozzi CR. (1999).** Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication. *Chem Biol.* 1999 Jan;6(1):R9-R22.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, King VR, Bennett GS, Patel PN, Fawcett JW, McMahon SB (2002).** Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416:636–640.
- Brakebusch C, Seidenbecher CI, Asztely F, Rauch U, Matthies H, Meyer H, Krug M, et al. (2002).** Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 longterm potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Mol Cell Biol* 22:7417–7427.

VII. Literaturverzeichnis

- Bristow, J., M. K. Tee, S. E. Gitelman, S. H. Mellon, and W. L. Miller. (1993).** Tenascin-X: a novel extracellular matrix protein encoded by the human XB gene overlapping P450c21B. *J. Cell Biol.* 122:265-278.
- Brodkey, J. A.; Laywell, E. D.; O'Brien, T. F.; Faissner, A.; Stefansson, K.; Dorries, H. U.; Schachner, M.; Steindler, D. A. (1995).** Focal brain injury and up-regulation of a developmentally-regulated extracellularmatrix protein. *J. Neurosurg.* 82:106 –112; 1995.
- Brückner G, Grosche J, Schmidt S, Härtig W, Margolis RU, Delpech B, Seidenbecher CI, Czaniera R, Schachner M. (2000).** Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J Comp Neurol.* 2000 Dec 25;428(4):616-29.
- Brückner G, Härtig W, Kacza J, Seeger J, Welt K, Brauer K. (1996).** Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J Neurocytol.* 1996 May;25(5):333-46.
- Brückner G, Brauer K, Härtig W, Wolff JR, Rickmann MJ, Derouiche A, Delpech B, Girard N, Oertel WH, Reichenbach A. (1993).** Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia.* 1993 Jul;8(3):183-200.
- Burg MA, Nishiyama A, and Stallcup WB. (1997).** A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Exp Cell Res* 235: 254–264, 1997.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostenfeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., Sofroniew, M.V., (1999).** Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297–308.
- Cafferty, W.B.J., Yang, S.H., Duffy, P.J., Li, S., Strittmatter, S.M., (2007).** Functional axonal regeneration through astrocytic scar genetically modified to digest chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci.* 27, 2176–2185.
- Caggiano, A.O., Zimmer, M.P., Ganguly, A., Blight, A.R., Gruskin, E.A., (2005).** Chondroitinase ABCI improves locomotion and bladder function following contusion injury of the rat spinal cord. *J. Neurotrauma* 22, 226–239.
- Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, Sabatelli P, Giusti B, Chu ML, Pepe G. (2001).** Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7516-21. Epub 2001 May 29.
- Camand E, Morel MP, Faissner A, Sotelo C, Dusart I. (2004).** Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *Eur J Neurosci.* 2004 Sep;20(5):1161-76.

VII. Literaturverzeichnis

- Capecchi MR. (1989).** The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 1989 Mar;5(3):70-6.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. (2003).** Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 2003 Jul;200(4):488-99.
- Chiquet, M. (1999).** Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.* 18(5): 417-426.
- Chiquet-Ehrismann, R., C. Hagios, and K. Matsumoto (1994).** The tenascin gene family. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2(1): 3-7.
- Chiquet, M. and D. M. Fambrough. (1984a).** Chick myotendinous antigen. II. A novel extracellular glycoprotein complex consisting of large disulfide-linked subunits. *J. Cell Biol.* 98:1937-1946.
- Chiquet, M. and D.M. Fambrough (1984b).** Chick myotendinous antigen. I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. *J. Cell Biol.* 98(6): 1926-1936.
- Cifuentes-Diaz, C., E. Velasco, F.A. Meunier, D. Goudou, L. Belkadi, L. Faille, M. Murawsky, D. Angaut-Petit, J. Molgo, M. Schachner, Y. Saga, S. Aizawa, and F. Rieger (1998).** The peripheral nerve and the neuromuscular junction are affected in the tenascin-C-deficient mouse. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44(2): 357-379.
- Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF. (2002).** Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res.* 2002 Jul;17(7):1180-9.
- Corvetti, L., Rossi, F., (2005).** Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact Purkinje axons in the cerebellum of the adult rat. *J. Neurosci.* 25, 7150–7158.
- Crespo, D., Asher R.A., Lin, r., Rhodes, K.E., Fawcett, J.W., (2007).** How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Experimental Neurology* 206 (2007) 159–171.
- Crossin, K.L., S. Hoffman, M. Grumet, J.P. Thiery, and G.M. Edelman (1986).** Site-restricted expression of cytotactin during development of the chicken embryo. *J. Cell Biol.* 102(5): 1917-1930.
- Csordas G, Santra M, Reed CC, Eichstetter I, McQuillan DJ, Gross D, Nugent MA, Hajnoczky G, Iozzo RV (2000).** Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J Biol Chem* 275:32879–32887.
- Curtis R, Green D, Lindsay RM, Wilkin GP. (1993).** Up-regulation of GAP-43 and growth of axons in rat spinal cord after compression injury. *J Neurocytol.* 1993 Jan;22(1):51-64

VII. Literaturverzeichnis

- Davies SJA, Goucher DR, Doller C, Silver J (1999).** Robust regeneration of adult sensory axons in degenerating white matter of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19:5810–5822.
- Davies SJA, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997).** Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature* 390:680–683.
- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R. (2000).** NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res.* 2000 Sep 1;61(5):471-9. Click here to read Links
- Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. (2001).** Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature.* 2001 Feb 8;409(6821):733-9.
- Demir E, Sabatelli P, Allamand V, Ferreira A, Moghadaszadeh B, Makrelouf M, Topaloglu H, Echenne B, Merlini L, Guicheney P. (2002).** Mutations in COL6A3 cause severe and mild phenotypes of Ullrich congenital muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2002 Jun;70(6):1446-58. Epub 2002 Apr 24.
- Dityatev, A. & Schachner, M. (2003).** Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4, 456–468.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O. (1987).** Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature.* 1987 Dec 10-16;330(6148):576-8.
- Doherty P, Walsh FS. (1996).** CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth *Mol Cell Neurosci.* 1996 Aug;8(2/3):99-111.
- Doolittle, R. F. (1984).** Fibrinogen and fibrin. *Annu. Rev. Biochem.* 53:195-229.
- Dou C-L, Levine JM (1994).** Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J Neurosci* 14:7616–7628.
- Dours-Zimmermann MT, Zimmermann DR (1994).** A novel glycosaminoglycan attachment domain identiWed in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem* 269:32992–32998.
- Eleftheriou F, Exposito JY, Garrone R, Lethias C. (1997).** Characterization of the bovine tenascin-X. *J Biol Chem.* 1997 Sep 5;272(36):22866-74.
- Emerling, D.E., Lander, A.D., (1996).** Inhibitors and promoters of thalamic neuron adhesion and outgrowth in embryonic neocortex: functional association with chondroitin sulfate. *Neuron* 17, 1089–1100.
- Erickson, H. P. and J. L. Inglesias. (1984).** A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. *Nature* 311:267-269.
- Evans MJ, Kaufman MH. (1981).** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

VII. Literaturverzeichnis

- Faissner, A. and D. Steindler. (1995).** Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. *Glia* 13:233-254.
- Fanselow MS, Kim JJ, Young SL, Calcagnetti DJ, DeCola JP, Helmstetter FJ, Landeira-Fernandez J. (1991).** Differential effects of selective opioid peptide antagonists on the acquisition of pavlovian fear conditioning. *Peptides*. 1991 Sep-Oct;12(5):1033-7.
- Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., Sofroniew, M.V., (2004).** Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 24, 2143–2155.
- Fawcett JW, Rokos J, Bakst I. (1989).** Oligodendrocytes repel axons and cause axonal growth cone collapse. *J Cell Sci.* 1989 Jan;92 (Pt 1):93-100.
- Fellini L, Schachner M, Morellini F. (2008).** NCAM deficient mice display normal long-term memory in a new hippocampus-dependent one-trial spatial learning task. *FENS Abstr* 4:058.6
- French-Constant, C., Miller, R. H., Kruse, J., Schachner, M., and Raff, M. C. (1986).** Molecular specialization of astrocyte processes at nodes of Ranvier in rat optic nerve. *J. Cell. Biol.* 102: 844–852.
- Fidler PS, Schuette K, Asher RA, Dobbertin A, Thornton SR, Calle-Patino Y, Muir B, Levine JM, Geller HM, Rogers JH, Faissner A, Fawcett JW (1999).** Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci* 19:8778–8788.
- Fields RD, Itoh K. (1996).** Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1996 Nov;19(11):473-80.
- Fiete D, Beranek MC, Baenziger JU. (1997).** The macrophage/endothelial cell mannose receptor cDNA encodes a protein that binds oligosaccharides terminating with SO₄-4-GalNAc β 1,4GlcNAc β or Man at independent sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Oct 14;94(21):11256-61.
- Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenziger JU. (1991).** A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc β 1,4GlcNAc β 1,2Man α that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell.* 1991 Dec 20;67(6):1103-10.
- Fitch MT, Silver J (1997).** Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increases in putative inhibitory molecules. *Exp Neurol* 148:587–603.
- Flück M, Tunc-Civelek V, Chiquet M. (2000).** Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *J Cell Sci.* 2000 Oct;113 (Pt 20):3583-91.
- Forsberg E, Hirsch E, Fröhlich L, Meyer M, Ekblom P, Aszodi A, Werner S, Fässler R. (1996).** Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 25;93(13):6594-9.

VII. Literaturverzeichnis

Fouad K, Pearson K. (2004). Restoring walking after spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2004 Jun;73(2):107-26.

Freitag S, Schachner M, Morellini F (2003). Behavioral alterations in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Behav Brain Res* 145:189–207.

Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 1994 May;125(3):669-80.

Fukamauchi, F., O. Aihara, and M. Kusakabe (1998). Reduced mRNA expression of neuropeptide Y in the limbic system of tenascin gene disrupted mouse brain. *Neuropeptides* 32(3): 265-268.

Fukamauchi, F., N. Mataga, Y. J. Wang, S. Sato, A. Yoshiki, and M. Kusakabe (1997). Tyrosine hydroxylase activity and its mRNA level in dopaminergic neurons of tenascin gene knockout mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231(2): 356-359.

Fukamauchi, F. and M. Kusakabe. (1997). Preprotachykinin A and cholecystokinin mRNAs in tenascin-gene knockout mouse brain. *Neuropeptides* 31:199-201.

Fukamauchi, F., N. Mataga, Y. J. Wang, S. Sato, A. Youshiki, and M. Kusakabe. (1996). Abnormal behavior and neurotransmissions of tenascin gene knockout mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221:151-156.

Fülöp C, Walcz E, Valyon M, Glant TT. (1993). Expression of alternatively spliced epidermal growth factor-like domains in aggrecans of different species. Evidence for a novel module. *J Biol Chem.* 1993 Aug 15;268(23):17377-83.

Fuss, B., U. Pott, P. Fischer, M.E. Schwab, and M. Schachner (1991). Identification of a cDNA clone specific for the oligodendrocyte-derived repulsive extracellular matrix molecule J1-160/180. *J. Neurosci. Res.* 29(3): 299-307.

Galtrey CM, Asher RA, Nothias F, Fawcett JW. (2007). Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair. *Brain.* 2007 Apr;130(Pt 4):926-39. Epub 2007 Jan 25.

Goldberg M, Septier D, Rapoport O, Iozzo RV, Young MF, Ameye LG. (2005). Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, exerts divergent effects on enamel and dentin formation. *Calcif Tissue Int.* 2005 Nov;77(5):297-310. Epub 2005 Nov 5.

Gonzalez, M. L. and J. Silver. (1994). Axon-glia interactions regulate ECM patterning in the postnatal rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 14:6121-6131.

Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G., and Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 129-141.

VII. Literaturverzeichnis

Green ED, Baenziger JU, Boime I. (1985). Cell-free sulfation of human and bovine pituitary hormones. Comparison of the sulfated oligosaccharides of lutropin, follitropin, and thyrotropin. *J Biol Chem.* 1985 Dec 15;260(29):15631-8.

Grumet, M., D. R. Friedlander, and T. Sakurai. (1996). Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3:319–330.

Grumet M, Milev P, Sakurai T, Karthikeyan L, Bourdon M, Margolis RK, Margolis RU. (1994). Interactions with tenascin and differential effects on cell adhesion of neurocan and phosphacan, two major chondroitin sulfate proteoglycans of nervous tissue. *J Biol Chem* 269: 12142–12146, 1994.

Grumet, M., S. Hoffman, K.L. Crossin, and G.M. Edelman (1985). Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82(23): 8075-8079.

Hagios, C., M. Koch, J. Spring, M. Chiquet, and R. Chiquet-Ehrismann. (1996). Tenascin-Y: a protein of novel domain structure is secreted by differentiated fibroblasts of muscle connective tissue. *J. Cell Biol.* 134:1499-1512.

Haines, B. B. and P. H. Brodeur (1998). Accessibility changes across the mouse Igh-V locus during B cell development. *Eur. J. Immunol.* 28:4228-4235.

Hall, H., Carbonetto, S., and Schachner, M. (1997a). L2/HNK-1 carbohydrate- and integrin-dependent neural cell adhesion to laminin-1. *J. Neurochem.* 68: 544–553.

Hall, H., Deutzmann, R., Timpl, R., Vaughan L., Schmitz, B., and Schachner, M. (1997b). HNK-1 carbohydrate-mediated cell adhesion to laminin-1 is different from heparin-mediated and sulfatidemediated cell adhesion. *Eur. J. Biochem.* 246: 233–242.

Hall H, Vorherr T, Schachner M. (1995). Characterization of a 21 amino acid peptide sequence of the laminin G2 domain that is involved in HNK-1 carbohydrate binding and cell adhesion. *Glycobiology.* 1995 Jun;5(4):435-41.

Hamai, A., Hashimoto, N., Mochizuki, H., Kato, F., Makiguchi, Y., Horie, K., Suzuki, S., (1997). Two distinct chondroitin sulfate ABC lyases. An endoeliminase yielding tetrasaccharides and an exoeliminase preferentially acting on oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 272, 9123–9130.

Hanisch, Uwe-Karsten and Kettenmann, Helmut (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience* 10, 1387 - 1394 (2007).

Härtig W, Derouiche A, Welt K, Brauer K, Grosche J, Mäder M, Reichenbach A, Brückner G. (1999). Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res.* 1999 Sep 18;842(1):15-29.

VII. Literaturverzeichnis

Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R. (1996). Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell*. 1996 Jul 12;86(1):35-46.

Higashi K, Higuchi I, Niiyama T, Uchida Y, Shiraishi T, Hashiguchi A, Saito A, Horikiri T, Suehara M, Arimura K, Osame M. (2006). Abnormal expression of proteoglycans in Ullrich's disease with collagen VI deficiency. *Muscle Nerve*. 2006 Jan;33(1):120-6.

Higuchi I, Shiraishi T, Hashiguchi T, Suehara M, Niiyama T, Nakagawa M, Arimura K, Maruyama I, Osame M. (2001). Frameshift mutation in the collagen VI gene causes Ullrich's disease. *Ann Neurol*. 2001 Aug;50(2):261-5.#

Hiraoka N, Nakagawa H, Ong E, Akama TO, Fukuda MN, Fukuda M. (2000). Molecular cloning and expression of two distinct human chondroitin 4-O-sulfotransferases that belong to the HNK-1 sulfotransferase gene family. *J Biol Chem*. 2000 Jun 30;275(26):20188-96.

Hirsch S, Bähr M. (1999). Growth promoting and inhibitory effects of glial cells in the mammalian nervous system. *Adv Exp Med Biol*. 1999;468:199-205.

Hockfield, S., Kalb, R.G., Zaremba, S. & Fryer, H. (1990). Expression of neural proteoglycans correlates with the acquisition of mature neuronal properties in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Symp Quant. Biol.*, 55, 505–514.

Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. (1998). Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol*. 1998 Apr;17(1):1-19.

Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg (1982). P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79(11): 3398{3402.

Hoffmann, K. (2007). Untersuchung der Expression der HNK1-Sulfotransferase Familie in wildtypischen C57Bl/6 Mäusen. Bachelorarbeit Studiengang Molekulare Biologie, vorgelegt von Kathrin Hoffmann, 2007.

Hooper LV, Manzella SM, Baenziger JU. (1996). From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *FASEB J*. 1996 Aug;10(10):1137-46.

Houle, J.D., Tom, V.J., Mayes, D., Wagoner, G., Phillips, N., Silver, J., (2006). Combining an autologous peripheral nervous system “bridge” and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult rat spinal cord. *J. Neurosci*. 26, 7405–7415.

Hurst, JL. (1987). The functions of urine marking in a free-living population of house mice, *Mus domesticus* Ruddy. *Anim Behav*. 1987;35:1433–42.

Ikuta, T., H. Ariga, and K. Matsumoto. (2000). Extracellular matrix tenascin-X in combination with vascular endothelial growth factor B enhances endothelial cell proliferation. *Genes Cells* 5:913-927.

VII. Literaturverzeichnis

Imai, Y., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1993). Sulphation requirement for GlyCAM-1. an endothelial ligand for L-selectin. *Nature (London)* 361,555-557.

Imai, Y., Singer, M. S., Fennie, C., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1991). Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *Cell Biol.* 113, 1213-1221.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-8.

Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I (1999). Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 274:4489–4492.

Irintchev A, Simova O, Eberhardt KA, Morellini F, Schachner M. (2005). Impacts of lesion severity and tyrosine kinase receptor B deficiency on functional outcome of femoral nerve injury assessed by a novel single-frame motion analysis in mice. *Eur J Neurosci.* 22(4):802-8.

Joester, A. and A. Faissner (1999). Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *J. Biol. Chem.* 274(24): 17144-17151.

Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH (2003). The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol* 182:399–411.

Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB, Tuszynski MH. (2002). NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci.* 2002 Apr 1;22(7):2792-803. [Click here to read Links](#)

Joshi M, Fehlings MG (2002). Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma* 19: 175-190.]

Kakuta Y, Pedersen LG, Pedersen LC, Negishi M. (1998). Conserved structural motifs in the sulfotransferase family. *Trends Biochem Sci.* 1998 Apr;23(4):129-30.

Kalb, R.G. & Hockfield, S. (1988). Molecular evidence for early activity dependent development of hamster motor neurons. *J. Neurosci.*, 8, 2350–2360.

Kang HG, Evers MR, Xia G, Baenziger JU, Schachner M. (2002). Molecular cloning and characterization of chondroitin-4-O-sulfotransferase-3. A novel member of the HNK-1 family of sulfotransferases. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):34766-72. Epub 2002 Jun 21.

Kang, H.G., M.R. Evers, G. Xia, J.U. Baenziger, and M. Schachner (2001). Molecular cloning and expression of an N-acetylgalactosamine-4-O- sulfotransferase that transfers sulfate to terminal and non-terminal beta 1,4-linked N-acetylgalactosamine. *J.Biol. Chem.* 276(14): 10861-10869.

VII. Literaturverzeichnis

Kawano, H., K. Ohyama, K. Kawamura, and I. Nagatsu (1995). Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86(1-2): 101-113.

Keilhauer G, Faissner A, Schachner M. (1985). Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature.* 1985 Aug 22-28;316 (6030):728-30.

Keirstead HS, Hasan SJ, Muir GD, Steeves JD. (1992). Suppression of the onset of myelination extends the permissive period for the functional repair of embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):11664-8.

Kiehn O, Rostrup E, Møller M. (1992). Monoaminergic systems in the brainstem and spinal cord of the turtle *Pseudemys scripta elegans* as revealed by antibodies against serotonin and tyrosine hydroxylase. *J Comp Neurol.* 1992 Nov 22;325(4):527-47.

Kim, S.U. and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* 81, 302–313 (2005).

Kinsella MG, Tsoi CK, Jarvelainen HT, Wight TN (1997). Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. The role of endogenous basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 272:318–325.

Kloos AD, Fisher LC, Detloff MR, Hassenzahl DL, Basso DM. (2005). Stepwise motor and all-or-none sensory recovery is associated with nonlinear sparing after incremental spinal cord injury in rats. *Exp Neurol.* 2005 Feb;191(2):251-65.

Klüppel M, Wight TN, Chan C, Hinek A, Wrana JL. (2005). Maintenance of chondroitin sulfation balance by chondroitin-4-sulfotransferase 1 is required for chondrocyte development and growth factor signaling during cartilage morphogenesis. *Development* 132:3989–4003.

Köppe G, Brückner G, Härtig W, Delpech B, Bigl V. (1997). Characterization of proteoglycan-containing perineuronal nets by enzymatic treatments of rat brain sections. *Histochem J.* 1997 Jan;29(1):11-20.

Kruse, J., G. Keilhauer, A. Faissner, R. Timpl, and M. Schachner (1985). The J1 glycoprotein{a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316(6024): 146-148.

Künemund V, Jungalwala FB, Fischer G, Chou DK, Keilhauer G, Schachner M. (1988). The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions. *J Cell Biol.* 1988 Jan;106 (1):213-23.

Lagord C, Berry M, Logan A. (2002). Expression of TGFbeta2 but not TGFbeta1 correlates with the deposition of scar tissue in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 2002 May;20(1):69-92. [Click here to read Links](#)

VII. Literaturverzeichnis

Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH, Zimmermann DR. (1995). Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development*. 1995 Aug;121(8):2303-12.

LeBaron RG, Zimmermann DR, Ruoslahti E (1992). Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 267:10003–10010.

Lips, K., Stichel, C.C., Muller, H.W., (1995). Restricted appearance of Tenascin and chondroitin sulphate proteoglycans after transection and sprouting of adult rat postcommissural fornix. *J. Neurocytol.* 24, 449–464.

Long, S. R. (1989). Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56,203-214.

Maeda, N and Noda M. (1996). 6B4 proteoglycan/phosphacan is a repulsive substratum but promotes morphological differentiation of cortical neurons. *Development* 122: 647–658, 1996.

Malmström, A. (1984). Biosynthesis of dermatan sulfate. II. Substrate specificity of the C-5 uronosyl epimerase. *J. Biol. Chem.* 259(1): 161-165.

Margolis RK, Margolis RU. (1993). Nervous tissue proteoglycans. *Experientia*. 1993 May 15;49(5):429-46. Review.

Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7634-8.

Matsuura T, Duarte WR, Cheng H, Uzawa K, Yamauchi M. (2001). Differential expression of decorin and biglycan genes during mouse tooth development. *Matrix Biol.* 2001 Sep;20(5-6):367-73.

Maurel, P., U. Rauch, M. Flad, R. K. Margolis, and R. U. Margolis. (1994). Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell-adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2512–2516.

McKeon RJ, Höke A, Silver J. (1995). Injury-induced proteoglycans inhibit the potential for laminin-mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol*. 1995 Nov;136(1):32-43.

McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. (1991). Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci*. 1991 Nov;11(11):3398-411.

Meyer-Puttlitz, B., E. Junker, R. U. Margolis, and R. K. Margolis. (1996). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing central nervous system. II. Immunocytochemical localization of neurocan and phosphacan. *J. Comp. Neurol.* 366:44–54.

VII. Literaturverzeichnis

Mi Y, Fiete D, Baenziger JU. (2008). Ablation of GalNAc-4-sulfotransferase-1 enhances reproduction by altering the carbohydrate structures of luteinizing hormone in mice. *J Clin Invest.* 2008 May;118(5):1815-24.

Mikami T, Mizumoto S, Kago N, Kitagawa H, Sugahara K. (2003). Specificities of three distinct human chondroitin/dermatan N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferases demonstrated using partially desulfated dermatan sulfate as an acceptor: implication of differential roles in dermatan sulfate biosynthesis. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36115-27.

Milev P., P. Maurel, A. Chiba, M. Mevissen, S. Popp, Y. Yamaguchi, R. K. Margolis, and R. U. Margolis. (1998). Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain: aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:207–212.

Milev P, Fischer D, Haring M, Schulthess T, Margolis RK, Chiquet-Ehrismann R, Margolis RU (1997). The Wbrinogen-like globe of tenascin-C mediates its interactions with neurocan and phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta. *J Biol Chem* 272:15501–15509.

Milev P., P. Maurel, M. Haring, R. K. Margolis, and R. U. Margolis. (1996). TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/proteintyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. *J. Biol. Chem.* 271:15716–15723.

Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU (1994). Interactions of the Chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 127:1703–1715.

Miller B, Sheppard AM, Bicknese AR, Pearlman AL. (1995). Chondroitin sulfate proteoglycans in the developing cerebral cortex: the distribution of neurocan distinguishes forming afferent and efferent axonal pathways. *J Comp Neurol.* 1995 May 15;355(4):615-28.

Miura, R., I. M. Ethell, and Y. Yamaguchi. (2001). Carbohydrate-protein interactions between HNK-1-reactive sulfoglucuronyl glycolipids and the proteoglycan lectin domain mediate neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 76:413–424.

Miura, R., A. Aspberg, I. M. Ethell, K. Hagihara, R. L. Schnaar, E. Ruoslahti, and Y. Yamaguchi. (1999). The proteoglycan lectin domain binds sulfated cell surface glycolipids and promotes cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 274:11431–11438.

Montgomery, K.C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiology Psychology* 48, 254-260.

Moon LD, Asher RA, Rhodes KE, Fawcett JW (2001). Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* 4:465–466.

VII. Literaturverzeichnis

- Morellini F, Schachner M. (2006).** Enhanced novelty-induced activity, reduced anxiety, delayed resynchronization to daylight reversal and weaker muscle strength in tenascin-C-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 2006 Mar;23(5):1255-68.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*;51 Pt 1:263-73.
- Neidhardt J, Fehr S, Kutsche M, Lohler J, Schachner M (2003).** Tenascin-N: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants. *Mol Cell Neurosci* 23:193–209.
- Neidhardt J, (2001).** Identification, cloning and characterization of the novel tenascin family member Tenascin-N and conditional gene targeting of tenascin-R. Dissertation im Fachbereich Chemie von John Neidhardt, 2001.
- Niederost, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E. & Bandtlow, C. E. (1999).** Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci.* 19,8979–8989 (1999).
- Nishiyama A, Dahlin KJ, Stallcup WB. (1991).** The expression of NG2 proteoglycan in the developing rat limb. *Development* 111: 933–944, 1991.
- Norenberg, U., H. Wille, J.M. Woloski, R. Frank, and F.G. Rathjen (1992).** The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, Fibronectin type III-, and Fibrinogen-like motifs. *Neuron* 8(5): 849-863.
- O'Brien, T. F., A. Faissner, M. Schachner, and D. A. Steindler. (1992).** Afferent-boundary interactions in the developing neostriatal mosaic. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 65:259-267.
- Ogawa, T., K. Hagihara, M. Suzuki, and Y. Yamaguchi. (2001).** Brevican in the developing hippocampal fimbria: differential expression in myelinating oligodendrocytes and adult astrocytes suggests a dual role for brevican in central nervous system fiber tract development. *J. Comp. Neurol.* 432:285–295.
- Ong E, Yeh JC, Ding Y, Hindsgaul O, Fukuda M. (1998).** Expression cloning of a human sulfotransferase that directs the synthesis of the HNK-1 glycan on the neural cell adhesion molecule and glycolipids. *J Biol Chem.* 1998 Feb 27;273(9):5190-5.
- Pasterkamp, R.J., M.J. Ruitenberg, and J. Verhaagen (1999).** Semaphorins and their receptors in olfactory axon guidance. *Cell Mol. Biol. (Noisy -le-grand)* 45(6): 763-779.
- Paylor R, Tracy R, Wehner J, Rudy JW. (1994).** DBA/2 and C57BL/6 mice differ in contextual fear but not auditory fear conditioning. *Behav Neurosci.* 1994 Aug;108(4):810-7.
- Perris R, Krotoski D, Lallier T, Domingo C, Sorrell JM, Bronner-Fraser M. (1991).** Spatial and temporal changes in the distribution of proteoglycans during avian neural crest development. *Development.* 1991 Feb;111(2):583-99.

VII. Literaturverzeichnis

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 26(6):509-15.

Pindzola RR, Doller C, Silver J (1993). Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol* 156:34–48.

Prabhakar, V., Capila, I., Bosques, C.J., Pojasek, K., Sasisekharan, R., (2005). Chondroitinase ABC I from *Proteus vulgaris*: cloning, recombinant expression and active site identification. *Biochem. J.* 386, 103–112.

Prieto AL, Jones FS, Cunningham BA, Crossin KL, Edelman GM (1990). Localization during development of alternatively spliced forms of cytotactin mRNA by in situ hybridization. *J Cell Biol* 111:685–698

Probstmeier, R., J. Nellen, S. Gloor, A. Wernig, and P. Pesheva. (2001). Tenascin-R is expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system. *J. Neurosci. Res.* 64:70-78.

Ramón y Cajal S (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system . Hafner, New York .

Rathjen FG, Wolff JM, Chiquet-Ehrismann R. (1991). Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Development.* 1991 Sep;113(1):151-64.

Rauch U, Gao P, Janetzko A, Flaccus A, Hingenberg L, Tekotte H, Margolis RK, Margolis RU. (1991). Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 266: 14785–14801, 1991.

Rauch, U., L. Karthikeyan, P. Maurel, R. U. Margolis, and R. K. Margolis. (1992). Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J. Biol. Chem.* 267:19536–19547.

Rettig, W.J., T.J. Triche, and P. Garin-Chesa (1989). Stimulation of human neuronectin secretion by brain-derived growth factors. *Brain Res.* 487(1): 171-177.

Retzler, C., W. Gohring, and U. Rauch. (1996). Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J. Biol. Chem.* 271:27304–27310.

Saga Y, Yagi T, Ikawa Y, Sakakura T, Aizawa S (1992). Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev* 6:1821–1831.

Sakai, T., Y. Furukawa, R. Chiquet-Ehrismann, M. Nakamura, S. Kitagawa, T. Ikemura, and K. Matsumoto. (1996). Tenascin-X expression in tumor cells and fibroblasts: glucocorticoids as negative regulators in fibroblasts. *J. Cell Sci.* 109:2069-2077.

VII. Literaturverzeichnis

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and T. Maniatis. (1989).** Molecular cloning: A Laboratory Manual. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Sandvig A, Berry M, Barrett LB, Butt A, Logan A. (2004).** Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*. 2004 May;46(3):225-51.
- Schachner M. (1997).** Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Oct;9(5):627-34.
- Schachner M. (1994).** Neural recognition molecules in disease and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 1994 Oct;4(5):726-34.
- Scherberich A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D, Chiquet-Ehrismann R (2004).** Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J Cell Sci* 117:571–581.
- Schnaar RL, Mahoney JA, Swank-Hill P, Tiemeyer M, Needham LK. (1994).** Receptors for gangliosides and related glycosphingolipids on central and peripheral nervous system cell membranes. *Prog Brain Res*. 1994;101:185-97.
- Schwartz NB, Lyle S, Ozeran JD, Li H, Deyrup A, Ng K, Westley J. (1998).** Sulfate activation and transport in mammals: system components and mechanisms. *Chem Biol Interact*. 1998 Feb 20;109(1-3):143-51.
- Seidenbecher CI, Richter K, Rauch U, Fässler R, Garner CC, Gundel-Wnger ED (1995).** Brevican, a chondroitin sulfate proteoglycan of rat brain, occurs as secreted and cell surface glycosylphosphatidylinositol-anchored isoforms. *J Biol Chem* 270:27206–27212.
- Senecoff JF, Bruckner RC, Cox MM. (1985).** The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Nov;82(21):7270-4.
- Senn C, Kutsche M, Saghatelian A, Bösl MR, Löhler J, Bartsch U, Morellini F, Schachner M. (2002).** Mice deficient for the HNK-1 sulfotransferase show alterations in synaptic efficacy and spatial learning and memory. *Mol Cell Neurosci*. 2002 Aug;20(4):712-29.
- Shapiro S. (1997).** Neurotransmission by neurons that use serotonin, noradrenaline, glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in the normal and injured spinal cord. *Neurosurgery*. 1997 Jan;40(1):168-76; discussion 177.
- Shinomura T, Nishida Y, Ito K, Kimata K. (1993).** cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem*. 1993 Jul 5;268(19):14461-9.
- Silver, J., and Miller, J. (2004).** Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci*. 5, 146–156.

VII. Literaturverzeichnis

- Smith-Thomas, L. C., Stevens, J., Fok-Seang, J., Faissner, A., Rogers, J.H., Fawcett, J.W., (1995).** Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *J. Cell Sci.* 108, 1307–1315.
- Smith-Thomas, L. C. et al. (1994).** An inhibitor of neurite outgrowth produced by astrocytes. *J. Cell Sci.* 107, 1687–1695 (1994).
- Southern EM. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975 Nov 5;98(3):503-17.
- Steward O, Zheng B, Tessier-Lavigne M (2003).** False resurrections: distinguishing regenerated from spared axons in the injured central nervous system. *J Comp Neurol* 459:1-8.
- Sugahara, K., Shigeno, K., Masuda, M., Fujii, N., Kurosaka, A., Takeda, K., (1994).** Structural studies on the chondroitinase ABC-resistant sulfated tetrasaccharides isolated from various chondroitin sulfate isomers. *Carbohydr. Res.* 255, 145–163.
- Tan, S. S., K. L. Crossin, S. Hoffman, and G. M. Edelman. (1987).** Asymmetric expression in somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:7977-7981.
- Tanaka M, Maeda N, Noda M, Marunouchi T. (2003).** A chondroitin sulfate proteoglycan PTPzeta/RPTPbeta regulates the morphogenesis of purkinje cell dendrites in the developing cerebellum. *J Neurosci* 2003; 23: 2804–14.
- Tello F (1911).** La influencia del neurotropismo en la regeneracion de los centros nerviosos. *Trab Lab Invest Biol* 9: 123-159
- Theodosis, D. T., K. Pierre, M. A. Cadoret, M. Allard, A. Faissner, and D. A. Poulain. (1997).** Expression of high levels of the extracellular matrix glycoprotein, tenascin-C, in the normal adult hypothalamoneurohypophysial system. *J. Comp Neurol.* 379:386-398.
- Thomas KR, Capecchi MR. (1987).** Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell.* 1987 Nov 6;51(3):503-12.
- Thomas WE. (1992).** Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev.* 1992 Jan-Apr;17(1):61-74.
- Tropea, D., Caleo, M., Maffei, L., (2003).** Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats. *J. Neurosci.* 23, 7034–7044.
- Tucker, R. P., C. Hagios, and R. Chiquet-Ehrismann. (1999).** Tenascin-Y in the developing and adult avian nervous system. *Dev. Neurosci.* 21:126-133.
- van Rooijen JJ, Kamerling JP, Vliegenthart JF. (1998).** Sulfated di-, tri- and tetraantennary N-glycans in human Tamm-Horsfall glycoprotein. *Eur J Biochem.* 1998 Sep 1;256(2):471-87.

VII. Literaturverzeichnis

- Walsh FS, Doherty P. (1996).** Cell adhesion molecules and neuronal regeneration. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Oct;8(5):707-13.
- Wang HU, Anderson DJ. (1997).** Eph family transmembrane ligands can mediate repulsive guidance of trunk neural crest migration and motor axon outgrowth. *Neuron.* 1997 Mar;18(3):383-96.
- Weber CK, Sommer G, Michl P, Fensterer H, Weimer M, Gansauge F, Leder G, Adler G, Gress TM (2001).** Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* 121:657–667.
- Weber P, Bartsch U, Rasband MN, Czaniera R, Lang Y, Bluethmann H, Margolis RU, Levinson SR, Shrager P, Montag D, Schachner M (1999).** Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* 19:4245–4262.
- Weber, P., D. Montag, M. Schachner, and R. R. Bernhardt. (1998).** Zebrafish tenascin-W, a new member of the tenascin family. *J. Neurobiol.* 35:1-16.
- Woodworth A, Fiete D, Baenziger JU. (2002).** Spatial and temporal regulation of tenascin-R glycosylation in the cerebellum. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):50941-7. Epub 2002 Oct 18.
- Xia, G., Evers, M. R., Kang, H. G., Schachner, M., and Baenziger, J. U. (2000).** Molecular cloning and expression of the pituitary glycoprotein hormone N-acetylgalactosamine-4-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* 275: 38402–38409.
- Xu Q, Mellitzer G, Robinson V, Wilkinson DG. (1999).** In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature.* 1999 May 20;399(6733):267-71.
- Yamada, H., B. Fredette, K. Shitara, K. Hagihara, R. Miura, B. Ranscht, W. B. Stallcup, and Y. Yamaguchi. (1997).** The brain chondroitin sulfate proteoglycan brevican associates with astrocytes ensheathing cerebellar glomeruli and inhibits neurite outgrowth from granule neurons. *J. Neurosci.* 17:7784–7795.
- Yamada H, Watanabe K, Shimonaka M, Yamaguchi Y. (1994).** cloning of brevican, a novel brain proteoglycan of the aggrecan/versican family. *J Biol Chem* 269: 10119–10126, 1994.
- Yamaguchi, Y. (2000).** Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:276–289.
- Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K, Kimata K (1995).** Expression of PG-M (V3), an alternative splice form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment region in mouse and human tissues. *J Biol Chem* 270:3914–3918.
- Zuo, J., Neubauer, D., Dyess, K., Ferguson, T. A. & Muir, D. (1998).** Degradation of chondroitin sulfate proteoglycan enhances the neurite-promoting potential of spinal cord tissue. *Exp. Neurol.* 154, 654–662 (1998).

VII. Literaturverzeichnis

Zhang P, Li MZ, Elledge SJ. (2001). Towards genetic genome projects: genomic library screening and gene-targeting vector construction in a single step. *Nat Genet.* 2002 Jan;30(1):31-9. Epub 2001 Dec 20.

Zhou, X. H., C. Brakebusch, H. Matthies, T. Oohashi, E. Hirsch, M. Moser, M. Krug, C. I. Seidenbecher, T. M. Boeckers, U. Rauch, R. Buettner, E. D. Gundelfinger, and R. Fässler. (2001). Neurocan is dispensable for brain development. *Mol. Cell. Biol.* 21:5970–5978.

Abkürzungen

Ø	Durchmesser	DMSO	Dimethylsulfoxid
°C	Grad Celsius	DNA	Desoxyribonukleinsäure
+/+	Wildtyp	DNase	Desoxyribonuklease
+/-	heterozygot	dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'- <i>Triphosphat</i>
-/-	knockout	DS	Dermatansulfat
µ	micro (10 ⁻⁶)	dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
A	Adenin	DTT	1,4-Dithiothreitol
Abb.	Abbildung	E	Embryonaltag
abs.	absolut	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
amp	Ampicillin	ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
AS	Aminosäure	EDTA	Ethylendiamin-tetra- Essigsäure
ATP	Adenosin Triphosphat	EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
BMP	<i>bone morphogenic Protein</i>	engl.	englisch
Bp	Basenpaare	ES Zellen	Embryonale Stammzellen
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)	et al.	<i>et alii</i>
C	Cytosin	EtBr	Ethidiumbromid
C`	Carboxy-Terminus	F	Faraday Konstante
C	Kohlenstoffatom	FBG	Fibrinogen
C	caudal	FCS	Fötales Kälberserum
ca.	circa	FN III	Fibronektin Typ III
cam	Chloramphenicol	FRT	<i>FLP recognition target</i>
CAMs	Zelladhäsionsmoleküle (<i>cell adhesion molecules</i>)	FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	FSW	<i>footstepping</i> Winkel
CG	<i>chorionic Gonatropin</i>	g	Gramm
CHO	chimäre Hamsterovarien	G	Guanin
ChABC	Chondroitinase ABC	GAG	Glykosaminoglykan
cpm	<i>counts per minute</i>	GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
CS	Chondroitinsulfat	GAPDH	Glycerinaldehyd-3- phosphat- Dehydrogenase
CSPG	Chondroitinsulfat- Proteoglykan	GlcA	Glukuronsäure
Ct	Schwellenwert (<i>threshold cycle</i>)	GPI	Glykosyl- Phosphatidyl-Inosiol
d.h.	das heißt	h	human (menschlich)
Da	Dalton	h	Stunde(n)
dATP	2'-Desoxyadenosin Triphosphat		
dd H ₂ O	„ultrareines“ Wasser		
dCTP	2'-Desoxycytidin Triphosphat		

VIII. Anhang

H ₂ O	Wasser	PAGE	Polyacrylamid Gel
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-Piperzino)-Ethansulfonic acid	PAPS	Elektrophorese 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat
HNK	<i>human natural killer cells</i>	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
hom	homolog	PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
HRP	Meerrettich Peroxidase	PCR	Polymerase Kettenreaktion
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoryltransferase	PFA	Paraformaldehyd
IdoA	Iduronsäure	pfu	Plaque bildende Einheiten (<i>Plaque forming units</i>)
Ig	Immunoglobulin	pg	Picogramm
Ihh	<i>Indian hedgehog</i>	PG	Proteoglykan
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid	pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
kan	Kanamycin	PNN	perineuronalen Netze
kb	Kilobasenpaare	PNS	peripheres Nervensystem
kDa	Kilodalton	qRT PCR	semiquantitative Real Time PCR
ko	knockout	R	rostral
l	Liter	REC	<i>recombination cloning</i>
L	Läsion	RHI	<i>rump-height</i> Index
LB	Luria Bertani	RI	<i>recovery</i> Index
LH	Lutropin	RNA	Ribonukleinsäure
LIF	<i>Leukaemia inhibitory factor</i>	RNase	Ribonuklease
loxP	<i>locus of recombination</i>	RPII	RNA Polymerase II
LTP	Langzeit Potenzierung	P/S	Penicillin/ Streptomycin
m	milli (10 ⁻³)	RT	Raumtemperatur
M	molar (mol/Liter)	RT	reverse Transkriptase
mA	Milli Ampere	s	Sekunden
mcs	Multiple Kolonierungs Stelle (<i>multiple cloning site</i>)	SAP	Shrimp alkaline Phosphatase
MEF Zellen	Maus Embryonale Fibroblasten Zellen	SDS	Natrium Dodecyl Sulfat (Sodium Dodecyl Sulfat)
min	Minute(n)	SEM	Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
ml	Milliliter	s.o.	siehe oben
MMC	Mitomycin C	spec	Spektinomycin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure	ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
n	nano (10 ⁻⁹),	T	Thymidin
n	Anzahl	Tab.	Tabelle
N`	Amino-Terminus	T _M	Anlagerungstemperatur
NCAM	neuronales Zelladhäsionsmolekül	TAE	tris azidisches EDTA
neo	Neomycin (Aminoglykosid-Phosphotransferase)	TE	tris EDTA
ng	Nanogramm	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
nt	Nukleotid(e)	TBST	Tris-gepufferte Salzlösung
OD	optische Dichte	tet	Tween
OH	Hydroxylgruppe	TGFB	Tetracyclin
OP	Operation	TH	<i>transforming growth factor β</i>
OPC	Oligodendrozyten Vorläuferzelle	Tm	<i>Tyrosinhydroxylase</i>
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)	TM	Schmelztemperatur transmembran
P	postnatal		
p	pico (10 ⁻¹²)		
p.A.	pro analysii		

VIII. Anhang

TN	Tenascin	vgl.	vergleiche
TSH	Thyroid-stimulierendes Hormon	v/v w/v	Volumen pro Volumen Gewicht pro Volumen
U	Einheit/ Unit (enzymatisch)	wt	Wildtyp
ÜN	über Nacht	z.B.	zum Beispiel
upm	Umdrehungen pro Minute	ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
UTR	untranslatierte Region		
UV	ultraviolett	ZNS	Zentrales Nervensystem
V	Volt		

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Metabion (München, Deutschland) bestellt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5' - 3' Richtung angegeben.

Name	Sequenz	Klonierung von
TNN-55 FW1	AAA GTT TAA ACA GAA CTA GTT TCA CTG CTA TTA ATA GCA CAT GCC TTA AAG GAC AGC AGA GTA AGG ACT	5'TN-N loxP-tet
TNN-55 FW2	AGG ACA GCA GAG TAA GGA CTG AGT AGC ACA CAA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT CTG GA	5'TN-N loxP-tet
TNN-53 RV1	TTT GTT TAA ACG CTA TTT TGT GTG ATG GGG ATT TCA TAT CCA TTT AGT TAT GTT GCA GAA GAG GGG TCT TCA TAT	5'TN-N loxP-tet
TNN-53 RV2	TGT TGC AGA AGA GGG GTC TTC ATA TGA CCC AGC TGA AGC TTA ATT AAG TCG ACC TCG AGA TTT AAA TCC TG	5'TN-N loxP-tet
TN-N-35-FW1	AAA GTT TAA ACA TAG GGA GGG GTT TAT GAC TTG CAT CAA ATA AGG AAA GCT CTG GGA ACA ACT CTC	3'TN-N loxP-neo/kan- loxP
TN-N-35-FW2	AGG AAA GCT CTG GGA ACA ACT CTC GAA GCA GTG TTC TTC GGG TCT AGC CGC GGG AAG T	3'TN-N loxP-neo/kan- loxP
TN-N-33-RV1	TTT GTT TAA ACT GAC AGG GCA ATG TGC TGT ATG CGT TTC TGA ATA GAA GTT CCC AC	3'TN-N loxP-neo/kan- loxP
TN-N-33-RV2	GCG TTT CTG AAT AGA AGT TCC CAC CCC TCC CCT GCT TTC TTT GTT TGG ACG GTA AAA CGA CGG CCA GTG	3'TN-N loxP-neo/kan- loxP
KOEZ FW2	CTT CTG AGG GGG GAT CAA TTC TC	3'TN-N loxP-neo/kan- loxP und 3'CHST-12 loxP- neo/kan-loxP
KOEZ RV2	TGG CTG GCA ACT AGA AGG CAC AGT CGA	3'TN-N loxP-neo/kan- loxP und 3'CHST-12 loxP- neo/kan-loxP

VIII. Anhang

TNN-Sonde-FW1	GAT AGA AGG CTG GAA CTC TAA AGT T	TN-N Sonde
TNN-Sonde RV1	CAC TGG GTC TAT TGA ATG AGT TCC T	TN-N Sonde
TNN Sonde2 FW	CTG GAC ATG TGT CTC ATG AAG AGC	TN-N Sonde
TNN Sonde2 RV	GGC TCT ATA CTG AAG CAA GGA GTG	TN-N Sonde
TNN Sonde3 FW	GTG GAT CTG CTC TCC GGA ACG TA	TN-N Sonde
TNN Sonde3 RV	ATC AAG GCT ATG ACA GAG GAG GAG	TN-N Sonde
CHST12-55-FW1	AAA GTT TAA ACT CTG GCC TCT CCA GGT CCG TCT CCC AGG GAC CAT GTC CCA GCT GTG CAC AAG GCT GAA GT	5'CHST-12 loxP-tet-loxP
CHST12-55-FW2	CAG CTG TGC ACA AGG CTG AAG TGA AGG GCC AGA TAA CTT CGT ATA GCA TAC ATT ATA CGA AGT TAT CTG GA	5'CHST-12 loxP-tet-loxP
CHST12-53-RV1	TTT GTT TAA ACA TGA GAG CCG ACC CTA GTA CCA GCC ACA GCC GGA AGA GCC GCG GCT TGG TCA TGC TGC CCT	5'CHST-12 loxP-tet-loxP
CHST12-53-RV2	GCG GCT TGG TCA TGC TGC CCT GGG CTG GGC GAG CTC ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TGA GCT	5'CHST-12 loxP-tet-loxP
tet RV1	AGA GGA TCC ACA GGA CGG GTG T	5'CHST-12 loxP-tet-loxP
tet FW1	TCG GAG CAC TGT CCG ACC GCT	5'CHST-12 loxP-tet-loxP
CHST12-35-FW1	AAA GTT TAA ACA GTT GTG AGC CAC CAT GGG AGT GTC AGG TCC TCC TGG AAG CAG GCA GTG	3'CHST-12 loxP- neo/kan-loxP
CHST12-35-FW2	TCC TCC TGG AAG CAG GCA GTG CTT GTT ACC ATG GAG ACA TCA GGG TCT AGC CGC GGG AAG T	3'CHST-12 loxP- neo/kan-loxP
CHST12-33-RV1	TTT GTT TAA ACA GAT GGG TTT TCA CAC TCA AAG GAT GCA CCT GCC TCT CCT TAC AAA TAG AGG C	3'CHST-12 loxP- neo/kan-loxP
CHST12-33-RV2	CTG CCT CTC CTT ACA AAT AGA GGC AAA GGG GCT GGA GAG AAC GGT AAA ACG ACG GCC AGT G	3'CHST-12 loxP- neo/kan-loxP
TNNgeno FW1	GAC CTG TCT CAC ATC CTG TAC AGA	Genotypisierung
TNNgeno RV1	CAA GAA GCA CTT CCA TAT CAT TAC AC	Genotypisierung
TNNgeno FW2	AGG AAC TCA TTC AAT AGA CCC AGT G	Genotypisierung
neo-seq RV1	GAA AAG CGC CTC CCC TAC C	Genotypisierung
neo-seqRV2	TGC TAA AGC GCA TGC TCC AGA CT	Genotypisierung
TNN 5'FW1	AGT GAG AGA GGC CTC CTG ACT GT	Sequenzierung
TNN 5'Exon2-FW	CTT AGG ATC TGT TAA GAG AGG GTA AG	Sequenzierung
TNN 5'Exon3-FW	TGT CAG CCA TCT CTG ACT AGT CTC	Sequenzierung
TNN 5'Exon4-FW	GTG CTG GAG AAT ATT CAT TTG GCC AC	Sequenzierung

VIII. Anhang

TNN 3'FW1	CAC TGC ATC AGC AGA CAA CAC CAG	Sequenzierung
TNN 3'RV1	GGA TTA TAA GTG CTT AGT GTT TAC GTG	Sequenzierung
CHST12-5'loxP FW	GAG GCT AGA GAC AGA CAA GCA AGT	Sequenzierung
CHST12 3' FW	GCA CCA TGT GTA TGG AAT ACC CAC	Sequenzierung
CHST12 3' RV	ACG TCA GGC AGC TCA CAT GAA TTC	Sequenzierung
M13 For	GTT TTC CCA GTC ACG AC	Sequenzierung
M13 Rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Sequenzierung
neokan FW1	TCA GGC TAT GAA ACT GAC ACA TTT G	Sequenzierung
neokan RV1	CAA ATG TGT CAG TTT CAT AGC CTG A	Sequenzierung
neokan FW2	GAG ACG AAA TAC GCG ATC GCT GTT	Sequenzierung
neokan RV2	AAC AGC GAT CGC GTA TTT CGT CTC	Sequenzierung
neokan FW3	TGA ATA TGG CTC ATA TGA AAC GAT CC	Sequenzierung
neokan RV3	GGA TCG TTT CAT ATG AGC CAT ATT CA	Sequenzierung
neokan FW4	GAG AAT TGA TCC CCC CTC AGA AG	Sequenzierung
neokan RV4	CTT CTG AGG GGG GAT CAA TTC TC	Sequenzierung
neokan FW5	ACG TCG AGC ACA GCT GCG CAA G	Sequenzierung
neokan RV5	CTT GCG CAG CTG TGC TCG ACG T	Sequenzierung
neokan FW6	CGT CCT GCA CGA CGC GAG CTG	Sequenzierung
neokan RV6	CAG CTC GCG TCG TGC AGG ACG	Sequenzierung

Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Melitta Schachner für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, die fachkundige Betreuung und zahlreichen Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Konrad Wiese möchte ich für die Möglichkeit zu dieser externen Promotion sowie für Freiheit bei der Ausgestaltung dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin, Dr. Nuray Akyüz, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, die für alle Fragen und Diskussionen offen war und ohne die diese Arbeit nie diesen Verlauf genommen hätte.

Ebenfalls sehr bedanken möchte ich mich bei Dr. Fabio Morellini, der mich in die Geheimnisse der Verhaltensbiologie einführte und mir bei Fragen zur statistischen Auswertung der Versuche stets geduldig zur Seite stand.

Im gleichen Atemzug möchte ich auch Dr. Igor Jakovcevski und Dr. Andrey Irintchev nennen, die mich in die Methodik der Maus-Operationen und der Morphologie eingewiesen haben und die mit Ihren Anregungen und Diskussionen sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Dr. Irm Hermans-Borgmeyer möchte ich mich für die Hilfe bei der ES-Zell-Kultur und den Hilfestellungen bei den Southern Blots bedanken.

Emanuela Szpotowicz danke ich für die Hilfe beim Färben der Rückenmarksschnitte und Laura Sophie Hölter für ihre Hilfe und Geduld beim Filmen der teilweise doch sehr eigenwilligen Mäuse sowie für ihre Hilfe beim Schneiden der vielen Rückenmarke.

Ich möchte auch den vielen guten Geistern im Hintergrund danken. Fritz Kutschera und Torsten Renz aus der Werkstatt, die wirklich alles wieder zum Laufen brachten, der EDV, der Tierhaltung, Sabine Hoffmeister-Ullerich für die vielen Tipps bei den Sequenzierungen sowie Peggy Putthoff und Achim Dahlmann, ohne die vieles im Labor nicht so reibungslos laufen würde.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Kollegen bedanken, die dafür sorgten, dass mir die Zeit meiner Doktorarbeit stets in besonderer Erinnerung bleiben wird und von denen einige zu wirklich guten Freunden wurden: Mein Labornachbar Mounir „Mounsen“ M'Zoughi, der so manchen Frust und sehr viel Kaffee mit mir teilte und ohne den E30 nicht das Gleiche gewesen wäre. Daniel „Dänsen“ Novak, mein „kleiner Bruder“, der immer da war wenn man Hilfe brauchte, Ingo „Ingsen“ Meier, der mich mit seinem besonderen Humor immer wieder zum Lachen brachte und Nina Stemmer, mit der ich nicht nur im Labor viele lustige Stunden erlebte.

Carina Figge, Isabel Köhlitz, Janinne Schmid, Michael Knepper, Aparna Shetty, Nicole Karl, Vasudharani Devanathan, Gerrit Wolters, Gunnar Hargus, Jens Block, Iris Oezen, Peggy Putthoff, Nuray Akyüz, Achim Dahlmann, Thomas Tilling und allen anderen Kollegen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und viele nette fachliche und persönliche Gespräche.

Unendlicher Dank geht an Lili, Olly, Mathilda und Emma Gries dafür, dass sie nie müde wurden Frust und Freuden des Laboralltags mit mir zu teilen, mich immer wieder aufbauten und motivierten und einfach da waren.

Besonderer Dank gilt auch Guido Rost für sein Verständnis und seine Geduld, besonders während der Zeit des Schreibens, sowie für viele aufrichtende und motivierende Worte nach frustrierenden Arbeitstagen.

Ganz besonderer Dank geht auch an meine Eltern, meine Schwester Angela und meine Großeltern ohne die ich heute nicht da wäre wo ich bin, die mich stets unterstützten und darin motivierten meinen Weg zu gehen.