Aus dem Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen
des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin: Frau Prof. Dr. Melitta Schachner

Morphologische Untersuchungen des Kleinhirns und des visuellen Kortex im Hinblick auf die Hauptzellpopulationen in der erwachsenen CHL1-defizienten Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin vorgelegt
von

Janina Effi Siering
aus Braunschweig

Hamburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 05.06.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Schachner

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. A. Irintchev

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Glatzel

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG ... 1

1.1 ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE ... 1

1.2 DIE L1-FAMILIE: STRUKTUR, FUNKTION UND EXPRESSIONSMUSTER ... 2

1.2.1 L1 ... 2

1.2.2 CHL1 ... 3

1.3 L1 UND CHL1 KNOCKOUT-MÄUSE ... 5

1.3.1 L1 ... 5

1.3.2 CHL1 ... 6

1.4 CHL1 UND L1 ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN IM MENSCHEN ... 9

2. GRÜNDE UND ZIELE DER STUDIE ... 11

3. MATERIAL UND METHODEN ... 12

3.1 TIERE ... 12

3.2 VORBEREITUNG DES GEWEBES FÜR DIE SCHNITTE ... 12

3.3 ANFERTIGUNG DER KRYOSTAT-SCHNITTE ... 13

3.4 STEREOLOGISCHE ANALYSEN VON IMMUNHISTOCHEMISCH IDENTIFIZIERTEN ZELLTYPEN ... 13

3.4.1 Antikörper ... 13

3.4.2 Immunhistochemische Färbungen ... 14

3.4.3 Stereologische Analysen ... 15

3.4.4 Messung der Schichtdicke ... 16

3.4.5 Fotografische Dokumentation ... 17

3.4.6 Statistische Analysen ... 17

4. ERGEBNISSE ... 18

4.1 KORTIKALE DICKE ... 18

4.1.1 Kortikale Dicke des cerebellären Kortex ... 18

4.1.2 Kortikale Dicke des visuellen Kortex ... 19

4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN ... 20

4.3 STEREOLOGISCHE ANALYSEN DES CEREBELLÄREN KORTEX ... 22

4.3.1 Nervenzellen des cerbellären Kortex ... 22

4.3.2 Gliazellen des cerebellären Kortex ... 23

4.4 STEREOLOGISCHE ANALYSEN DES VISUELLEN KORTEX ... 24

4.4.1 Nervenzellen des visuellen Kortex ... 24

4.4.2 Gliazellen des visuellen Kortex ... 25

5. DISKUSSION ... 26

5.1 CEREBELLÄRER KORTEX ... 26

5.1.1 Kortikale Dicke des cerebellären Kortex ... 26

5.1.2 Verlust von Purkinjezellen ... 26

5.1.3 Verlust von Körnerzellen ... 28

5.1.4 Interneurone des cerebellären Kortex in der CHL-/- Maus ... 30

5.1.5 Gliazellen des cerebellären Kortex in der CHL1-/- Maus ... 30

5.1.6 Funktionelle Betrachtungen ... *31*
5.2 VISUELLER KORTEX ... 34
5.2.1 Kortikale Dicke des visuellen Kortex ... *34*
5.2.2 Zellpopulationen des visuellen Kortex in der CHL1-/- Maus ... *34*
5.3 FAZIT ... 35
6. ZUSAMMENFASSUNG ... 36
7. LITERATURVERZEICHNIS ... 38
8. ANHANG ... 45
8.1 TABELLE 1: PRIMÄRE ANTIKÖRPER, DIE IN DIESER STUDIE VERWENDET WURDEN ... 45
8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ... 46
8.3 DANKSAGUNG ... 49
8.4 LEBENSLAUF ... 50
8.5 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG ... 51

1. EINLEITUNG

1.1 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (auch CAMs für „cell adhesion molecules“) sind integrale Membranproteine mit vielen bedeutenden Funktionen im sich entwickelnden und adulten Nervensystem. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Migration und dem Überleben von Neuronen, dem Auswachsen und der Bündelung von Neuriten, sowie der Konsolidierung von Synapsen und ihrer Plastizität. Nur durch diese Prozesse kann sich das Gehirn zu einem komplex arbeitenden System entwickeln und auch noch im adulten Zustand seine Aufgaben flexibel und anpassungsfähig erfüllen. Störungen in diesen Prozessen führen zu verschiedensten Erkrankungen bei Menschen und Tieren.

Zelladhäsionsmoleküle werden in drei große Gruppen eingeteilt: die Integrine, die Cadherine und die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF).

Über ihre extrazelluläre Domäne können die Zelladhäsionsmoleküle sowohl homo- als auch heterophile Verbindungen mit anderen Zellen eingehen. Durch diese Kontakte lösen sie bestimmte Signalkaskaden aus, die bestimmte Prozesse zur Folge haben, wie axonales Wachstum und Migration. Nur die Integrine gehen auch Kontakte zu Proteinen der extrazellulären Matrix ein.

Die Zelladhäsionsmoleküle, welche für die Entwicklung und Funktionen des Gehirns die größte Bedeutung haben, gehören zu der IgSF. Als gemeinsames charakteristisches Merkmal weisen sie mindestens eine Immunglobulin (Ig)-verwandte Domäne auf, die calciumunabhängig homo- und heterophile Interaktionen eingehen kann. Durch externe Proteasen ist die Freisetzung dieser Domäne als lösliche Form möglich. Die Zelladhäsionsmoleküle der IgSF zeigen alle ein charakteristisches zeitliches, gebietsspezifisches und zellspezifisches Expressionsmuster (Holm *et al.* 1996, siehe Reviews: Rathjen und Jessell, 1991; Schachner *et al*., 1991; Rutishauser *et al*., 1993).

Die IgSF lässt sich in drei Untergruppen einteilen, abhängig von der Anzahl an Ig-verwandten Domänen, dem Vorhandensein und der Anzahl von Fibronektin-Typ-III-verwandten (FN-III) Domänen und der Art der Verankerung in der Zellmembran (Cunningham *et al*., 1995; Brümmendorf und Rathjen, 1993). Das NCAM („neural cell adhesion molecule“), L1 und CHL1 („close homologue of L1“) sind Mitglieder der Untergruppe 2 und zeichnen sich durch charakteristische Ig-verwandte Domänen und eine bestimmte Anzahl an FN-III-Domänen aus.

1.2 Die L1-Familie: Struktur, Funktion und Expressionsmuster

Die „klassische“ L1-Familie bei Wirbeltieren besteht aus vier Mitgliedern: L1, CHL1, Neurofascin und NrCAM (auch „NgCAM-related cell adhesion molecule“ genannt). Sie sind durch folgende gemeinsame Strukturmerkmale gekennzeichnet: sechs N-terminale Ig-Domänen, vier bis fünf FN-III-Domänen, eine Transmembrandomäne sowie eine stark konservierte C-terminale intrazelluläre Region, die durch den Zytoskelettadaptor Ankyrin an das Aktin bindet (Brümmendorf und Rathjen, 1994; Holm *et al*., 1996; Buhusi *et al.,* 2003).

Die Mitglieder der L1-Familie werden erst relativ spät während der Entwicklung exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die neuronale Differenzierung schon fortgeschritten und die ersten Axone beginnen auszuwachsen (Hillenbrand *et al*., 1999). Jedes Mitglied kann das Auswachsen von Neuriten stark fördern. Da sie jedoch unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, vermutet man verschiedene Einflüsse auf die Art des Auswachsens und die Wegfindung der Axone. Auch auf andere Mechanismen, wie synaptische Plastizität, Faszikulierung von Axonen und neuronale Migration, scheinen die Mitglieder der L1-Familie ganz spezifische Auswirkungen zu haben. Des Weitern ist bekannt, dass eine Neuronengruppe verschiedene Mitglieder gleichzeitig oder nur einen speziellen Typus der L1-Familie exprimieren kann.

1.2.1 L1

L1 wurde als erstes von den Mitgliedern der L1-Familie entdeckt (Rathjen und Schachner, 1984). Der grundlegende Aufbau von den Familienmitgliedern ist bereits oben beschrieben. Als Charakteristikum weist L1 fünf FN-III-Domänen auf. Die extrazelluläre Domäne kann homophile als auch heterophile Interaktionen mit anderen Ig-Zelladhäsionsmolekülen (Grumet und Sakurai, 1996), Integrinen (Montgomery *et al*., 1996) und Tyrosinphosphatasen-Rezeptoren eingehen (Friedländer *et al*., 1994), während die intrazelluläre Domäne signalvermittelnd und regulatorisch wirkt.

L1 ist nicht nur im zentralen und peripheren Nervensystem vorhanden, sondern wird auch in einigen nicht-neuralen Geweben exprimiert, wie dem Kryptenepithel des Darms (Thor *et al*., 1987), dem Nierenepithel (Nolte *et al*., 1999), sowie in T- und B-Lymphozyten (Ebeling *et al*., 1996). Die Expression von L1 beginnt während der frühen neuronalen Entwicklung und nimmt im Gegensatz zu CHL1 im Laufe der postnatalen Entwicklung der Maus nicht ab (Hillenbrand *et al*., 1999). Stress- und Lernmodelle zeigten, dass L1 im adulten Gehirn in komplexe Steuerungsmechanismen von Glukokortikoiden eingebunden ist (Venero *et al.*, 2004; Merino *et al*., 2000; Sandie *et al*., 2001).

L1 hat für folgende Prozesse eine wichtige funktionelle Bedeutung: Wachstum und Bündelung von Axonen (Fischer *et al*., 1986; Cervello *et al*., 1991), synaptische Plastizität (Lüthl *et al*., 1994), Myelinisierung (Wood *et al*., 1990), Migration und Überleben von Neuronen (Lindner *et al*., 1983; Chen *et al*., 1999) sowie axonale Wegfindung (Brümmendorf *et al*., 1998).

1.2.2 CHL1

CHL1 wurde zufällig entdeckt. Als mit einem polyklonalen Antikörpern gegen L1 nach L1-cDNA-Klonen gesucht wurde, konnte ein Klon isoliert werden, der nur eine partielle L1-cDNA-Sequenz enthielt (Tacke et al., 1987). Diese cDNA-Sequenz hatte eine Homologie zu L1 von 34%. In weiteren Analysen ließ sich feststellen, dass es sich hierbei um ein neues Protein handelt, das aus 1209 Aminosäuren zusammengesetzt ist und eine molekulare Masse von 134.9 kDa aufweist (Holm *et al*., 1996). Aufgrund der Homologie zu L1 nannte man das Protein „close homologue of L1“ (CHL1).

Der grundlegende Aufbau von CHL1 entspricht dem der anderen Mitglieder der L1-Familie (siehe oben), wobei 60% der extrazellulären und 40% der intrazellulären Aminosäurensequenz identisch mit der des L1-Moleküls sind. Als Besonderheit enthält es 4,5 FN-III-Domänen.

In Aggregationsversuchen mit CHL1 transfizierten Zellen ließen sich keine homophilen Interaktionen oder heterophilen Interaktionen mit L1-Molekülen beobachten (Hillenbrand *et al*., 1999). Allerdings wurden in einer aktuellen Studie homophile Interaktionen von CHL1-Molekülen *in vitro* festgestellt (Jakovcevski *et al*., 2007)

CHL1 zeigt ein interessantes Expressionsmuster. In Mäusen kann es frühestens am 13. embryonalen Tag nachgewiesen werden, etwa zur gleichen Zeit, wenn die ersten Axone auszuwachsen beginnen. Die CHL1-Expression erreicht ihren Höchststand zwischen dem 18. embryonalen Tag und dem siebten postnatalen Tag und nimmt dann langsam im adulten Gehirn ab (Hillenbrand *et al.*, 1999). Während der embryonalen Entwicklung wird CHL1 in einem anwachsenden rostro-caudalen Gradienten im cerebralen Kortex der Maus exprimiert. Es ist in allen neokortikalen Schichten vorhanden, wobei die ausgeprägteste Expression in der fünften Schicht mit einem Maximum über dem visuellen Kortex zu finden ist (Liu *et al.*, 2000; Demyanenko *et al*., 2004). Die CHL1-Expression konnte bisher nur auf neuralem Gewebe nachgewiesen werden und scheint dabei nicht so weit verbreitet zu sein wie die Expression des L1-Moleküls (Hillenbrand *et al*., 1999; Holm *et al*., 1996). CHL1 ist zwar in fast allen Regionen des adulten Gehirns vorhanden, jedoch wird es meistens nur von bestimmten Neuronenuntergruppen auf einem hohen Niveau exprimiert (Montag-Sallaz *et al*., 2002). Es befindet sich zum Beispiel auf einigen pyramidalen Neuronen und Interneuronen im

Hippocampus, sowie auf Motoneuronen und nicht-myelinisierten Schwannzellen (Hillenbrand *et al*., 1999; Nikonenko *et al*., 2006). Im Unterschied zu L1 wird CHL1 auch von einigen Untergruppen reifer Astrozyten und von den Vorläuferzellen der Oligodendrozyten exprimiert (Holm *et al.,* 1996; Hillenbrand *et al*., 1999).

Im Kleinhirn wird CHL1 nicht nur während der embryonalen Entwicklung exprimiert, sondern auch auf relativ hohem Niveau in der postnatalen Entwicklung und im Erwachsenenalter. Durch *In-situ*-Hybridisierung ließ sich die Expression von CHL1-mRNA in Stern- und Korbzellen, sowie Golgi-Interneuronen und Körnerzellen der inneren Körnerzellschicht nachweisen (Holm *et al*., 1996; Nikonenko *et al.*, 2006; Jakovcevski *et al*., 2008). Mit immunhistochemischen Färbemethoden fand man CHL1 am weitesten verbreitet in der Molekularschicht und konnte es in dieser Region insbesondere den Parallelfasern zuordnen (Nikonenko *et al*., 2006; Jakovcevski *et al*., 2008). Hingegen scheinen die Purkinjezellen in keiner Phase der Kleinhirnentwicklung CHL1 zu exprimieren. Die Bergmann-Gliazellen exprimieren nur auf ihren radialen Fortsätzen, die in Richtung der externen Körnerzellschicht weisen, CHL1 und nicht auf ihren Somata (Jakovcevski *et al*., 2008). Außerhalb des cerebellären Kortex wird CHL1 von den Neuronen der tiefen Kleinhirnkerne exprimiert (Holm *et al*., 1996). Aufgrund dieses Expressionsmusters wird spekuliert, dass CHL1 wichtig ist für die normale Entwicklung des Kleinhirns. Allerdings ließen sich bisher keine sichtbaren histologischen Abnormalitäten oder motorische Behinderungen bei den CHL1-/- Mäusen feststellen (Holm *et al*., 1996; Morellini *et al.*, 2006).

Die funktionellen Eigenschaften von CHL1 sind noch nicht so ausführlich erforscht wie die des L1-Moleküls. Durch heterophile Bindungen fördert CHL1 das Auswachsen von Neuriten *in vitro* bei hippocampalen und cerebellären Neuronen (Hillenbrand *et al.,* 1999; Chen *et al*., 1999). Außerdem kann es das Überleben von Neuronen *in vitro* unterstützen (Chen *et al*., 1999; Hillenbrand *et al.,* 1999; Jakovcevski et al., 2008) und fördert als Co-Rezeptor von Integrinen die haptotaktische Zellmigration zu extrazellulären Matrixproteinen (Holm *et al*., 1996; Hillenbrand *et al*., 1999; Buhusi *et al*., 2003) Des Weiteren wurde festgestellt, dass CHL1 unter anderem die Bildung von inhibitorischen Synapsen im Hippocampus beeinflusst (Nikonenko *et al*., 2006), gebietsspezifisch die Positionierung von Pyramidenzellen im Neokortex mitreguliert (Demyanenko *et al*., 2004) und im Zusammenspiel mit dem Semaphorin 3A Rezeptor, Neuropilin 1, für die Wegleitung von entstehenden thalamocorticalen Projectionsbahnen mitverantwortlich ist (Wright *et al*., 2007) (siehe Kapitel 1.3.2).

Das Expressionsmuster und die funktionellen Eigenschaften von CHL1, sowie die Beobachtungen an CHL1-Knockout-Mäusen (CHL1-/- Mäuse) (siehe Kapitel 1.3.2) und der

wahrscheinliche Zusammenhang von Mutationen des CHL1-Gens mit bestimmten neuropsychiatrischen Erkrankungen (siehe Kapitel 1.4), deuten auf eine wichtige Rolle des CHL1-Moleküls bei der Gehirnentwicklung hin.

Ebenfalls spielt CHL1 eine bedeutende Rolle im verletzten Nervengewebe. In einer Studie wurde nach Quetschungsverletzungen an bestimmten Nerven eine auffällige Hochregulation der CHL1-Expression in Schwannzellen und sensorischen Neuronen beobachtet (Zhang *et al.*, 2000). Auch einige adulte Neurone des ZNS (aus Hirnstamm, Cerebellum und Thalamus) steigern ihre CHL1-Expression, wenn ein peripherer Nerv in die Umgebung transplantiert wird und somit ihre Axone zum Auswachsen anregt (Chaisuksunt *et al.*, 2000 a,b.). Überraschenderweise zeigt eine erst kürzlich durchgeführte Studie, dass sich die CHL1-/- Mäuse nach Kompression des Rückenmarks besser funktionell erholen als die Wildtypmäuse. In Wildtypmäusen wird die Genesung durch die verstärkte CHL1-Expression in GFAP-positiven Astrozyten, die zur Narbenbildung anregt, unterdrückt. (Jakovcevski *et al.*, 2007).

1.3 L1 und CHL1 Knockout-Mäuse

Um einen weiteren Einblick in die Funktionen der Moleküle L1 und CHL1 zu bekommen, wurden L1- und CHL1-Knockout-Mäuse gezüchtet. Mit diesen Mäusen können nicht nur die einzelnen biologischen Mechanismen der Moleküle besser verstanden werden, sondern es wird mit ihnen auch ein geeignetes Modell für entsprechende menschliche Gendefekte geschaffen.

1.3.1 L1

Der Phänotyp zweier unabhängigen Züchtungen von L1-Knockout-Mäusen (L1-/- Mäusen) wurde von drei verschiedenen Forschergruppen analysiert (Cohen *et al.*, 1998; Dahme *et al.*, 1997; Fransen *et al.*, 1998) Die Veränderungen in den Mutanten stimmen zum großen Teil mit den pathologischen Charakteristika der L1-Erkrankung beim Menschen überein.

In den L1-/- Mäusen ist die grundlegende Morphologie der meisten Hirnregionen unverändert. Die Mäuse sind jedoch kleiner, meistens unfruchtbar und in ihrer Lebensfähigkeit beeinträchtigt. Auffällig sind die vergrößerten Ventrikel (Fransen *et al.*, 1998) und die drastischen Malformationen des kortikospinalen Traktes (Cohen *et al.*, 1998). Des Weiteren haben die L1-/- Mäuse weniger Kraft in den Hinterbeinen (Dahme *et al.*, 1997), zeigen Defizite im räumlichen Gedächtnis (Fransen *et al.*, 1998) und reagieren weniger empfindlich auf Hitzereize (Thelin *et al.*, 2003). Elektrophysiologische Studien an inhibitorischen

hippocampalen Neuronen zeigten eine normale LTP (Bliss *et al.*, 2000), aber eine veränderte GABAerge Transmission bei L1-/- Mäusen (Saghatelyan *et al*., 2004).

Im motorischen, somatosensorischen und visuellen Kortex der L1-/- Maus stellen sich die apikalen Dendriten der fünften kortikalen Schicht in einem wellenförmigen, kürzeren Verlauf dar und erreichen nicht die erste kortikale Schicht. Der Hippocampus ist kleiner und enthält weniger Pyramiden- und Körnerzellen. Auch der Corpus callosum ist in seiner Größe reduziert, da viele callosale Axone nicht über die Mittellinie kreuzen (Demyanenko *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen bestätigen die wichtige Bedeutung des L1-Moleküls bei Prozessen wie der axonalen Wegfindung, sowie dem Überleben und der Migration von Nervenzellen.

Während eines Versuches mit cerebellären Neuronen aus L1-/- Mäusen ließ sich auf einem L1-Trägermaterial ein geringeres Auswachsen von Neuriten *in vitro* beobachten. Dieses Ergebnis zeigt, dass normalerweise L1 durch homophile Interaktionen das Auswachsen von Neuriten fördert (Dahme *et al*., 1997).

In L1-/- Mäusen stellt sich der cerebelläre Vermis hypoplastisch dar. Vermutlich spielt L1 eine wichtige Rolle bei der Migration und Lenkung von Nervenzellen während der Entwicklung des Vermis (Fransen *et al*., 1998). Die Zytoarchitektur des cerebellären Kortex ist jedoch unverändert (Dahme *et al*., 1997; Fransen *et al.*, 1998).

Weitere Untersuchungen stellten eine reduzierte Prepuls-Inhibition (PPI; siehe auch Kapitel 1.3.2) bei L1-/- Mäusen fest und bestätigten sie damit als ein geeignetes Modell für bestimmte neuropsychiatrische Erkrankungen, bei denen die Eingangskontrolle über sensorische Signale eingeschränkt ist (Irintchev *et al*., 2004).

1.3.2 CHL1

Bei CHL1-/- Mäusen ist die grundlegende Morphologie der meisten Gehirnregionen, wie Thalamus, Kleinhirn, Hauptfasertrakte und Retina, unverändert. Zudem sind die CHL1-/- Mäuse fruchtbar, haben eine normale Lebenserwartung und zeigen keine offensichtlichen Einschränkungen in ihren sensorischen Funktionen, Reflexen und grobmotorischen Fähigkeiten (Montag-Sallaz *et al*., 2002).

Bis jetzt sind folgende Abnormalitäten durch die Entfernung des CHL1-Gens festgestellt worden: Im Hippocampus weisen die Bahnen der Moosfasern innerhalb der CA3-Region (Cornu Ammonis) einen abnormen Verlauf auf. Veränderungen dieser neuronalen Verschaltungen könnten die Verarbeitung von räumlichen Informationen beeinträchtigen und damit das abweichende Erkundungsverhalten der CHL1-/- Mäuse erklären (Montag-Sallaz

et al., 2002). Auch die Axone im Riechkolben zeigen abnorme Verläufe und Verbindungen (Montag-Sallaz *et al*., 2002).

Grobmorphologisch ist bei CHL1-/- Mäusen nur eine Vergrößerung der Ventrikel auffällig (Montag-Sallaz *et al*., 2002).

Eine aktuelle Studie zeigt, dass auch die thalamokortikalen Projektionsbahnen in CHL1-/- Mäusen abnorm verlaufen. Die somatosensorischen Axone, die normalerweise vom Thalamus zum ventralen Telencephalon verlaufen, sind in den CHL1-/- Mäusen zum visuellen Kortex gerichtet. Dieses Phänomen ist auch bei Knockout-Mäusen vorzufinden, denen der Semaphorin 3A-Rezeptor (Sema3A) Neuropilin 1 (Npn 1) fehlt, und lässt daher auf eine Zusammenspiel von Npn 1 und CHL1 schließen. Die Axone werden vermutlich fehlgeleitet, weil sie in den Knockout-Mäusen auf bestimmte Signalstoffe, wie Sema3A, im ventralen Telencephalon nicht mehr ausreichend reagieren. Diese Signalstoffe lösen normalerweise Reize aus, durch die die Axone zu ihrem Bestimmungsort hingelenkt werden. CHL1 scheint also die Ansprechbarkeit der Axone auf bestimmte lenkende Signalstoffe zu beeinflussen und ist im Zusammenspiel mit Neuropilin 1 bedeutend für eine korrekte Wegleitung der sich entwickelnden thalamokortikalen Projektionsbahnen (Wright et al., 2007)

Im Riechkolben, Kortex, Hippocampus und Corpus amygdaloideum von CHL1-/- Mäusen lässt sich eine signifikante Hochregulation des Moleküls NCAM180 beobachten, wobei die Expression anderer Zelladhäsionsmoleküle unverändert bleibt. Dieses Phänomen könnte als Kompensationsmechanismus auf den CHL1-Mangel gedeutet werden und lässt ähnliche Funktionen der Moleküle CHL1 und NCAM vermuten (Montag-Sallaz *et al.*, 2002).

In einer weiteren Studie wurde bei CHL1-/- Mäusen eine abnorme Verteilung von Pyramidenzellen in den neokortikalen Schichten festgestellt (Demyanenko *et al*., 2004). Am auffälligsten sind die Veränderungen im sekundären visuellen Kortex, einer Region, in der CHL1 auf höchstem Level während der embryonalen Entwicklung exprimiert wird. Viele Pyramidenzellen sind von der fünften in die vierte kortikale Schicht verschoben und zeigen abnorm orientierte apikale Dendriten, die seitenverkehrt gebaut sind oder in die umgekehrte Richtung zur ventrikulären Zone weisen. Im somatosensorischen Kortex weisen die apikalen Dendriten eine wellige Form auf, die Pyramidenzellen sind jedoch nicht verschoben. In Regionen sehr geringer CHL1-Expression, wie dem motorischen Kortex, sind keine veränderten oder verschobenen Pyramidenzellen zu finden. Möglicherweise stehen diese Abnormalitäten im Zusammenhang mit einer verlangsamten Migration der neuronalen Vorläuferzellen, die für die fünfte und sechste kortikale Schicht bestimmt sind. Die Migrationsgeschwindigkeit von CHL1-defizienten Neuronen ist um ¾ reduziert im Vergleich zu Neuronen der Wildtypmaus.

Aufgrund der verzögerten Migration sammeln sich die Neurone in der intermediären und ventrikulären Zone an. Wahrscheinlich sind diese fehlerhaften Vorgänge auf eine verminderte Adhäsionsfähigkeit der Neurone an die Radialglia zurückzuführen (Demyanenko *et al*., 2004).

In einer Studie an drei Wochen alten CHL1+/+ und CHL1-/- Mäusen wurde festgestellt, dass CHL1 die Regulation von inhibitorischen Synapsen und Anzahl von Interneuronen beeinflusst. Bei CHL1-/- Mäusen ist die LTP in den exitatorischen CA3-CA1-Synapsen reduziert, da eine verstärkte Hemmung durch perisomatisch projizierende Interneuronen stattfindet. Die reduzierte LTP kann durch einen GABA-Antagonisten wieder normalisiert werden (Nikonenko *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu der geringeren Hemmung in L1-/- Mäusen und lassen auf unterschiedliche Funktionen dieser beiden Moleküle schließen. Bei CHL1-/- Mäusen in einem Alter von zwei bis drei Monaten hat sich jedoch die LTP in den CA3-CA1-Synapsen wieder normalisiert. Scheinbar wird im Laufe der postnatalen Entwicklung die beschleunigte Reifung des GABAergen Systems gebremst oder andere Kompensationsmechanismen reduzieren die perisomatische Hemmung auf CA1-Pyramidenzellen (Morellini *et al.*, 2006).

Erst kürzlich stellte sich heraus, dass die „prepulse inhibition“ (PPI) bei CHL1-/- Mäusen beeinträchtigt ist (Irintchev *et al*., 2004). Die PPI von akustischen Schreckreaktionen gilt als ein Maß für die Fähigkeit, sensorische Eingangssignale kontrollieren zu können (van den Buuse *et al*., 2003). Da diese Fähigkeit auch bei einigen neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Schizophrenie, gestört ist, können CHL1-/- Mäuse als geeignete Modelle in der neuropsychiatrischen Forschung dienen. Daher wurden in weiteren Versuchen CHL1-/- Mäuse nach Verhaltensauffälligkeiten untersucht, die auch bei Patienten mit bestimmten psychiatrischen Erkrankungen zu beobachten sind. Mehrere Studien konnten übereinstimmend keine Veränderungen im Angstverhalten feststellen (Montag-Sallaz *et al*., 2002; Pratte *et al*., 2003; Frints *et al*., 2003; Morellini *et al*., 2006). Auch die kognitiven, motorischen und olfaktorischen Fähigkeiten sind in CHL1-/- Mäusen weitestgehend normal (Morellini *et al.*, 2006). Am auffälligsten ist bei CHL1-/- Mäusen die reduzierte Reaktionsfreudigkeit auf neuartige Umweltreize und die verzögerte Erwiderung von sozialen Reizen, wie Markierungen eines Wohnareals durch Urin oder Eindringen eines Gebietsfremden. Ebenfalls verändert sind die sozialen Präferenzen, da die CHL1-/- Mäuse geringeres Interesse an fremdartigen Artgenossen zeigen als die CHL1 +/+ Mäuse (Morellini *et al*., 2006). Vermutlich wird dieses Verhalten durch eine geringere Aufmerksamkeit oder eingeschränkte Fähigkeit verursacht, äußere Reize angemessen zu selektieren und verarbeiten zu können. Als mögliche Erklärung betrachtet man die erhöhte basale synaptische Aktivität in den Projektionen des entorhinalen

Cortex zum Gyrus Dentatus, im sogenannten „Perforant Pathway“, in zwei bis drei Monate alten CHL1-/- Mäusen. Diese Bahnen sind wichtig für die Verarbeitung von kortikalen Informationen und eine erhöhte basale Aktivität verhindert möglicherweise die isolierte Wahrnehmung wichtiger Informationen vom Kortex. Wenn diese Informationen nicht selektiert werden können, sind die Mäuse nicht in der Lage adäquat auf externe Reize zu reagieren (Morellini *et al*., 2006).

In einer vorausgehenden Studie, in der CHL1-/- Mäuse mit Gebietsfremden konfrontiert wurden, beschrieben die Forscher das Verhalten der Mutanten als weniger aggressiv und kontaktfreudiger (Frints *et al*., 2003). Dieses kontaktfreudigere Verhalten steht jedoch im Gegensatz zu den oben beschriebenen späteren Versuchen, in denen sich ein geringeres Interesse an fremdartigen Artgenossen feststellen ließ (Morellini *et al*., 2006).

Bereits in einer früheren Studie konnte im „Open-Field-Test“ beobachtet werden, dass sich die CHL1-/- Mäuse länger im Zentrum des Testfeldes aufhielten. Dieses Phänomen wurde von den Forschern als ein verändertes Erkundungsverhalten beschrieben (Montag-Sallaz *et al*., 2002), welches in Übereinstimmung steht mit den Beobachtungen aus der aktuellen Studie von Morellini (s.o.) und möglicherweise durch sie erklärt werden kann.

1.4 CHL1 und L1 assoziierte Erkrankungen im Menschen

Im Menschen werden die Zelladhäsionsmoleküle CHL1 und L1 in Zusammenhang gebracht mit Intelligenz und Kognition.

Mentale Retardierung ist ein Hauptsymptom der L1-Erkrankung, die durch Mutationen im L1-Gen auf dem X-Chromosom hervorgerufen wird (Weller *et al*., 2001). Die L1-Erkrankung ist sehr komplex und verursacht unter anderem Spastizität, Corpus Callosum Agenesie und optische Atrophie (Kenwrick *et al*., 2000).

Auch für das 3p-Syndrom ist mentale Retardierung charakteristisch. Bei dieser Erkrankung fehlt ein Teil des kurzen Armes von Chromosom 3. Da sich das CHL1-Gen auf dem Chromosom 3p26.1 befindet, ist es bei Patienten mit dem 3p-Syndrom nicht mehr vorhanden. Von dem Verlust sind allerdings mehrere Gene betroffen, wodurch ein komplexes Krankheitsbild entsteht. Vermutlich wird die mentale Retardierung neben der Deletion der Gene CNTN4 und CRBN auch durch die Deletion des CHL1-Gens mitverursacht (Angeloni *et al*., 1999; Higgins et al., 2000; Frints *et al*., 2003; Dijkhuizen *et al*., 2006) Weitere Symptome der Erkrankten sind unter anderem eine verzögerte sprachliche und motorische Entwicklung.

Möglicherweise spielt CHL1 auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Schizophrenie. Japanischer Forscher entdeckten im CHL1-Gen von schizophrenen Patienten einen „missense“-Polymorphismus (Leu17Phe) (Sakurai *et al.*, 2002), der durch weitere Studien bestätigt wurde (Chen *et al.*, 2004). Verhaltensstudien an CHL1-/- Mäusen deckten Auffälligkeiten auf, die mit den Symptomen von schizophrenen Patienten übereinstimmen, wie zum Beispiel Defizite in der Aufmerksamkeit oder eine reduzierte Erwiderung von sozialen Reizen, die bei schizophrenen Patienten vor allem während der Negativsymptomatik ausgeprägt sind (Morellini *et al.*, 2006).

2. GRÜNDE UND ZIELE DER STUDIE

CHL1 ist wichtig für die korrekte embryonale und postnatale Entwicklung vieler Gehirnregionen und spielt vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen. Bei CHL1-/- Mäusen konnten bereits vielfältige morphologische Veränderungen einiger Gehirnregionen ausfindig gemacht werden. Zudem hat sich ein auffälliges Verhalten für die Mutanten als charakteristisch erwiesen.

Um den Einblick in die Bedeutung des CHL1-Moleküls zu vertiefen, sollen in dieser Arbeit weitere Gehirnregionen von CHL1-/- Mäusen analysiert werden: das Kleinhirn und der visuelle Kortex.

Das Kleinhirn stellt hierbei eine besonders interessante Region dar. Die Funktionsweise dieser Gehirnregion ist zum Teil noch unbekannt. In letzter Zeit sammeln sich immer mehr Beweise für einen Einfluss des Kleinhirns nicht nur auf die Motorik, sondern auch auf die Verarbeitung von sensorischen, kognitiven und emotionalen Informationen. Daher könnte es bei fehlerhafter Entwicklung mit der Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen im Zusammenhang stehen. Das Molekül CHL1 wird im Kleinhirn auch während der postnatalen Entwicklung auf einem relativ hohen Level und in einem charakteristischen Muster exprimiert. Fraglich ist bisher die genaue Rolle des Moleküls für diese Gehirnregion.

Auch für den visuellen Kortex scheint CHL1 von besonderer Bedeutung zu sein. Eine vorausgehende Studie zeigt, dass das CHL1-Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung von Mäusen einen ansteigenden rostro-caudalen Gradienten aufweist, wobei die höchste Expressionsrate über dem visuellen Kortex liegt. In CHL1-/- Mäusen sind die Pyramidenzellen dieser Region verschoben und weisen abnorm orientierte Dendriten auf.

In Anbetracht dieser Ergebnisse stellt sich die Frage nach weiteren Auswirkungen des CHL1-Moleküls auf diese Gehirnregionen.

Das Ziel dieser Studie ist es herauszufinden, ob in zwei Monate alten Mäusen:

1. die CHL1 Ablation eine Veränderung der kortikalen Dicke im Kleinhirn und visuellen Kortex verursacht;

2. die Größe der Hauptzellpopulationen im Kleinhirn und visuellen Kortex durch die Abwesenheit von CHL1 verändert ist

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Tiere

In dieser Studie wurden sechs Wildtypmäuse (CHL1+/+ Mäuse) und sechs CHL1-defiziente Mäuse (CHL1-/- Mäuse) in einem Alter von 2 Monaten untersucht. Die CHL1-defizienten Tiere stammten von einem heterozygoten Zuchtpärchen ab (gemischt C57BL/6J x 129la genetischer Hintergrund, fünf Rückkreuzungen zu C57BL/6J) und wurden in der SPF (spezifisch pathogenfreien Einrichtung) des Universitätsklinikums Hamburg gezüchtet. Die Tiere wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz behandelt. Die Analysen wurden bezüglich des Genotyps blind durchgeführt. Die Ausführung der unten beschriebenen technischen Verfahren fand in Übereinstimmung mit Irintchev *et al.* (2005) statt.

3.2 Vorbereitung des Gewebes für die Schnitte

Die Mäuse wurden gewogen und mit einer Pentobarbital-Natrium-Lösung (16%) anästhesiert (Narcoren, Merial, Hallbergmoos, 5ml g^{-1} Körpergewicht, i.p.). Nach Wirkungseintritt des Betäubungsmittels wurden die Tiere transkardiell mit einer physiologischen Kochsalzlösung für 60 Sekunden perfundiert. Anschließend wurden sie auf die gleiche Weise mit einer Fixationslösung (4% Formaldehyd und 0,1% $CaCl_2$ in 0.1M Cacodylatepuffer, pH 7,3) für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) perfundiert. Vor der Entnahme wurden die Gehirne bei RT für 2 Stunden *in situ* belassen, um mögliche Fixationsartefakte zu vermeiden. Anschließend fand über Nacht eine Nachfixierung mit einer Dauer von 18-20 Stunden bei 4°C in der Formaldehydlösung statt, gefolgt von einer Tränkung der Gehirne für zwei Tage in einer 15% Saccharose in 0,1M Kakodylat-Puffer (pH 7,3) bei 4°C.

Die fixierten Gehirne wurden vorsichtig unter einem Stereomikroskop untersucht, wobei Haare, Reste der Dura mater und andere Geweberückstände mit einer feinen Pinzette entfernt wurden. Nach der Säuberung wurden die Gehirne in eine Mäusegehirnmatrix (World Precision Instruments, Berlin) gelegt und das caudale Ende auf einer klar definierten Höhe (1 mm von der caudalsten Kerbe der Matrix entfernt) abgetrennt. Schließlich wurden die Gehirne eingefroren, indem sie im Kryostat für zwei Minuten in vorgekühltes (-30°C) 2-Methyl-Butan (Isopentan) getaucht wurden. Bis zur Herstellung der Schnitte wurden die Gehirne in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3 Anfertigung der Kryostat-Schnitte

Für die Schnittanfertigung wurde das caudale Ende der Gehirne durch einen Tropfen destilliertes Wasser auf einem Kryostat-Halter befestigt. Die ventrale Oberfläche der Gehirne zeigte dabei in Richtung des Kryostat-Messers, mit dem eine Reihe von 25 µm dicken coronalen Schnitten in einer Richtung von caudal nach rostral angefertigt wurden (Kryostat Leica CM3050, Leica Instruments, Nußloch, Deutschland). Die Schnitte wurden auf Glasobjekträger (Superfrost Plus) gebracht (Roth, Karlsuhe, Deutschland). Dabei wurde die Anordnung der Schnitte in einer standardisierten Abfolge durchgeführt, so dass sich vier Schnitte, die je 250 µm voneinander entfernt waren, auf einem Objektträger befanden.

3.4 Stereologische Analysen von immunhistochemisch identifizierten Zelltypen

3.4.1 Antikörper

Die Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden, können spezifische, zellmarkierende Antigene erkennen, die von den zu bestimmenden Zellpopulationen exprimiert werden (Irintchev *et al*., 2005). Es handelt sich um Antikörper gegen die folgenden Antigene:

- **NeuN** (*Neuron-specific nuclear antigen*) ist ein Protein unbekannter Funktion, das in allen Nervenzellen im adulten Gehirn vorhanden ist, mit Ausnahme von ein paar wenigen Zelltypen, die jedoch nicht in der Molekular- und Körnerzellschicht des Kleinhirns oder im Neokortex zu finden sind (Purkinje-, Mitral- und Photoorezeptorzellen, Wolf *et al.*, 1996).
- **PV** (Parvalbumin) ist ein calciumbindendes Protein mit niedrigem molekularen Gewicht, das von den meisten Hauptsubpopulationen GABAerger Nervenzellen exprimiert wird.
- **S100B** ist ein calciumbindendes Protein mit niedrigem molekularen Gewicht, das in Astrozyten exprimiert wird.
- **CNPase** (2',3'-zyklische-Nukleotid 3'-Phosphodiesterase) ist ein Enzym, das nur auf Zellen vorhanden ist, die Myelin synthetisieren (Oligodendrozyten oder Schwann-Zellen).
- **Iba1** ist ein Makrophagen/Mikroglia-spezifisches calciumbindendes Protein, das beteiligt ist bei der Aktivierung von ruhenden Mikrogliazellen (Imai und Kohsaka, 2002).

- **Neurogranin** ist ein calciumbindendes Protein, das erst während der postnatalen Entwicklung von einigen Nervenzellen des Gehirns exprimiert wird (u.a. von den Golgi-Interneuronen).

Detaillierte Informationen über die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 1 (siehe Anhang) aufgeführt.

3.4.2 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach der Beschreibung von Irintchev *et al.* (2005) ausgeführt. Zu Beginn wurden die 25 µm dicken Schnitte bei –20 °C gelagert und für 30 Minuten bei 37 °C luftgetrocknet. Es folgte eine Antigendemaskierung in einer Glasküvette mit 10 mM Natriumcitrat-Lösung (pH 9,0) für 30 Minuten bei 80°C (Jiao *et al.*, 1999). Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Dafür wurden die Schnitte eine Stunde lang bei RT in einer Phosphatpuffer-Lösung (PBS, pH 7,3) inkubiert. Diese PBS-Lösung enthielt 0,2% Triton X-100 (Fluka, Buchs, Deutschland), 0.02% Natriumazid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5% normales Ziegenserum (Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova, Hamburg, Deutschland).

Nach der Blockierung wurden die Schnitte drei Tage lang bei 4°C in einer Kunststoffküvette mit Schraubverschluss mit dem primären Antikörper inkubiert. Der primäre Antikörper war hierbei in einer PBS-Lösung mit 0,5% Lambda-Carrageenan (Sigma) und 0.02% w/v Natriumazid aufgelöst. Vor der Behandlung mit dem sekundären Antikörper wurden die Schnitte dreimal in PBS für je 15 Minuten gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:200 in PBS-Carrageenan) dauerte bei RT 2 Stunden. Als Antikörper wurden Ziege-anti-Kaninchen oder Ziege-anti-Maus-IgG verwendet, die mit Cy3 gekoppelt sind (Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte wieder in PBS gewaschen und dann für 10 Minuten bei RT in eine Bisbenzimidlösung gegeben, um die Zellkerne zu färben (Bisbenzimid oder Farbstoff Hoechst 33258, Sigma, 5 µg/ml in PBS). Zum Schluss wurden die Schnitte nochmals gewaschen, dann mit Flouromount G (Southern Biotechnology Associates, Biozol, Eching, Deutschland) unter Deckgläsern eingebettet und bei 4°C in Dunkelheit gelagert.

Für jedes Antigen wurde die Spezifität der Färbung getestet, indem in einer Kontroll-Färbung der primäre Antikörper ausgelassen oder durch verschiedene Konzentration von normalen Serum oder IgG ersetzt wurde. In dieser Studie sind alle Kontrollen negativ gewesen.

Die Morphologie der gefärbten Zellen zeigte sich charakteristisch für den Zelltyp, der erwartungsgemäß gefärbt werden sollte (siehe Abb. 3 und 4).

3.4.3 Stereologische Analysen

Für die Ermittlung der Zelldichten wurde das Prinzip des optische Disectors angewendet (Irintchev *et al*., 2005). Dabei wurden in relativ dicken Schnitten (25-50 µm) unter dem Mikroskop die Zellen direkt dreidimensional gezählt. Um den Gewebeschnitt systematisch untersuchen zu können, wurde ein Lichtgitter auf den zu zählenden Bereich unter dem Mikroskop projiziert, das den Schnitt optisch „zergliederte". Durch das Lichtgitter und die verschiedenen Fokussierungseben des Mikroskops in der Tiefe konnten dreidimensionale Räume („Disectoren") in gleichmäßigen Abständen in dem zu zählenden Bereich definiert werden. Dabei wurde die Basis des Disectors (Dimension in der x/y Ebene) durch die Größe eines Gitterquadrates definiert. Die Höhe des Disectors entsprach einem Anteil der Schnittdicke und wurde durch zwei Brennpunktebenen in der z-Achse mit einem Abstand von x µm festgelegt. Diese Parameter ließen sich über die Bewegungen des Mikroskoptisches in der z-Achse messen.

Die Zählung der Zellen innerhalb jedes Disectors fand nach folgenden stereologischen Regeln statt: Alle Zellen, die sich vollständig innerhalb des Disectors befanden, und Zellen, die von den „Akzeptanz-Ebenen" angeschnitten wurden oder sie berührten, mussten gezählt werden. Wenn die Objekte von den „Verboten-Ebenen" angeschnitten oder berührt wurden, durften sie nicht mitgezählt werden (Howard und Reed, 1998).

Die Zählungen der Zellen wurden an einem Axioskop Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt, das mit einem motorisierten Tisch und dem Neurolucida Computersystem (MicroBrightField, Colchester, VT) ausgerüstet war. Die Schnitte des Kleinhirns und visuellen Kortex wurden bei einer geringen Vergrößerung (10 x Objektiv) mit einem 365/420 nm Exzitations- /Emmissionsfilter betrachtet (01, Zeiss, blaue Fluoreszenz). Dabei ließen sich mit der Kernfärbung die Strukturen und Gebiete der Gehirnabschnitte gut erkennen und konnten mit der Neurolucida-Software abgegrenzt werden (Irintchev *et al*., 2005).

In den Kleinhirnschnitten wurden in der Regel zwei kortikale Felder in der vermalen Zone pro Gewebeschnitt bei direkter Betrachtung unter dem Mikroskop abgegrenzt, eines im caudalsten Folium des Schnittes und eines im dritten Folium rostral vom ersten Folium entfernt. Diese kortikalen Felder grenzten entweder die innere Körnerzellschicht oder die Molekular- und Purkinjezellschicht ein, wobei die Gebiete ein Ausmaß von etwa 600 µm auf beiden Seiten der Sagittalebene aufwiesen.

Im sekundären visuellen Kortex wurden die gesamten kortikalen Schichten, bis auf die Molekularschicht (Schicht I), gemeinsam eingegrenzt. In jedem Gewebeschnitt wurde ein Referenzpunkt auf einen arbiträren Ort eingestellt. Folglich wurde im Gesichtsfeld des Mikroskops ein aufliegendes Lichtgitter projiziert, dessen Linien in regelmäßigen Abständen

Gebiete von 30 x 30 µm (in der Körnerzellschicht des Kleinhirns) oder 60 x 60 µm (in allen anderen Gebieten) abgrenzten. Die Umrisse der relevanten Gebiete wurden mit dem Cursor festgelegt. Anschließend wurde jedes vierte Quadrat (bei 30 x 30 µm) oder jedes dritte Quadrat (bei 60 x 60 µm) innerhalb der eingegrenzten Gebiete mit einem Symbol markiert, beginnend mit dem Quadrat, das am weitesten links oben lag. Es konnte ein Disector mit einer Höhe von 5 µm (Körnerzellschicht des Kleinhirns) oder 10 µm (alle anderen untersuchten Gebiete) ausgewählt werden, wenn die Eindringtiefe des Antikörpers eine eindeutige Erkennung der gefärbten Objekte innerhalb einer Tiefe von mindestens 15 µm ermöglichte. Im Anschluss wurden die Schnitte in der Zellfärbung mit einem 40x Objektiv und durch einen 546/590 nm Exzitations- /Emissionsfilter (15, Zeiss, rote Fluoreszenz) betrachtet, wobei nacheinander jeder markierte Disector untersucht wurde. Jede immunhistochemisch gefärbte Zelle, die sich vollständig in dem Disector befand oder die Akzeptanzebene berührte bzw. schnitt, wurde mit einem Symbol markiert. Die Identifizierung der zugehörigen Zellkerne fand durch wiederholt wechselnde Betrachtungen zwischen dem roten und blauen Filter und durch die verstellbare Fokussierungsebene statt. Dabei wurden Zell- und Kernfärbung verglichen und die Kerne konnten den entsprechenden Zellen zugeordnet werden. Jeder zugehörige Zellkern, der sich im Blickfeld hinter dem Sicherheitsabstand (Tiefe 0-2 µm ausgehend von der Schnittoberfläche) befand, dass heißt innerhalb 2 und 7 µm (Körnerzellschicht des Kleinhirns) oder 2 und 12 µm (alle anderen untersuchten Gebiete) unterhalb der Schnittoberfläche, wurde gezählt.

Es wurden in der Regel vier Schnitte pro Tier und Färbung ausgewertet. Abhängig vom Zelltyp wurden vier bis zwölf kortikale Felder in beiden Hemisphären analysiert.

Im Gegensatz zum visuellen Kortex konnten im cerebellären Kortex die Oligodendrozyten nicht quantifiziert werden. Aufgrund der hohen Dichte an Körnerzellen in der inneren Körnerzellschicht konnten die Zellkerne der Oligodendrozyten nicht von denen der Körnerzellen unterschieden werden. Dadurch war es schwierig einzuschätzen, ob Strukturen, die wie Zellkörper aussahen, auch tatsächlich CNPase-positive Somata waren und nicht ringförmige Strukturen, die durch Zellfortsätze gebildet wurden (Abb. 1F). Die ermittelten Daten wurden daher als unzuverlässig betrachtet und sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

3.4.4 Messung der Schichtdicke

Zur Berechnung der durchschnittlichen kortikalen Dicke vom Kleinhirn und visuellen Kortex wurde eine Fläche, die einem bestimmten Abschnitt des Kortex entsprach, in ein Verhältnis gesetzt mit der Länge dieser Fläche, die an die kortikale Oberfläche grenzte (Irintchev *et al.*, 2005).

3.4.5 Fotografische Dokumentation

Die fotografische Dokumentation wurde mit einem Axiophot 2 Mikroskop durchgeführt, das mit einer Digitalkamera (AxioCam HTC und Axio Vision Software, Zeiss) ausgestattet war. Die Bilder wurden bei höchster Auflösung (2300 x 2030 pixel, RGB) angefertigt und mit AdobePhotoshop 6.0 Software (Adobe System Inc., San Jose, California, USA) ausgewertet.

3.4.6 Statistische Analysen

Zum Vergleich der Mittelwerte wurde ein *t*-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Bei zwei oder mehr Messungen pro Parameter und Tier wurde der Mittelwert als repräsentativer Wert betrachtet. Der Freiheitsgrad ist für alle Vergleiche anhand der Anzahl der Tiere ermittelt worden. Der Schwellenwert für die Akzeptanz der Unterschiede zwischen den Gruppen betrug 5%. Alle Daten werden als Mittelwerte mit SEM („Standard Errors of Mean“) dargestellt.

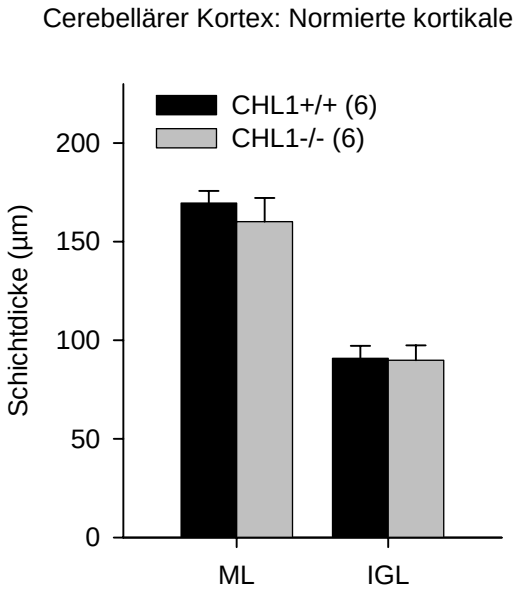
4. ERGEBNISSE

4.1 Kortikale Dicke

4.1.1 Kortikale Dicke des cerebellären Kortex

Die gemeinsame Dicke von Molekular- (ML) und Purkinjezellschicht (PL), sowie die Dicke der inneren Körnerzellschicht (IGL) ist in beiden Genotypen ähnlich (Abb. 1).

Diese Feststellung ist im Hinblick auf die Interpretationsfähigkeit der Ergebnisse bedeutend. Bei einer gleichen Dicke des Kortex in beiden Genotypen ist die Gesamtzellzahl in einer kortikalen Säule (Gewebevolumen unter 1 mm^2 kortikale Fläche) gleichermaßen proportional zur Zelldichte. In jeder Maus lässt sich somit von der gemessenen Zelldichte auf die



Gesamtzellzahl schließen.

Abbildung 1: Normierte Dicke des cerebellären Kortex (gemeinsame Dicke von Molekular- und Purkinjezellschicht, ML, sowie die Dicke der inneren Körnerzellschicht, IGL) in zwei Monate alten CHL1+/+ (schwarze Balken) und CHL1-/- (graue Balken) Mäusen. Gezeigt werden Mittelwerte + SEM. Die Anzahl an Tieren, die pro Gruppe untersucht wurden, ist in Klammern angegeben. ML – Molekularschicht, IGL – Innere Körnerzellschicht

4.1.2 Kortikale Dicke des visuellen Kortex

Auch für die kortikale Dicke des visuellen Kortex zeigen sich zwischen den beiden Genotypen keine bedeutenden Differenzen. Somit ist auch in dieser Region die Zellzahl pro Säule der Zelldichte in beiden Genotypen gleichermaßen proportional.

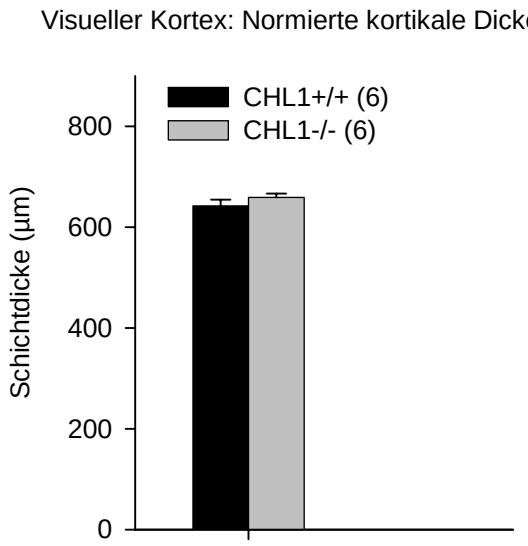


Abbildung 2: Normierte Dicke des visuellen Kortex (ausgenommen der Molekularschicht) in zwei Monate alten CHL1+/+ (schwarze Balken) und CHL1-/- (graue Balken) Mäusen. Gezeigt werden Mittelwerte + SEM. Die Anzahl an Tieren, die pro Gruppe untersucht wurden, ist in Klammern angegeben.

4.2 Immunhistochemische Färbungen

Um die Zelltypen zuverlässig quantifizieren zu können, wurden für jedes spezifische Antigen die Schnitte aus den zwei Versuchsgruppen (sechs CHL1-/- und sechs CHL1+/+ Mäuse) in der gleichen Antikörperlösung inkubiert. Die Antikörper wurden in dieser Lösung durch Lambda-Carrageenan und Natriumazid stabilisiert, um eine konstante Behandlung über längere Zeit sicherzustellen. (Sofroniew und Schrell, 1982; Irintchev *et al.*, 2004a). Auch in dieser Studie ließ sich diese Färbetechnik gut reproduzieren: Die Qualität der Färbung blieb über einen Zeitraum von mehreren Monaten für alle Objektträgergruppen konstant. Für die entsprechenden Antigene ließen sich keine qualitativen Unterschiede der Färbungen zwischen den CHL1+/+ und CHL1-/- Mäusen feststellen. Beispiele für die Qualität der einzelnen Färbungen sind in Abb. 3 (Kleinhirn) und in Abb. 4 (visueller Kortex) gezeigt.

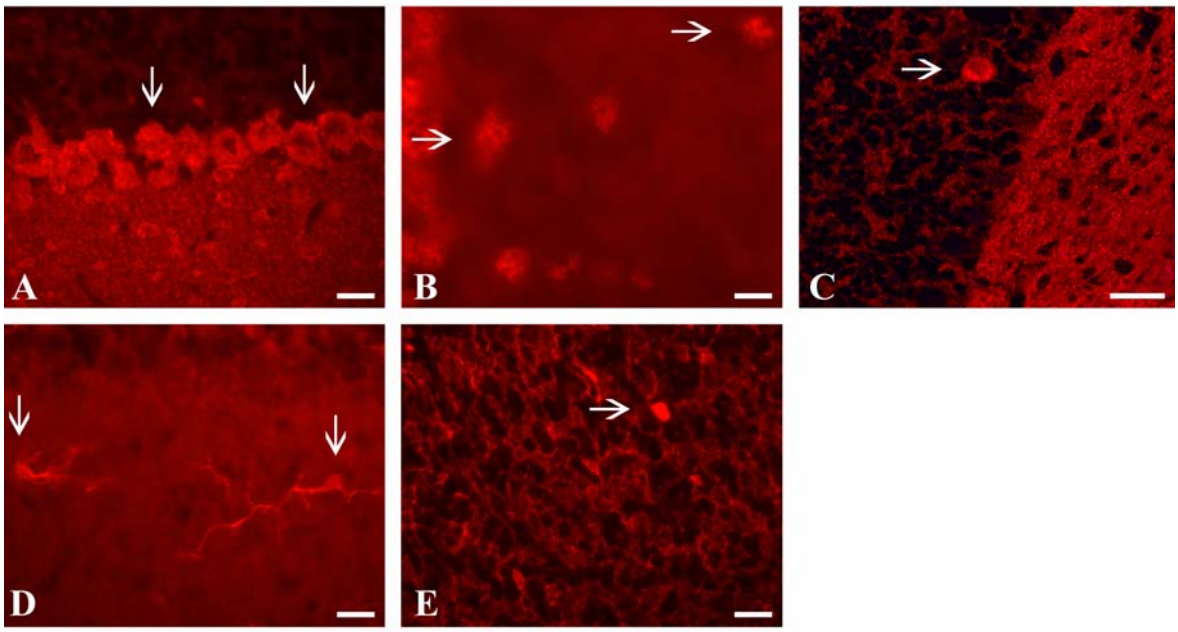


Abbildung 3 (Kleinhirn): Beispiele für die immunhistochemisch identifizierten Zelltypen (Pfeile) in Kryostat-Schnitten von zwei Monate alten CHL1+/+ Mäusen. (A) Purkinjezellen, dargestellt durch die Parvalbuminfärbung. (B) Interneurone der Molekularschicht (Korb- und Sternzellen), dargestellt durch die NeuN-Färbung. (C) Golgi-Interneurone in der Körnerzellschicht, dargestellt durch die Neurogranin-Färbung. (D) Mikroglia, dargestellt durch die Iba1-Färbung. (E) Astrozyten der Körnerzellschicht, dargestellt durch die S-100B-Färbung. Maßstab: 10 µm (A,C,D,E), 5 µm (B).

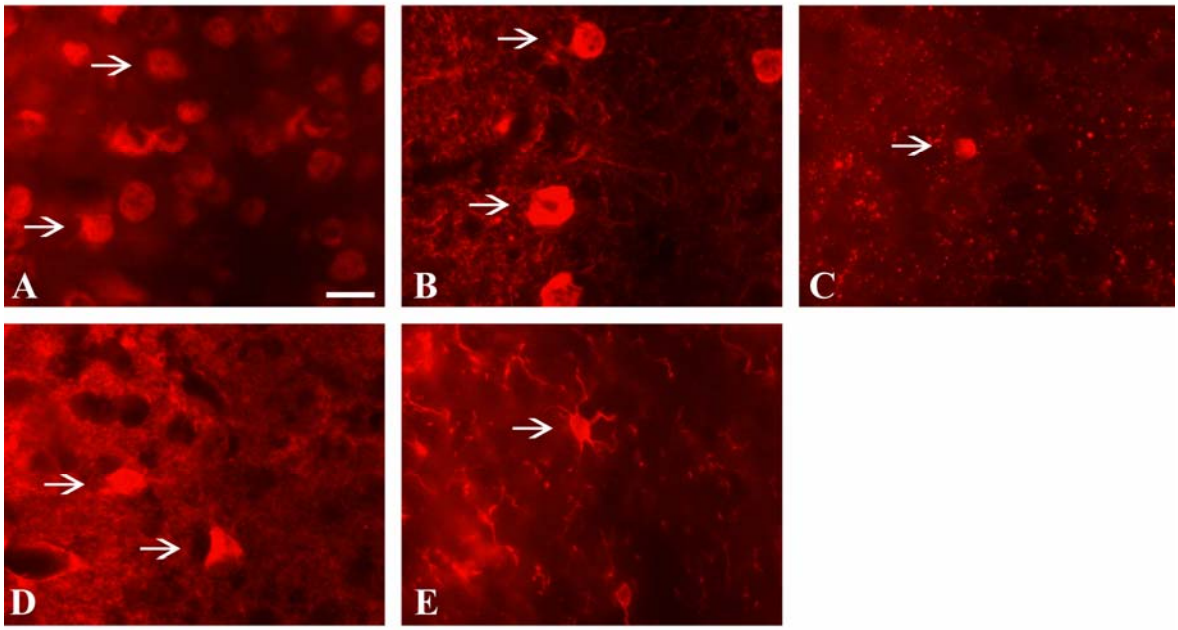


Abbildung 4 (visueller Kortex): Beispiele für die immunhistochemisch identifizierten Zelltypen (Pfeile) in Kryostat-Schnitten von zwei Monate alten CHL1+/+ Mäusen. (A) Interneurone und Pyramidenzellen dargestellt durch die NeuN-Färbung. (B) GABAerge Interneurone dargestellt durch die Parvalbuminfärbung. (C) Oligodendrozyten dargestellt durch die CNP-Färbung. (D) Astrozyten dargestellt durch die S-100B-Färbung. (E) Mikroglia, dargestellt durch die Iba1-Färbung. Maßstab: 20 µm

4.3 Stereologische Analysen des cerebellären Kortex

4.3.1 Nervenzellen des cerbellären Kortex

Die gemessene Zelldichte (numerische Dichte, Anzahl pro Volumeneinheit) der Purkinjezellen (Parvalbuminfärbung) ist in den CHL1-/- Mäusen um 20% niedriger im Vergleich zu den CHL1+/+ Mäusen. Die Dichte der Körnerzellen (NeuN-Färbung) ist in den CHL1-/- Mäusen um einen ähnlichen Anteil geringer (-23%) (Abb. 5). Hingegen zeigen sich für die Dichten von den Korb- und Sternzellen (NeuN+-Interneurone) keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Ebenso ist die Dichte von Golgi-Interneuronen (Neurogranin-Färbung) in beiden Genotypen gleich (Abb. 5). Somit ist in den CHL1-/- Mäusen das Verhältnis von Körnerzellen zu Purkinjezellen unverändert und das Verhältnis von NeuN+-Interneuronen zu Purkinjezellen steigt um 38% an (Abb. 5).

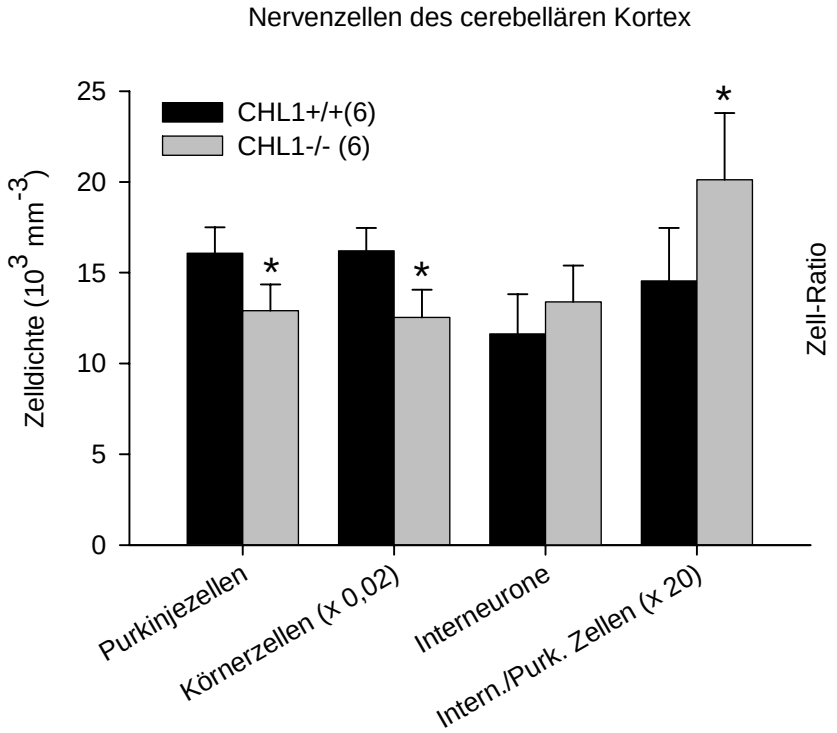


Abbildung 5: Zelldichten für verschiedene neuronale Populationen im Kleinhirn bei zwei Monate alten CHL1+/+ (schwarze Balken) und CHL1-/- (graue Balken) Mäusen. Gezeigt werden Mittelwerte +SEM der Zelldichten (Anzahl pro Volumen). Diese Zelltypen wurden identifiziert mit Antikörpern gegen Parvalbumin (Purkinjezellen), NeuN (Interneurone der Molekularschicht und Körnerzellen) und Neurogranin (Golgi-Interneurone). Ebenfalls wird das Verhältnis von Interneuronen der Molekularschicht (Korb- und Sternzellen) zu Purkinjezellen dargestellt. Der Asterisk zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten ($p < 0,05$, t test) der Gruppen an. Die Anzahl der Tiere, die pro Gruppe untersucht wurden, ist in der Abbildung in Klammern angegeben. Der Multiplikationsfaktor für die Angleichung einiger Werte an die Y-Achse ist an der X-Achse in Klammern angegeben. Inern. - Interneurone, Purk. - Purkinje

4.3.2 Gliazellen des cerebellären Kortex

Für die Dichten von Astrozyten (S-100B-Färbung) und Mikroglia (Iba1-Färbung) in der Molekular- (ML) und inneren Körnerzellschicht (IGL) zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Abb. 6).

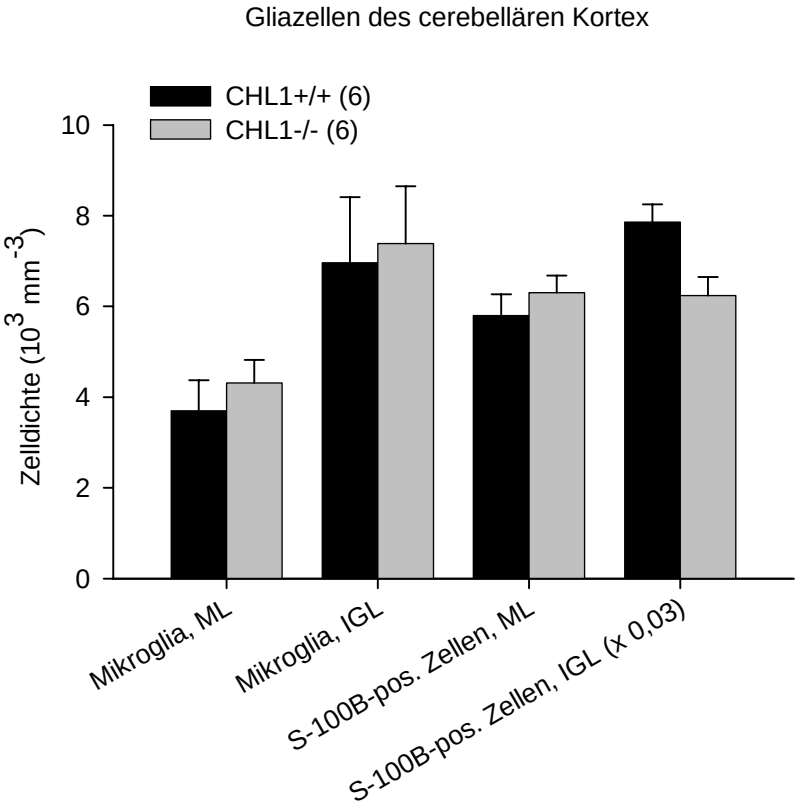


Abbildung 6: Dichte von Gliazellen im Kleinhirn bei zwei Monate alten CHL1+/+ (schwarze Balken) und CHL1-/- (graue Balken) Mäusen. Gezeigt werden Mittelwerte +SEM der Zelldichten (Anzahl pro Volumen). Diese Zelltypen wurden mit Antikörpern gegen S-100B (Astrozyten und Bergmannglia) und Iba1 (Mikroglia) identifiziert. Die Anzahl der Tiere, die pro Gruppe untersucht wurden, ist in der Abbildung in Klammern angegeben. ML - Molekularschicht, IGL - innere Körnerzellschicht

4.4 Stereologische Analysen des visuellen Kortex

4.4.1 Nervenzellen des visuellen Kortex

Im visuellen Kortex gibt es zwischen den beiden Genotypen keine signifikanten Differenzen bezüglich der neuronalen Zelldichten. Gemessen wurde die Dichte der PV^+-Interneurone und die gemeinsame Dichte aller Neurone des visuellen Kortex mit der NeuN-Färbung (Abb. 7).

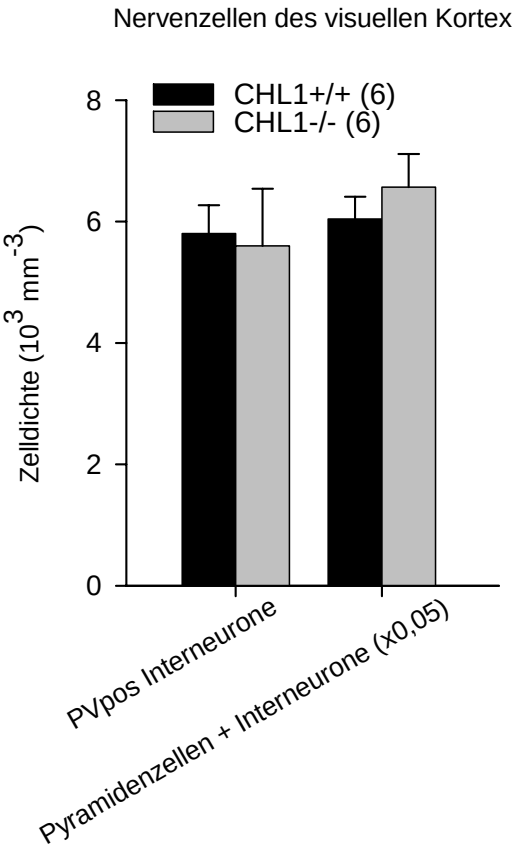


Abbildung 7: Neuronale Dichten im visuellen Kortex bei zwei Monate alten CHL1+/+ (schwarze Balken) und CHL1-/- (graue Balken) Mäusen. Gezeigt werden Mittelwerte +SEM der Zelldichten (Anzahl pro Volumen) von Zellen, die identifiziert wurden mit Antikörpern gegen Parvalbumin (GABAerge Interneurone) und NeuN (Pyramidenzellen und Interneurone). Die Anzahl der Tiere, die pro Gruppe untersucht wurden, ist in der Abbildung in Klammern angegeben. Der Multiplikationsfaktor für die Angleichung einiger Werte an die Y-Achse ist an der X-Achse in Klammern angegeben.

4.4.2 Gliazellen des visuellen Kortex

Die Gliazelldichten sind in beiden Genotypen gleich. Es wurden die Dichten von Mikroglia (Iba1-Färbung), Oligodendrozyten (CNP-Färbung) und Astrozyten (S-100B-Färbung) gemessen (Abb.8).

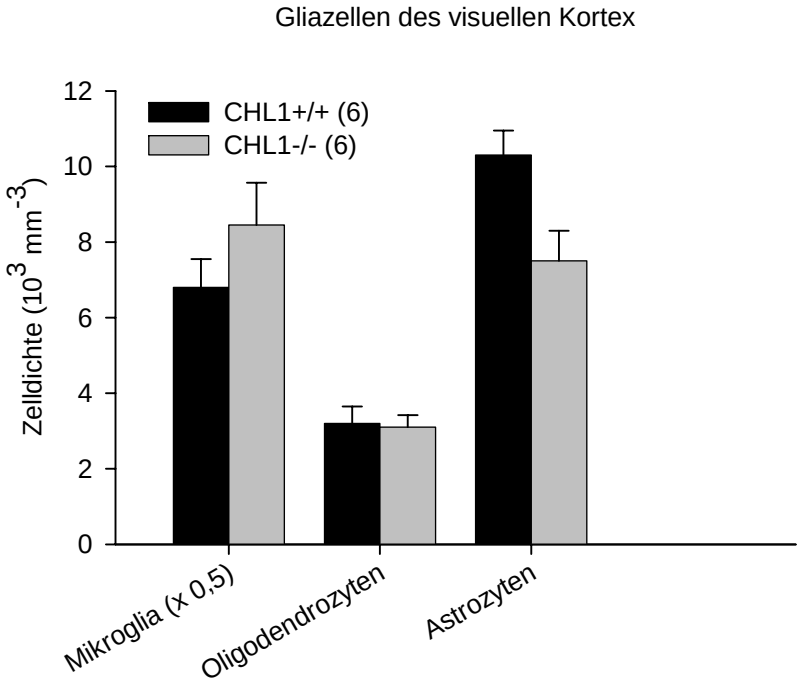


Abbildung 8: Dichten von Gliazellen im visuellen Kortex bei zwei Monate alten CHL1+/+ (schwarze Balken) und CHL1-/- (graue Balken) Mäusen. Gezeigt werden Mittelwerte +SEM der Zelldichten (Anzahl pro Volumen). Diese Zellen wurden mit Antikörpern gegen Iba1 (Mikroglia), S-100B (Astrozyten), CNPase (Oligodendrozyten) identifiziert. Die Anzahl der Tiere, die pro Gruppe untersucht wurden, ist in der Abbildung in Klammern angegeben. Der Multiplikationsfaktor für die Angleichung einiger Werte an die Y-Achse ist an der X-Achse in Klammern angegeben.

5. DISKUSSION

Diese Studie offenbart bisher unbekannte Bedeutungen des CHL1-Moleküls bezüglich der Größenbildung von Hauptzellpopulationen des Kleinhirns. Aus dem CHL1-Mangel ergibt sich eine verminderte Anzahl an Purkinje- und Körnerzellen im Kleinhirn der adulten Maus. Dabei folgt auf den anfänglichen Verlust von Purkinjezellen eine proportionale Reduktion der Körnerzellen. Im visuellen Kortex hingegen hat der CHL1-Mangel keine Auswirkungen auf die Größe der Hauptzellpopulationen. Ebenfalls ist die Dicke des cerebellären und des visuellen Kortex nicht durch den CHL1-Mangel verändert.

5.1 Cerebellärer Kortex

5.1.1 Kortikale Dicke des cerebellären Kortex

Eine vorausgegangene Studie zeigt, dass CHL1-/- Mäuse bis auf die vergrößerten lateralen Ventrikel keine erheblichen morphologischen Veränderungen der meisten Gehirnregionen aufweisen (Montag-Sallaz *et al.*, 2002). Auch ist kortikalen Dicke des visuellen Kortex in CHL1-/- Mäusen unverändert (diese Studie; siehe Kapitel 5.3.1). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde in dieser Studie eine gleiche kortikale Dicke des Kleinhirns in beiden Genotypen festgestellt. Die CHL1-Ablation scheint also die Dicke des cerebellären Kortex nicht zu beeinflussen. Dennoch stellt sich die Frage, weshalb sich trotz eines relativ hohen Verlustes an Purkinje- (-20%) und Körnerzellen (-23%) die kortikale Dicke nicht verringert. Möglicherweise kommt es kompensatorisch zu einer Vergrößerung des Dendritenbaumes der einzelnen Purkinjezellen (Jakovcevski *et al*., 2008).

Eine gleichbleibende kortikale Dicke ist jedoch im Hinblick auf die Interpretationsfähigkeit der Ergebnisse bedeutend. In jeder Maus lässt sich bei einer unveränderten kortikalen Dicke von der gemessenen Zelldichte auf die Gesamtzellzahl schließen.

5.1.2 Verlust von Purkinjezellen

Der Verlust von Purkinjezellen ließ sich bereits bei sieben Tage alten CHL1-/- Mäusen feststellen (Jakovcevski *et al*., 2008) und scheint sich bis zu einem Alter von zwei Monaten nicht mehr bedeutend zu verändern (diese Studie). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Abwesenheit des CHL1-Moleküls bereits in der ersten postnatalen Woche das Überleben der Purkinjezellen beeinflusst und bei älteren Mäusen im Alter von zwei Monaten keine weiteren Auswirkungen auf die Größe der Purkinjezellpopulation hat. Damit findet das Absterben der Purkinjezellen deutlich vor dem Absterben der Körnerzellen statt.

Auch bei einigen anderen Mutanten („Nervous“, „Purkinje cell degeneration“, „Lurcher“, „Weaver“, „Staggerer“, „Toppler“, „Woozy“) konnte ein Purkinjezellverlust beobachtet werden (Review: Dusart *et al.*, 2006; Lalonde und Strazielle, 2006). Betrachtet man jedoch den Zeitverlauf und die Menge an abgestorbenen Purkinjezellen in diesen ataktischen Mutanten, zeigen sich große Unterschiede zu den CHL1-/- Mäusen. Zum einen findet der Zelltod in den Mutanten frühestens erst zwei bis drei Wochen nach der Geburt statt und zum anderen ist der Verlust bedeutend größer (40% bis 100% der Purkinjezellpopulation). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es wahrscheinlich, dass die Ablation des CHL1-Moleküls Mechanismen zur Folge hat, die sich unterscheiden von denen der anderen Moleküle, wie dem ATP/GTP-bindende Protein 1 („Purkinje cell degeneration“), der Untereinheit Delta 2 des Glutamatrezeptors („Lurcher“), dem inwärts gerichteten Kaliumkanal Girk 2 („Weaver“), dem retinoid-verwandten Orphan-Rezeptor Alpha („Staggerer“) oder dem Chaperone Sil1 („Woozy“).

Auch scheint die Reduktion der Purkinjezellen nicht mit einer veränderten Migration während der Embryogenese im Zusammenhang zu stehen. Diese Situation liegt z.B. im Fall der Reeler-Mutation (Lalonde und Strazielle, 2006) vor. Eine veränderte Migration führt meistens zu abnorm positionierten Purkinjezellen, die jedoch nicht in den CHL1-/- Mäusen gefunden werden konnten.

Da das Verhältnis von Interneuronen zu Purkinjezellen in CHL1-/- Mäusen auffällig hoch ist, kommt der Verdacht auf, dass die Purkinjezellen vermehrt inhibitorische synaptische Signale erhalten und dadurch eventuell beeinflusst werden könnten. Eine Zählung der inhibitorischen synaptischen Kontakte ergab jedoch für die einzelnen Purkinjezellen keine Unterschiede zwischen CHL1-/- und CHL1+/+ Mäusen (Jakovcevski *et al.*, 2008). Der hemmende synaptische Input in CHL1-/- Mäusen scheint also trotz eines abnorm hohen Verhältnisses von Interneuronen zu Purkinjezellen gleichgeblieben zu sein.

Die Expression von CHL1 ist besonders auf den Parallel- und Kletterfasern ausgeprägt (Jakovcevski *et al.*, 2008), die während der ersten postnatalen Woche transiente Synapsen auf den sich entwickelnden Purkinjezelldendriten ausbilden (Sotelo *et al.*, 2004; Madalosso *et al.*, 2005). Ein Mangel von CHL1 auf diesen Fasern könnte dazu führen, dass sie nicht angemessen ihre Zielzellen (Purkinjezellen) erreichen oder die Synapsenbildung fehlerhaft verläuft. Störungen in diesen Prozessen führen möglicherweise zu einem verstärkten Absterben der Purkinjezellen. Diese Vermutung geht mit der Beobachtung an Nagern einher, in denen in der ersten postnatalen Woche auf natürlichem Wege über den Caspase-abhängigen Zelltod (Maximum zwischen den postnatalen Tagen P4 und P6) die endgültige Größe der Purkinjezellpopulation reguliert wird (Madalosso *et al.*, 2005). Die Kletter- und Parallelfasern

bilden somit ihre transienten Synapsen auf den Purkinjezelldendriten in einer entscheidenden Phase der Entwicklung, in der die Regulation der Größe der Purkinjezellpopulation stattfindet.

Eine weitere Erklärung für den Purkinjezellverlust in den CHL1-/- Mäusen ergibt sich möglicherweise aus veränderten Zellen in den tiefen Kleinhirnkernen. Diese Zellen exprimieren in den CHL1+/+ Mäusen reichlich CHL1 (Holm *et al.* 1996; Jakovcevski *et al.*, 2008). Durch den CHL1-Mangel verursachte Veränderungen an den Zellen der tiefen Kleinhirnkerne verhindern möglicherweise, dass sie angemessen von den Purkinjezellaxonen erreicht werden können. Fehlende oder fehlerhafte synaptische Kontakte könnten wiederum ein verstärktes Absterben der Purkinjezellen zur Folge haben. Eine korrekte Zielfindung oder Funktion dieser frühen synaptischen Kontakte ist für eine regelrechte Reifung der Purkinjezellen bedeutend (Sotelo, 2004). Außerdem zeigen die Ergebnisse weiterer Studien an CHL1-/- Mäusen, dass aufgrund synaptischer Dysfunktionen in kritischen Entwicklungsphasen vermehrt Zellen absterben können (Leshchyns'ka *et al.*, 2006; Nikonenko *et al*., 2006).

5.1.3 Verlust von Körnerzellen

In dieser Studie ließ sich bei adulten CHL1-/- Mäusen eine Reduktion der Körnerzellen um 23% feststellen. Der Körnerzellverlust könnte entweder durch ein verstärktes Absterben der Zellen oder durch eine reduzierte Proliferation in einem früheren Stadium der Entwicklung erklärt werden. Daher ist es sinnvoll, die Ergebnisse aus der Studie von Jakovcevski *et al.* (2008) zu betrachten, in der Apoptose, Proliferation und Größe der Körnerzellen in jüngeren CHL1-/- Mäusen untersucht wurden.

Die Proliferation der vorläufigen Körnerzellen findet größten Teils in der externen Körnerzellschicht (EGL) statt. Sie beginnt etwa am 15. embryonalen Tag und endet am 15. postnatalen Tag, wenn die letzten Körnerzellen die EGL verlassen und durch die Molekular- und Purkinjezellschicht (ML/PL) zur inneren Körnerzellschicht (IGL) migrieren (Sotelo, 2004). Sobald die Körnerzellen die IGL erreicht haben, beginnen sie mit der CHL1-Produktion (Holm *et al.*, 1996). An dieser Stelle ist bemerkenswert, dass CHL1 über noch unbekannte Mechanismen das Überleben von Neuronen *in vitro* unterstützt (Chen *et al*., 1999; Hillenbrand *et al*., 1999; Jakovcevski *et al*., 2008). Durch eine ausbleibende CHL1-Produktion könnte daher den Körnerzellen ein wichtiger Überlebensfaktor fehlen und ein vermehrtes Absterben dieser Zellen zur Folge haben. Eine Studie an CHL1-/- Mäusen im Alter von einer und zwei Wochen zeigte jedoch eine deutlich reduzierte Anzahl an apoptotischen Zellen in der IGL (Jakovcevski *et al*., 2008). Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich der Körnerzellverlust in den zwei Monate alten CHL1-/- Mäusen dieser Studie nicht auf eine verstärkte Apoptoserate zurückführen.

Wahrscheinlicher ist, dass eine abgeschwächte Proliferation die reduzierte Körnerzellanzahl in zwei Monate alten CHL1-/- Mäusen verursacht. Bei CHL1-/- Mäusen im Alter von einer Woche ließ sich zwar noch keine abgeschwächte Körnerzellproliferation feststellen, jedoch ergab eine Untersuchung an CHL1-/- Mäusen im Alter von zwei Wochen eine um 30% reduzierte Körnerzellproliferation (Jakovcevski *et al*., 2008). Die Körnerzellproliferation wird unter anderem von den Purkinjezellen reguliert. Diese Zellen können über die Sekretion von „Sonic Hedghoc“ (Shh) die Körnerzellproliferation deutlich anregen (Sotelo, 2004; Lewis *et al*., 2004). In CHL1-/- Mäusen sterben die Purkinjezellen schon vor der ersten postnatalen Woche ab und passen möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt durch eine geringere Sekretion von Shh die Anzahl der Körnerzellen an ihren eigenen Verlust an. Der proportionale Verlust von Purkinje- (-20%) und Körnerzellen (-23%) bestätigt einen numerischen Anpassungsprozess. Auch andere Autoren beschreiben numerische Anpassungsprozesse von Zellpopulationen im Kleinhirn bei verschiedenen genveränderten Mäusen (Vogel *et al*., 1989; Wetts und Herrup, 1983). Dabei scheint das Größenverhältnis von prä- und postsynaptischer Zellpopulation speziellen Regelungsmechanismen zu unterliegen. Diese Studie zeigt somit ein klassisches Beispiel, wie die Größe einer postsynaptischen Zielzellpopulation (Purkinjezellen) die Anzahl der auf sie projizierenden präsynaptischen Neurone (Körnerzellen) reguliert.

Dennoch stellt sich die Frage, weshalb in jüngeren Mäusen (erste postnatale Woche) die Anzahl an Körnerzellen in der ML/PL (+45%) und der IGL (+14%) stark erhöht ist (Jakovcevski *et al*, 2008). Nach Jakovcevski *et al.* (2008) ist hierfür eine verlangsamte Migration der Zellen in der ML/PL und eine reduzierte Apoptoserate in der IGL verantwortlich. Möglicherweise führt aber auch eine verstärkte Körnerzellproliferation vor der ersten postnatalen Woche zu diesen Ergebnissen. Zu diesem frühen Zeitpunkt wurde die Körnerzellproliferation bisher noch nicht untersucht. Die abgeschwächte Proliferation nach der ersten postnatalen Woche könnte in diesem Fall ein Kompensationsmechanismus auf die erhöhte Anzahl an Körnerzellen in jüngeren CHL1-/- Mäusen sein. Diese Kompensation geht jedoch über die Norm hinaus und führt letztendlich zu einer reduzierten Körnerzellanzahl in adulten CHL1-/- Mäusen.

In Anbetracht der Ergebnisse aus der Studie von Jakovcevski *et al.* (2008) kann man, wie oben bereits erwähnt, darauf schließen, dass die reduzierte Körnerzellanzahl in zwei Monate alten CHL1-/- Mäusen nicht durch eine verstärkte Apoptose zu erklären, sondern am wahrscheinlichsten auf eine abgeschwächte Proliferation zurückzuführen ist. Eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte Körnerzellanzahl wäre ein verstärktes Zellsterben über nicht-apoptotische Wege. In diesem Fall wäre aber als Reaktion auf die Degeneration von Nervengewebes eine veränderte Gliazellanzahl wahrscheinlich. Da diese Studie eine

unveränderte Gliazellanzahl in CHL1-/- Mäusen aufzeigt, ist ein verstärktes Absterben der Körnerzellen über nicht-apoptotische Wege unwahrscheinlich.

5.1.4 Interneurone des cerebellären Kortex in der CHL-/- Maus

Wie sich das Verhältnis von unterschiedlich großen Interneuronenpopulationen auf die Funktionen des Kleinhirns auswirkt, ist bisher nur selten untersucht worden. Eine Ausnahme ist die Studie von Watanebe im Jahr 1998. Sie zeigt, dass die Immuntoxin-gesteuerte selektive Ablation von Golgi-Interneuronen in Mäusen zu diversen motorischen Defiziten führt. Dagegen wurde in der vorliegenden Studie eine normale Anzahl an Interneuronen (Golgi-Interneurone, Korb- und Sternzellen) in CHL1-/- Mäusen festgestellt. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass diese Mäuse keine sichtbaren motorischen Defizite aufweisen (siehe Kapitel 5.1.6). Folglich kann man zu der Annahme kommen, CHL1 ist entbehrlich für die Formation der Interneuronenpopulationen, obwohl CHL1 in diesen Zellen auf einem hohen Level exprimiert wird. Es wäre jedoch voreilig den Rückschluss zu ziehen, der CHL1-Mangel hätte keine Auswirkungen auf die Interneuronenpopulationen. Abgesehen davon, dass mit der Methode dieser Arbeit bezüglich der Interneurone nur eine Variable, die Populationsgröße, untersucht wurde, können sich die Interneurone flexibel an die Anforderungen der Kleinhirnverschaltungen anpassen und somit mögliche Veränderungen kompensieren. Die Flexibilität der Interneurone ergibt sich, da sie erst zu einem relativ späten Zeitpunkt der Entwicklung in den cerebellären Kortex migrieren und sich erst nach ihrer Ankunft in die verschiedenen Interneuronentypen differenzieren. Diese Anpassungsfähigkeit fehlt den Purkinje- und Körnerzellen, die zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung ausdifferenziert sind und die grundlegenden Kleinhirnverschaltungen ausbilden (Leto *et al*., 2006).

5.1.5 Gliazellen des cerebellären Kortex in der CHL1-/- Maus

Die quantitative Analyse von Mikroglia und Astrozyten ist von besonderer Bedeutung, da eine erhöhte Anzahl dieser Zellen auf pathologische Prozesse hinweisen kann, die in der üblichen Histologie nicht offensichtlich zu erkennen sind (Irintchev *et al.*, 2005). Diese Studie zeigt, dass die Anzahl der Mikrogliazellen in den CHL1-/- Mäusen normal ist und daher eine Degeneration des Nervengewebes im Kleinhirn weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Ein Zellsterben über nicht-apoptotische Prozesse ist somit unwahrscheinlich.

Ebenfalls ist in CHL1-/- Mäusen die Anzahl von S-100B-positiven Zellen in der inneren Körnerzellschicht und in der Molekularschicht unverändert. In der inneren Körnerzellschicht erfasst die S-100B-Färbung nur die Astrozyten (Yang *et al*., 1995). Eine normale Anzahl an Astrozyten beweist, dass in diesen Regionen keine reaktive Astrogliosis vorliegt. Diese könnte auf eine Gewebedegeneration oder auf andere mutationsbedingte Veränderungen, wie sie im

Neokortex der adulten Tenascin-C-defizienten Maus entdeckt wurden (Irintchev *et al*., 2005), hindeuten.

In der Molekularschicht werden mit der S-100B-Färbung nicht nur die Astrozyten, sondern auch die Bergmann-Gliazellen markiert. Daher ist eine differenzierte Betrachtung dieser beiden Zelltypen nicht möglich. Dennoch ist aufgrund der unveränderten Anzahl an S-100B-positiven Zellen in der Molekularschicht von CHL1-/- Mäusen eine normale Anzahl an Astrozyten und Bergmannglia wahrscheinlich. Somit existiert auch in der Molekularschicht kein Anzeichen auf eine reaktive Astrogliosis.

5.1.6 Funktionelle Betrachtungen

Traditionell wird die Funktion des Kleinhirns in Zusammenhang gebracht mit der Feinregulierung und Anpassung von motorischen Aktivitäten. Über die genaueren funktionellen Verschaltungen und ihre exakten Auswirkungen auf die Motorik sind sich die Forscher bis heute nicht einig. Die verschiedenen Theorien gehen jedoch alle von dem Vorhandensein eines Komparators aus, der die beabsichtige Bewegung mit ihrer tatsächlichen Ausführung vergleicht und Fehler korrigiert. Diese Aufgabe übernimmt aller Voraussicht nach die untere Olive (Horn *et al.,* 2004; Garwiez *et al.,* 2002), die über heterosynaptische Kletterfaserkontakte die Wirkung der Parallelfasern auf die Purkinjezellen moduliert (Kandel, 1995). Dieser Mechanismus der Bewegungsanpassung setzt jedoch vergleichsweise langsame Bewegungen voraus, da die propriozeptiven Informationen erst mit einiger Latenz zur Verfügung stehen. Zur Steuerung von schnellen Bewegungen müsste das Kleinhirn in der Lage sein, die theoretischen Konzepte schon vor der Ausführung einer Bewegung zu beeinflussen. An dieser Vorstellung setzt das Observer-Modell an, in dem die internen Modelle (Vorwärts-Modell und inverses Modell) funktionell zusammenarbeiten (Bhushan und Shadmehr, 1999; Jordan und Rumelhart, 1992; Wolpert et al., 1995; Wolpert und Kawato, 1998; Miall and Wolpert, 1996). Im Vorwärts-Modell erhält das Kleinhirn eine Kopie des Bewegungsplanes (Efferenzkopie) vom Großhirn, die es mit den aktuellen sensorischen Informationen integriert und somit den nächsten Zustand der bewegten Gliedmaße abschätzen kann. Dieser abgeschätzte Zustand wird dann im inversen Modell mit dem gewünschten Zustand verglichen und die Bewegung bzw. das theoretische Konzept für die Bewegung angepasst.

Der homogene innere Aufbau hat zu der Annahme geführt, dass das Kleinhirn die Operationen immer auf die gleiche Weise ausführt und durch diese Art der Informationsverarbeitung optimal mit der Großhirnrinde zusammenarbeitet. Die Architektur der Großhirnrinde ist auf flexible Bewegungsplanung und Ausführung ausgerichtet, wodurch es aber nur relativ langsam arbeiten kann. Dem Kleinhirn dagegen fehlt diese Flexibilität, doch dafür kann es schnell und gleichförmig Informationen verarbeiten und die Ausführung von unbewussten

Routinebewegungen besser kontrollieren. Die Großhirnrinde wird auf diese Weise in Zusammenarbeit mit dem Kleinhirn von Aufgaben entlastet und kann effektiver arbeiten, wenn gleichzeitig flexible und routinierte Bewegungen stattfinden.

Das korrekte Zusammenspiel von den Zellen des Kleinhirns ist also essentiell für eine einwandfreie Bewegungsausführung. Veränderungen in den Hauptzellpopulationen müssten daher in einer abnormen Bewegung erkennbar sein. Obwohl in den CHL1-/- Mäusen signifikant weniger Purkinje- und Körnerzellen vorhanden sind, ließen sich im „Beam-Walking-Test“ keine motorischen Defizite bei den CHL1-/- Mäusen feststellen (Jakovcevski *et al.*, 2007). Die gleichen Beobachtungen machte man auch in Versuchen unter etwas anspruchsvolleren Bedingungen, wie dem „Rotarod-Test“, dem „Wire-Hanging-Test“ oder dem „Pole-Test“ (Montag-Sallaz *et al.*, 2002; Morellini *et al.*, 2007). Das Ausbleiben von offensichtlichen motorischen Auffälligkeiten bei CHL1-/- Mäusen erklärt sich möglicherweise durch den moderaten und proportionalen Verlust von Purkinje- und Körnerzellen um je etwa 23%. Auch ist die Architektur der histologischen Schichten sowie die kortikale Dicke des Kleinhirns in den CHL1-/- Mäusen normal, und der GABAerge Input auf die Purkinjezellen ist trotz eines erhöhten Verhältnisses von Korb- und Sternzellen zu Purkinjezellen gleich geblieben.

Die Ergebnisse der oben genannten motorischen Versuche stehen also nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Studie, indem sie zeigen, dass sich die CHL1-/- Mäuse nicht sichtbar ataktisch bewegen. Dennoch stellen sie keinen Beweis für eine normale Funktion des Kleinhirns dar. Um mögliche funktionelle Veränderungen in den Kleinhirnverschaltungen der CHL1-/- Mäuse aufzudecken, wären Versuche, wie die Blinkreflex-Konditionierung oder elektrophysiologische Untersuchungen, sinnvoll.

Schon seit Beginn der Forschung über die Funktionen des Kleinhirns vermutet man, dass dieser Gehirnabschnitt nicht nur für die Motorik eine bedeutende Rolle spielt. Seit einiger Zeit häufen sich die Beweise über einen funktionellen Zusammenhang des Kleinhirns mit höheren kognitiven Funktionen und Verhaltensweisen. Dabei nimmt man aufgrund der einheitlichen Architektur und des Verschaltungsprinzips im Kleinhirn an, dass über den gleichen Mechanismus, mit dem die Motorik kontrolliert wird (siehe oben), auch Kognitionen und Formen des Verhaltens beeinflusst werden.

Beim Menschen entspringt der größte Anteil an kortikopontinen Bahnen im präfrontalen Assoziationskortex, und geringere Anteile entspringen im prämotorischen oder motorischen Kortex (Ramnani *et al.*, 2004). Daher reguliert nach Ansicht von Ramnani das Kleinhirn neben der Motorik auch die Informationen, die im präfrontalen Kortex entspringen und in Zielgebieten, wie zum Beispiel anderen Assoziationscortices, weiterverarbeitet werden.

In Anbetracht dieser Theorie kommt die Vermutung auf, dass sich die Abwesenheit des CHL1-Moleküls im Kleinhirn auf kognitive Funktionen auswirken könnte. Es ließen sich bisher keine offensichtlichen kognitiven Einschränkungen in CHL1-/- Mäusen feststellen, aber sie zeigen Defizite bei der Verarbeitung räumlicher Informationen (Motag-Sallaz *et al.*, 2002), der Aufmerksamkeit sowie der Fähigkeit, Eingangssignale zu kontrollieren (Irintchev *et al.*, 2004).

Gegen diese Überlegung spricht, dass die Verbindungen des Kleinhirns zu präfrontalen Gebieten nur im Menschen besonders ausgeprägt sind und in nicht-menschlichen Primaten der Großteil der kortikopontinen Bahnen im motorischen Kortex entspringt (Schmahmann and Pandya, 1997; Schmahmann *et al.*, 2004). Über den Ursprung der corticopontinen Fasern in Mäusen liegen bisher keine Studien vor.

Das Kleinhirn wird über die kognitiven Funktionen hinaus auch mit weiteren Fähigkeiten, wie dem Verhalten und der Wahrnehmung von Emotionen, in Zusammenhang gebracht. Neuropsychologische Untersuchungen an Patienten mit Kleinhirninfarkten ergaben vielfältige kognitive und verhaltensbezogene Auffälligkeiten, die die Forscher Jeremy und Schmahmann im Jahr 2004 unter dem Begriff cerebelläres kognitives Affektivitätssyndrom (CCAS) zusammenfassten. Typische Symptome für das CCAS sind unter anderem Defizite in der Planungsfähigkeit, der Sprache, im abstrakten logischen Denken und im räumlichen Wahrnehmungsvermögen. Auch fallen Veränderungen der Persönlichkeit auf, wie emotionales Abstumpfen und unangemessenes Verhalten. Der cerebelläre Vermis ist bei ausgeprägter affektiver Symptomatik konstant von den Infarkten betroffen. Eine weitere Forschergruppe bestätigte durch ihre Studien diese Symptome bei Kleinhirninfarkten und stellte außerdem noch Defizite in der Aufmerksamkeit, dem visuell-räumlichen Denken sowie der kognitiven Flexibilität fest (Malm *et al.*, 1996). Auffällig bei CCAS-Patienten ist, dass die motorischen Fähigkeiten nur leicht durch die Kleinhirninfarkte betroffen sind.

Diese Beobachtungen an Patienten mit geschädigtem Kleinhirn stimmen zum Teil mit den Auffälligkeiten bei CHL1-/- Mäusen überein. Wie oben bereits beschrieben, zeigen die CHL1-/- Mäuse ebenfalls Defizite bei der Verarbeitung räumlicher Informationen und in der Aufmerksamkeit. Auch scheint ihr Verhalten auffällig verändert zu sein, da sie nur reduziert auf Umweltreize reagieren und auf soziale Reize nur verzögert antworten (Morellini *et al.*, 2006). Bisher wurden die veränderten Verschaltungen im Hippocampus für diese Auffälligkeiten verantwortlich gemacht (Morellini *et al.*, 2006; Montag-Sallaz *et al.*, 2002), doch möglicherweise spielen hierfür auch Veränderungen im Kleinhirn, die durch die CHL1-Ablation entstanden sind, eine Rolle.

In diesem Zusammenhang könnten das Kleinhirn und die CHL1-Ablation auch eine Bedeutung haben bei der Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen. Mit dem 3p-Syndrom und

Schizophrenie konnte das CHL1-Molekül bereits in einen direkten Zusammenhang gebracht werden (Angeloni *et al.,* 1999; Higgins *et al.,* 2000; Frints *et al.*, 2004; Dijkhuizen *et al.,* 2006; Sakurai *et al.,* 2002; Chen *et al.,* 2004). Bisher gibt es unterschiedliche Vermutungen, auf welche Weise das CHL1-Molekül diese Krankheiten beeinflusst. Bemerkenswert ist, dass in einer Studie über Patienten mit infantilem Autismus (juvenile Schizophrenie), ähnlich wie im Kleinhirn von CHL1-/- Mäusen, sich ein Verlust von Purkinjezellen im lateralen und inferioren Kleinhirn feststellen ließ (Kemper *et al.,* 1998; Bauman *et al.*, 1985) Die Ergebnisse dieser Studie liefern daher neue Hinweise für eine mögliche Rolle des Kleinhirns bei der Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen.

5.2 Visueller Kortex

5.2.1 Kortikale Dicke des visuellen Kortex

Die Dicke des visuellen Kortex ist in den CHL1-/- Mäusen unverändert. Da auch die Dicke des cerebellären Kortex (siehe oben) und einige andere grobmorphologischen Strukturen unbeeinflusst von der CHL1-Ablation bleiben (Montag-Sallaz *et al.,* 2002), liegt die Annahme nahe, dass CHL1 für den grobmorphologischen Aufbau der meisten Gehirnregionen entbehrlich ist.

Für die Interpretation der Daten ist auch in dieser Gehirnregion eine gleiche kortikale Dicke in allen Mäusen bedeutend, da nur so von der gemessenen Zelldichte auf die Gesamtzellzahl in jeder Maus geschlossen werden kann.

5.2.2 Zellpopulationen des visuellen Kortex in der CHL1-/- Maus

Im visuellen Kortex der CHL1-/- Mäuse ist die Anzahl der Nerven- (Pyramidenzellen und Interneurone) und Gliazellen im Vergleich zu den CHL1+/+ Mäusen unverändert. Auch in einer anderen Studie konnte kein Verlust an Pyramidenzellen im Neokortex der CHL1-/- Maus festgestellt werden (Demyanenko *et al.,* 2004). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CHL1 im visuellen Kortex auf die Größe der Zellpopulationen bis zum zweiten postnatalen Monat keinen Einfluss ausübt. Die verlangsamte Migration der neuronalen Vorläuferzellen, die für die fünfte und sechste kortikale Schicht bestimmt sind (Demyanenko *et al.,* 2004), scheint somit keine Auswirkungen auf die Größe der Nervenzellpopulation im visuellen Kortex der adulten CHL1-/- Maus zu haben.

Dennoch ist es nicht möglich, auf Grundlage dieser Ergebnisse zu behaupten, CHL1 wäre entbehrlich für die Zellpopulationen und ihre korrekte Funktion im visuellen Kortex. Die Methode dieser Studie kann die Bedeutung von CHL1 im visuellen Kortex nur eingeschränkt erfassen, da mit ihr bloß eine Variable (die Zellanzahl) bezüglich der Zellpopulation untersucht

wurde und andere funktionelle und morphologische Aspekte nicht betrachtet wurden. Andere Studien konnten im visuellen Kortex von CHL1-/- Mäusen durchaus Veränderungen der Nervenzellen, wie eine abnorme Positionierung und Formation von Pyramidenzellen, feststellen (Demyanenko *et al*., 2004). Um mögliche funktionelle Veränderungen zu ermitteln, wären weitere elektrophysiologische Tests oder Versuche, mit denen die visuelle Wahrnehmung differenziert erfasst werden kann, sinnvoll.

Eine norme Anzahl an Gliazellen im visuellen Kortex der CHL1-/- Maus zeigt darüber hinaus, dass trotz der veränderten Orientierung der Pyramidenzellen (Demyanenko *et al.,* 2004) auch in dieser Gehirnregion keine degenerativen Prozesse im Nervengewebe stattfinden.

5.3 Fazit

Diese Studie zeigt, dass im cerebellären Kortex von zwei Monate alten CHL1-/- Mäusen weniger Purkinje- und Körnerzellen vorhanden sind. Die anderen Hauptzellpopulationen des cerebellären Kortex, sowie alle Hauptzellpopulationen des visuellen Kortex sind bezüglich ihrer Größe nicht verändert. CHL1 scheint also gebietsspezifisch die Größe von Zellpopulationen zu beeinflussen. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse, dass CHL1 wichtig ist für die Kleinhirnentwicklung, obwohl laut vorausgegangenen Studien CHL1-/- Mäuse scheinbar keine motorischen Defizite aufweisen. Es werden neue Hinweise geliefert für einen möglichen Zusammenhang zwischen der CHL1-Ablation im Kleinhirn und dem abnormen Verhalten der CHL1-/- Mäuse. Es bleiben allerdings noch viele Fragen offen, vor allem im Hinblick auf mögliche funktionelle Veränderungen in den Verschaltungen der betroffenen Zellpopulationen.

Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass auch die anderen Mitglieder der L1-Familie bedeutende Funktionen bei der Kleinhirnentwicklung haben. Neurofascin lenkt die wachsenden Basketzellaxone, damit sich die GABAergen Synapsen direkt auf den Initialsegmenten der Purkinjezellaxone bilden können (Ango *et al.,* 2004). Hingegen weisen L1- oder NrCAM-Knockout-Mäuse, bis auf einen etwas verkleinerten cerbellären Vermis, keine offensichtlichen Störungen in der Kleinhirnentwicklung auf (Dahme *et al.,* 1997; Sakurai *et al.,* 2001). Die gleichzeitige Ablation von L1 und NrCAM führt jedoch zu einer starken Beeinträchtigung der Körnerzellentwicklung und weist somit auf ein funktionelles Zusammenspiel dieser beiden Moleküle hin (Sakurai *et al*., 2001). In Anbetracht dieser Ergebnisse wären weitere Studien interessant, die nicht nur die einzelnen Funktionen von CHL1 und den anderen L1-Familienmitgliedern ermitteln, sondern auch ihr Zusammenspiel in der Entwicklung des Kleinhirns und des visuellen Kortex.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Entdeckung des CHL1-Moleküls liegt noch nicht lange zurück. In den ersten Studien zu diesem Molekül stellten die Forscher ein interessantes Expressionsmuster fest und ermittelten wichtige funktionelle Eigenschaften von CHL1, wie die Förderung von Neuritenwachstum, neuronalem Überleben und neuronaler Migration. In weiteren Untersuchungen stellte sich ein Einfluss des CHL1-Moleküls auf die Regeneration von Nervengewebe heraus.

Ebenso wie das verwandte und schon länger bekannte L1-Molekül stand auch das CHL1-Molekül sehr bald unter Verdacht, eine wichtige Rolle bei der Entstehung von neuropsychiatrischen Krankheiten zu spielen. Es konnten bei Patienten mit bestimmten Erkrankungen, wie Schizophrenie und dem 3p-Syndrom, Fehler im CHL1-Gen identifiziert werden. Verschiedene Untersuchungen bestätigten daraufhin die CHL1-/- Maus als ein geeignetes Modell für bestimmte Symptome von neuropsychiatrischen Erkrankungen (u.a. Schizophrenie).

Analysen dieser CHL1-/- Mäuse deckten diverse Abnormalitäten im Neokortex, Hippocampus, Corpus amygdaloideum, Riechkolben und Substantia Nigra auf. Dabei ließen sich insbesondere Veränderungen im Laufe der embryonalen und postnatalen Entwicklung der Mäuse beobachten.

Diese Studie beschäftigte sich mit zwei weiteren Gehirnregionen: dem cerebellären und dem visuellen Kortex. Die Untersuchungen wurden an sechs CHL1+/+ und sechs CHL1-/- Mäusen im Alter von zwei Monaten durchgeführt. Dabei wurde die Dichte der Hauptzellpopulationen (Neurone, neuronale Subpopulationen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) mittels einer stereologischen Methode erfasst, die die Identifizierung von immunhistochemisch gefärbten Zelltypen ermöglichte.

Im Kleinhirn der zwei Monate alten CHL1-/- Mäuse konnte eine signifikant geringere Anzahl an Purkinje- und Körnerzellen festgestellt werden. Der Purkinjezellverlust war bereits in einer vorausgegangenen Studie an sieben Tage alten CHL1-/- Mäusen offensichtlich und ist bis zu einem Alter von zwei Monaten etwa gleich geblieben. Ursächlich hierfür ist vermutlich ein veränderter synaptischer Input an den Dendriten der Purkinjezellen durch die Kletter- und Parallelfasern während der frühen postnatalen Entwicklung. Der Körnerzellverlust wurde erst in dieser Arbeit an zwei Monate alten CHL1-/- Mäusen festgestellt. Folglich muss er in einem Zeitraum nach dem siebten postnatalen Tag stattgefunden haben. Da sich die Anzahl der beiden Zelltypen (Purkinje- und Körnerzellen) proportional verringert hat, handelt es sich hierbei am wahrscheinlichsten um eine Anpassung der Körnerzellpopulation auf die bereits reduzierte Purkinjezellpopulation. Möglicherweise wird diese Anpassung durch die Purkinjezellen

reguliert, indem sie die Körnerzellproliferation nach der ersten postnatalen Woche abschwächen.

Im visuellen Kortex ergaben die quantitativen Analysen der Hauptzellpopulationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den CHL1+/+ und CHL1-/- Mäusen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass CHL1 gebietsspezifisch die Größe der Hauptzellpopulationen beeinflusst, und liefern somit neue Beweise für eine Bedeutung des CHL1-Moleküls bei der Kleinhirnentwicklung.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Albus JS (1971) A theory of cerebellar function. Math Biosci 10: 25-61

Angeloni D, Lindor NM, Pack S, Latif F, Wei MH, Lerman MI (1999) CALL gene is haploinsufficient in a 3p-syndrome patient. Am J Med Genet 86: 482-485

Ango F, di Cristo G, Higashiyama H, Bennett V, Wu P, Huang ZJ (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at Purkinje axon initial segment. Cell 119: 257-272

Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA (1994) Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. Neuron 12(2): 243-60

Bauman M, Kemper TL (1985) Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism. Neurology 35:866-874

Bhushan N, Shadmehr R (1999) Computational nature of human adaptive control during learning of reaching movements in force fields. Biological Cybernetics 81: 39-60

Bliss T, Errington M, Fransen E, Godfraind JM, Kauer JA, Kooy RF, Maness PF, Furley AJ (2000) Long-term potentiation in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. Curr Biol 10: 1607-1610

Buhusi M, Midkiff BR, Gates AM, Richter M, Schachner M, Maness PF (2003) Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration. J Biol Chem 278: 25024-25031

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

Brümmendorf T, Rathjen FG (1993) Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III- related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. J Neurochem 61: 1207-1219

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

Chaisuksunt V, Campbell G, Zhang Y, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN (2000a) The cell recognition molecule CHL1 is strongly upregulated by injured and regenerating thalamic neurons. J Comp Neurol 425: 382-392

Chaisuksunt V, Zhang Y, Anderson PN, Campbell G, Vaudano E, Schachner M, Lieberman AR (2000b) Axonal regeneration from CNS neurons in the cerebellum and brainstem of adult rats: Correlation with the patterns of expression and distribution of messenger RNAs for L1, CHL1, c-jun and growth associated protein 43. Neurosci 100: 87-108

Chen S, Mantei L, Dong L, Schachner M (1999) Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. J Neurobiol 38: 428-439

Chen QY, Chen Y, Feng GY, Lindpainter K, Chen Y, Sun X, Chen Z, Gao Z, Tang J, He L (2005) Casecontrol association study of close homologue of L1 (CHL1) and schizophrenia in the Chinese population. Schizophr Res 73: 269-274

Cohen NR, Taylor JSH, Scott LB, Guillery RW, Soriano P, Furley AJW (1998) Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. Curr Biol 8: 26-33

Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. Science 236: 799-806

Cunningham BA (1995) Cell adhesion molecules as morphoregulators. Curr Opin Cell Biol 7: 628-633

Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N (1997) Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. Nat Genet 17: 346-349

Demyanenko GP, Anton E, Schachner M, Feng G, Sanes J, Maness PF (2004) Close homolog of L1 modulates area-specific neuronal positioning and dendrite orientation in the cerebral cortex. Neuron 44: 423-437

Dijkhuizen T, van Essen T, van der Vlies P, Verheij JB, Sikkema-Raddatz B, van der Veen AY, Gerssen-Schoorl KB, Buys CH, Kok K (2006) FISH and array-CGH analysis of a complex chromosome 3 aberration suggests that loss of CNTN4 and CRBN contributes to mental retardation in 3pter deletions. Am J Med Genet A 140: 2482-2487

Dow RS (1974) Some novel concepts of cerebellar physiology. Mt Sinai J Med 41:103–119

Dusart I, Guenet JL, Sotelo C (2006) Purkinje cell death: differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. Cerebellum 5: 163-173

Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Geiger C, Schollhammer S, Kemshead JT, Moller P, Schwartz-Albiez R, Altevogt P (1996) L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. Eur J Immunol 26: 2508-2516

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

Fransen E, DiHooge R, Camp GV, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Koekkoek SKE, De Zeeuw CI, De Deyn PP, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy RF, Willems PJ (1998) L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. Hum Mol Genet 7: 999-1009

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 NCAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. J Cell Biol 125: 669-680

Frints SG, Marynen P, Hartmann D, Fryns JP, Steyaert J, Schachner M, Rolf B, Craessaerts K, Snellinx A, Hollanders K, D'Hooge R, De Deyn PP, Froyen G (2003) CALL interrupted in a patient with nonspecific mental retardation: gene dosage-dependent alteration of murine brain development and behavior. Hum Mol Genet 12: 1463-1474

Garwicz M (2002) Spinal reflexes provide motor error signals to cerebellar modules - relevance for motor coordination. Brain Res Rev 40: 152-165.

Grumet M, Sakurai T (1996) Heterophilic interactions of the neural cell adhesion molecules Ng-CAM and Nr-CAM with neural receptors and extracellular matrix proteins. Seminars Neurosci 8: 379-389

Higgins JJ, Rosen DR, Loveless JM, Clyman JC, Grau MJ (2000) A gene for nonsyndromic mental retardation maps to chromosome 3p25-pter. Neurology 55: 335-340

Hillenbrand R, Molthagen M, Montag D, Schachner M (1999) The close homologue of neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. Eur J Neurosci 11: 813-826

Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Bartsch U, Moos M, Lübbert H, Montag D, Schachner M (1996) Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recogntion molecules. Eur J Neurosci 8: 1613-1629

Horn KM, Pong M, Gibson AR (2004) Discharge of inferior olive cells during reaching errors and perturbations. Brain Res 996: 148-158

Irintchev A, Koch M, Needham LK, Maness P, Schachner M (2004) Impairment of sensorimotor gating in mice deficient in the cell adhesion molecule L1 or its close homologue, CHL1. Brain Res 1029: 131-134

Irintchev A, Rollenhagen A, Troncoso E, Kiss JZ, Schachner M (2005) Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. Cereb Cortex 15: 950-962

Ito M (2000) Mechanisms of motor learning in the cerebellum. Brain Res. 886: 237-245

Jakovcevski I, Wu J, Karl N, Leshchyns'ka I, Sytnyk V, Chen J, Irintchev A, Schachner M (2007) Glial scar expression of CHL1, the close homolog of the adhesion molecule L1, limits recovery after spinal cord injury. J Neurosci 27: 7222-7233

Jakovcevski I, Siering J, Hargus G, Karl N, Hoelters L, Yin S, Melitta Schachner, Irintchev A (2008) Close homologue of L1 deficiency reduces numbers of Purkinje neurons and migration of granule cells during cerebellum development in mice. (eingereicht)

Jordan MI, Rumelhart DE (1992) Forward models: Supervised learning with a distal teacher. Cognitive Science 16: 307-354

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1996) Neurowissenschaften. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin Oxford

Kenwrick S, Watkins A, De Angelis E (2000) Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. Hum Mol Genet 9: 879-886

Kemper TL, Bauman M (1998) Neuropathology of infantile autism. J Neuropathol Exp Neurol 57: 645-652

Lalonde R, Strazielle C (2007) Spontaneous and induced mouse mutations with cerebellar dysfnuctions: behavior and neurochemistry. Brain Res 1140: 51-74

Leshchyns'ka I, Sytnyk V, Richter M, Andreyeva A, Puchkov D, Schachner M (2006) The adhesion molecule CHL1 regulates uncoating of clathrin-coated synaptic vesicles. Neuron 52: 1011-1025

Leto K, Carletti B, Williams IM, Magrassi L, Rossi F (2006) Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. J Neurosci 26: 11682-11694

Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottman A, McMahon AP (2004) Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. Dev Biol 270: 393-410

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

Lüthl A, Laurent JP, Figurov A, Muller D, Schachner M (1994) Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. Nature 372: 777-779

Madalosso SH, Perez-Villegas EM, and Armengol JA (2005) Naturally occuring neuronal death during the postnatal development of Purkinje cells and their precerebellar afferent projections. Brain Res Rev 49: 267-279

Malm J, Kristensen B, Karlsson T (1998) Cognitive impairment in young adults with infratentorial infarcts. Neurology 51: 433-440

Marr D (1969) A theory of cerebellar cortex. J. Physiol 202: 437-470

Merino JJ, Cordero MI, Sandi C (2000) Regulation of hippocampal cell adhesion molecules NCAM and L1 by contextual fear conditioning is dependent upon time and stressor intensity. Eur J Neurosci 12: 3283-3290

Miall RC, Wolpert DM (1996) Forward models for physiological motor control. Neural Networks 9: 1265-1279

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

Montag-Sallaz M, Schachner M, Montag D (2002) Misguided axonal projections, neural cell adhesion molecule 180 mRNA upregulation and altered behavior in mice deficient for the close homologue of L1. Molecular and cellular Biology: 7967-7981

Montgomery AM, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresh DA, Pancook JD, Zhao X, Reisfeld RA (1996) Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. J Cell Biol 132: 475-485

Morellini F, Lepsveridze E, Kahler B, Dityatev A, Schachner M (2007) Reduced reactivity to novelty, impaired social behavior, and enhanced basal synaptic excitatory activity in perforant path projections to the dentate gyrus in young adult mice deficient in the neural cell adhesion molecule CHL1. Mol Cell Neurosci 34: 121-136

Nikonenko AG, Sun M, Lepsveridze E, Apostolova I, Petrova I, Irintchev A, Dityatev A, Schachner M (2006) Enhanced perisomatic inhibition and impaired long-term potentiation in the CA1 region of juvenile CHL1-deficient mice. Eur J Neurosci 23: 1839-1852

Nolte C, Moos M, Schachner M (1999) Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in epithelia of rodents. Cell Tissue Res 298: 261-273

Pratte M, Rougon G, Schachner M, Jamon M (2003) Mice deficient for the close homologue of the neural adhesion cell L1 (CHL1) display alterations in emotional reactivity and motor coordination. Behav Brain Res 147: 31-39

Ramnani N, Behrens TE, Johansen-Berg H, Richter MC, Pinsk MA, Andersson JL, Rudebeck P, Ciccarelli O, Richter W, Thompson AJ, Gross CG, Robson MD, Kastner S, Matthews PM (2006) The evolution of prefrontal inputs to the cortico-pontine system: diffusion imaging evidence from macaque monkeys and humans. Cereb Cortex 16: 811-818

Ramnani N (2006) The primate cortico-cerebellar system: anatomy and function. Nat Rev Neurosci 7: 511-522

Rathjen FG, Jessell TM (1991) Glycoproteins that regulate the growth and guidance of vertebrate axons: domains and dynamics of the immunoglobulin/ fibronectin type IH subfamily. Semin Neurosci 3: 297-308

Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. EMBO J 3: 1-10

Rutishauser U (1993) Regulation of cell-cell interactions by NCAM and its polysialic acid moiety. In: Roth, J., Rutishauser, U., Troy, F.A. (Eds.), Polysialic Acid Birkhauser, Basel, pp. 215–228

Saghatelyan AK, Nikonenko AG, Sun M, Rolf B, Putthoff P, Kutsche M, Bartsch U, Dityatev A, Schachner M (2004). Reduced GABAergic transmission and number of hippocampal perisomatic inhibitory synapses in juvenile mice deficient in the neural cell adhesion molecule L1. Mol Cell Neurosci 26: 191-203

Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, Furley AJ, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M (2001) Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. J Cell Biol 154: 1259-1273

Sakurai K, Migita O, Toru M, Arinami T (2002) An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia. Mol Psych 7: 412-415

Sandi C, Merino JJ, Cordero MI, Touyarot K, Venero C (2001) Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. Neurosci 102: 329-339.

Schachner M (1991) Cell surface recognition and neuron-glia interactions. Ann NY Acad Sci 633: 105-112

Schmahmann, JD, Pandya, DN (1997) Anatomic organization of the basilar pontine projections from prefrontal cortices in rhesus monkey. Neurosci 17: 438-458

Schmahmann JD, Rosene DL, Pandya DN (2004) Motor projections to the basis pontis in rhesus monkey. Comp Neurol 478: 248-268

Schmahmann JD, Pandya DN (2004) The cerebrocerebellar system. Int Rev Neurobiol 41: 31-60

Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. Prog Neurobiol 72: 295-339

Tacke R, Moos M, Teplow DB, Fruh K, Scherer H, Bach A, Schachner M (1987) Identification of cDNA clones of the mouse neural cell adhesion molecule L1. Neurosci Lett 82: 89-94

Takeda Y, Asou H, Murakami Y, Miura M, Kobayashi M, Uyemura K (1996) A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. J Neurochem 66: 2338-2349

Thelin J, Waldenstrom A, Bartsch U, Schachner M, Schouenborg J (2003) Heat nociception is severely reduced in a mutant mouse deficient for the L1 adhesion molecule. Brain Res 965: 75-82

Thor G., Probstmeier R., Schachner M (1987) Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. EMBO J 6: 2581-2586

Van den Buuse M, Garner B, Koch M (2003) Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. Curr Mol Med 3: 459-471

Venero C, Tilling T, Hermans-Borgmeyer I, Herrero AI, Schachner M, Sandi C (2004) Water maze learning and forebrain mRNA expression of the neural cell adhesion molecule L1. J Neurosci Res 75: 172-181

Vogel MW, Sunter K, and Herrup K (1989) Numerical matching between granule and Purkinje cells in lurcher chimeric mice: a hypothesis for the tropic rescue of granule cells from target-related cell death. J Neurosci 9: 3454-3462

Watanabe D, Inokawa H, Hashimoto K, Suzuki N, Kano M, Shigemoto R, Hirano T, Toyama K, Kaneko S, Yokoi M, Moriyoshi K, Suzuki M, Kobayashi K, Nagatsu T, Kreitman RJ, Pastan I, Nakanishi S (1998) Ablation of cerebellar Golgi cells disrupts synaptic integration involving GABA inhibition and NMDA receptor activation in motor coordination. Cell 95: 17-27

Weller S, Gärtner J (2001) Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1Cam gene. Hum Mutat 18: 1-12

Wetts R, Herrup K (1983) Direct correlation between Purkinje and granule cell number in the cerebella of lurcher chimeras and wild-type mice. Dev Brain Res 10: 41-47

Wolpert DM, Ghahramani Z, Jordan MI (1995) An internal model for sensorimotor integration. Science 269: 1880-1882.

Wolpert DM, Miall RC, Kawato M (1998). Internal models in the cerebellum. Trends in Cognitive Sciences 2:338-347

Wood PM, Schachner M, Bunge RP (1990) Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. J Neurosci 10: 3635-45

Wright AG, Demyanenko GP, Powell A, Schachner M, Enriquez-Barreto L, Tran TS, Polleux F, Maness PF (2007) Close homolog of L1 and neuropilin 1 mediate guidance of thalamocortical axons at the ventral telencephalon. J Neurosci 27: 13667-13679

Yang Q, Hamberger A, Hyden H, Wang S, Stigbrand T, Haglid KG (1995) S-100 beta has a neuronal localisation in the rat hindbrain revealed by an antigen retrieval method. Brain Res 696: 49-61

Zhang Y, Roslan R, Lang D, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN. (2000) Expression of CHL1 and L1 by neurons and glia following sciatic nerve and dorsal root injury. Mol Cell Neurosci 16: 71-86

8. ANHANG

8.1 Tabelle 1:
Primäre Antikörper, die in dieser Studie verwendet wurden

Antigen	**Wirt**	**Code/Klon**	**Verdünnung**	**Quelle**	**Identifizierte Zelltypen**	**Literatur**
Neuron-specific nuclear antigen (NeuN)	Maus	A60	1:1000	Chemicon	*Cerebellum:* Interneurone der Molekularschicht, Körnerzellen *Visueller Kortex:* Pyramidenzellen	Wolf et al., 1996
Parvalbumin (PV)	Maus	PARV-19	1:1000	Sigma	*Cerebellum:* Purkinjezellen *Visueller Kortex:* GABAnerge Interneurone	Celio, 1990
Neurogranin	Kaninchen	AB5620	1:1000	Chemicon	Golgi-Interneurone	Singec et al., 2003 ; Simat et al., 2007
S-100	Kaninchen	Z0311	1:500	Dako Cytomation	Astrozyten, Bergmann-Glia	Ghandour et al., 1981
2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)	Maus	11-5B	1:1000	Sigma	Oligodendrozyten	Sprinkle et al., 1987; Sprinkle, 1989
Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1)	Kaninchen	019-19741	1:1500	Wako Chemicals	Mikroglia	Imai and Kohsaka, 2002

8.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CALL	“Cell adhesion L1 like”
CAM	Zelladhäsionsmolekül
CCAS	cerebelläres kognitives Affektivitätssyndrom
cDNA	komplementäre DNA
CHL1	“Close homologue of L1”
CHL1-/-	CHL1-negativ (Knockout)
CHL1+/+	CHL1-positiv (Wildtyp)
cm	Zentimeter
CNPase	2´,3´-zyklische-Nukleotid 3´-Phosphodiesterase
CRASH	“Corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraplegia and hydrocephalus”
Cy3	rot floureszierendes Carbocyanin 3
DNS	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
IGL	innere Körnerzellschicht
Intern.	Interneurone
kD	Kilodalton

cm^3	Kubikzentimeter
l	Liter
LTP	Langzeitpotenzierung
M	molar
m	Meter
mm	Millimeter (Meter × 10^{-3})
ml	Milliliter (Liter ×10^{-3})
ML	Molekularschicht
n	Anzahl
NaOH	Natriumhydroxid
NaN3	Natriumazid
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NCAM-/-	NCAM-negativ (Knockout)
NCAM+/+	NCAM-positiv (Wildtyp)
NeuN	spezifisches neuronales Kernantigen
NgCAM	„neuron-glial cell adhesion molecule“
nm	Nanometer
NrCAM	„NgCAM related cell adhesion molecule”
Npn 1	Neuropilin 1
P	postnatal
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pH	p(otential) von H(ydrogen), Logarithmus der reziproken Oxoniumionenkonzentration
PL	Purkinjezellschicht
PNS	Peripheres Nervensystem
PPI	Prepuls-Inhibition
PSA	Polysialinsäure
Purk.	Purkinje

PV	Parvalbumin
p	p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
μm^2	Quadratmikrometer
cm^2	Quadratzentimeter
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sema3A	Semaphorin 3A-Rezeptor
s.o.	siehe oben
SPF	spezifisch pathogen-frei
u.a.	unter anderem
V	Volumen
v.a.	vor allem
wt	wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
µ	Mikro (10^{-6})
°C	Grad Celsius

8.3 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Melitta Schachner bedanken, die mir das Thema überlassen und mir die Arbeit an ihrem Institut ermöglicht hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Andrey Irintchev. Er hat mich geduldig in die praktischen Tätigkeiten eingewiesen und ist immer für Fragen offen gewesen. Ich danke ihm für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Igor Jakovcevski bedanken, der mich durch seine fachliche Kompetenz und generelle Hilfsbereitschaft unterstützt hat.

Emanuela Szpotowicz danke ich für die Präparation der Mäuse und Vorbereitung der Schnitte.

Auch bedanke ich mich bei den freundlichen Kollegen aus dem Institut, die mir viele Fragen beantwortet und mir beim Umgang mit dem Mikroskop und dem Computer geholfen haben.

Mein Dank gilt auch meinem Freund und meinen Eltern, die mich geduldig bei dieser Arbeit begleitet haben.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Janina Effi Siering
Geburtsdatum:	06.12.1982
Geburtsort:	Braunschweig
Konfession:	evangelisch lutherisch

Ausbildung

1989 - 1993	Grundschule Rautheim, Braunschweig
1993 - 1997	Integrierte Gesamtschule Querum, Braunschweig
1997 - 2002	Gymnasium Neue Oberschule, Braunschweig mit Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur, Note: 2,0)
10/2002	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
2004	Abschluss der Ärztlichen Vorprüfung (Physikum, Note: 1,0)
06/2006	Beginn der praktischen Arbeit für die Promotion am Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg bei Professor Dr. Melitta Schachner

8.5 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

_____

Janina Effi Siering