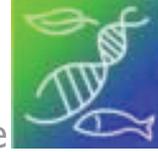




Universität Hamburg



Department Biologie

---

Morphologische und funktionelle Analyse  
heterozygot L1 defizienter Mäuse (*Mus musculus*, Linné 1758)

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften

*Dr. rerum naturalium*

des Departments Biologie  
der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg

---

vorgelegt von

Janinne Sylvie Schmid

Hamburg, März 2009

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. M. SCHACHNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. K. WIESE  
Tag der Disputation: 27. März 2009

Hamburg, den 13. März 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie



„Das ist, äh, eine Doktorarbeit.“

„Eine Doktorarbeit?“ lachte Smeick. „Jetzt bin ich aber erleichtert.  
Ich dachte schon, es sei eine schreckliche Krankheit.“

„Das ist eine Doktorarbeit gewissermaßen auch.“

(Aus Walter Moers' „Rumo“, 2004)



---

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	2
1.1	Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 (L1CAM).....	3
1.1.1	Gen und Protein.....	5
1.1.2	Interaktionspartner und Funktionen.....	6
1.2	Das L1-Syndrom .....	8
1.2.1	Mutationen im <i>L1</i> Gen.....	9
1.2.2	X-Inaktivierung und heterozygote Trägerinnen .....	12
1.3	Mausmodelle .....	14
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	18
<b>2.</b>	<b>Material</b> .....	20
2.1	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	20
2.2	Lösungen und Puffer .....	23
2.3	Medien und Zusätze.....	28
2.4	Bakterien .....	29
2.5	Enzyme und Kits .....	29
2.6	DNA-, RNA- und Proteingrößenstandards (Marker).....	30
2.7	Plasmide.....	30
2.8	Oligonukleotide (Primer) .....	31
2.9	Antikörper und Kernfarbstoffe .....	32
2.9.1	Primärantikörper .....	32
2.9.2	Sekundärantikörper .....	33
2.9.3	Kernfarbstoffe .....	33
2.10	Geräte .....	34

---

---

2.11	Software und Internetquellen .....	35
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>37</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (DH5 $\alpha$ ).....	37
3.1.2	Erhaltung von Bakterienstämmen (Glycerol-Stock) .....	37
3.1.3	Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	37
3.1.4	Plasmidisolierung aus 1,5 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen.....	38
3.1.5	Plasmidisolierung aus 200 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen .....	38
3.1.6	Restriktionsverdau von DNA .....	39
3.1.7	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	39
3.1.8	Genotypisierung mittels PCR (multiplex PCR) .....	40
3.1.9	Poly-Adenylierung von PCR-Produkten .....	40
3.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	41
3.1.11	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	41
3.1.12	Gelelektrophorese .....	41
3.1.13	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	42
3.1.14	DNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration .....	42
3.1.15	DNA-Sequenzanalyse.....	42
3.1.16	RNA-Isolierung aus Gesamtgehirn.....	43
3.1.17	Aufreinigung der RNA.....	43
3.1.18	RNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration.....	44
3.1.19	Reverse Transkription.....	44
3.1.20	Northern Blot.....	45
3.1.21	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin– sowie radioaktiv markierten Sonden..	48
3.1.22	Microarray .....	52
3.1.23	Semiquantitative <i>Realtime</i> -PCR (qPCR).....	52

---

---

3.2	Biochemische Methoden .....	57
3.2.1	Isolierung von Protein .....	57
3.2.2	Proteinbestimmung (BCA-Test).....	57
3.2.2	Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	58
3.2.3	Western Blot.....	58
3.3	Immunhistomorphologie .....	60
3.3.1	Versuchstiere .....	60
3.3.2	Präparation der Gewebe .....	60
3.3.3	Immunfärbung.....	61
3.3.4	Analyse und Statistik .....	62
4.	<b>Ergebnisse</b> .....	64
4.1	Charakterisierung der Mauslinie L1ki129 .....	65
4.1.1	Expression der mRNA .....	65
4.1.2	Lokalisation von mRNA und Protein.....	67
4.1.3	Proteinexpression.....	69
4.2	Analyse heterozygot L1 defizienter Tiere .....	71
4.2.1	Physiologische Untersuchungen .....	71
4.2.2	Histomorphologische Analyse .....	75
4.2.3	Differentielle Genexpression.....	87
5.	<b>Diskussion</b> .....	92
5.1	Die RNA-Expression ist in mutanten Tieren nicht aufgehoben, in homozygot L1 defizienten Mäusen jedoch reduziert.....	92
5.2	L1 Knockout-Mäuse der Linie L1ki129 zeigen einen kompletten Verlust der Proteinexpression im Gehirn (Nullmutation), bei heterozygot L1 defizienten Tieren ist diese um 50% reduziert. ....	94
5.3	Tiere der Linie L1ki129 stellen ein gutes Mausmodell für das L1-Syndrom dar.....	95

---

---

5.4	In L1 Knockout Mäusen ist das Volumen der Seitenventrikel vergrößert, in heterozygot L1 defizienten Mäusen dagegen verringert. ....	97
5.5	Der heterozygote Status L1 defizienter Tiere geht mit einer erhöhten Proteinsynthese sowie einer Azidose im Gehirn einher.....	97
5.6	Die neuronale Dichte ist in jungen und adulten heterozygot L1 defizienten Mäusen im sensomotorischen Cortex erhöht. ....	98
5.7	Sowohl die Proliferation als auch die Apoptose sind unverändert in heterozygot L1 defizienten Tieren.....	100
5.8	Die neuronale Differenzierung unterscheidet sich nicht zwischen heterozygot L1 defizienten und Wildtyp-Tieren.....	101
5.9	In heterozygot L1 defizienten Mäusen konnten keine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen dysregulierten Gene nachgewiesen werden. ....	102
5.10	Mögliche funktionelle Ursachen.....	104
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>109</b>
<b>7.</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>113</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>122</b>
9.1	Zusätzliche Tabellen.....	122
9.2	Abbildungsverzeichnis .....	126
9.3	Tabellenverzeichnis.....	127
9.4	Abkürzungen und Einheiten .....	128
	Lebenslauf.....	132
	Danksagung .....	132

---

# EINLEITUNG

---

## 1. Einleitung

„Das Gehirn ist ein präzises Netzwerk aus mehr als 100 Milliarden einzelner Nervenzellen. Diese Nervenzellen sind zu Systemen verbunden, die uns die Wahrnehmung unserer Umwelt ermöglichen, unsere Aufmerksamkeit fixieren und unsere Handlungen steuern“ (Eric Kandel)<sup>1</sup>.

Bei Mammalia besteht das im wesentlichen bilateralsymmetrische Zentralnervensystem (ZNS) aus sieben Hauptteilen: Rückenmark, Medulla oblongata (verlängertes Mark), Pons (Brücke), Cerebellum (Kleinhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Diencephalon (Zwischenhirn) und Telencephalon (Vorder- oder Großhirn) mit seinen beiden Hemisphären. Im Zentralnervensystem spielt das Großhirn eine übergeordnete Rolle; unter anderem filtert es sensorische und motorische Informationen und ordnet sie ein. Die stark gefurchte Großhirnrinde wird als Cortex cerebri bezeichnet. In jeder der beiden Hemisphären ist der Cortex in vier anatomisch gut abgrenzbare Hirnlappen unterteilt, die für spezielle Aufgaben, wie Sprache und andere kognitive Funktionen, zuständig sind.

Das gesamte Nervensystem eines Vertebraten entwickelt sich aus dem Ektoderm, der äußersten Schicht des frühen Embryos. Die sogenannte Neuralplatte erscheint zunächst als ein verdicktes säulenförmiges Epithel. Beim Vorgang der Neurulation faltet sich die Neuralplatte zu einer röhrenartigen Struktur ein, dem Neuralrohr. Durch die starke Teilungsaktivität der Zellen im vorderen Abschnitt des Neuralrohrs kommt es zur Bildung des primitiven Vorder- und Mittelhirns; Zellen im hinteren Abschnitt bilden das spätere Hinterhirn und das Rückenmark.

In vielen Regionen des Zentralnervensystems sind die Neuronen in definierten Schichten angeordnet, so z.B. in der Großhirnrinde. Die Organisation der Rindenschichten kommt durch eine von innen nach außen ablaufende Folge der neuronalen Differenzierung zustande. Die Neuronen, die in frühen Stadien der Cortexentwicklung entstehen, siedeln sich in den tiefsten Rindenschichten an, während jene, die in späteren Stadien gebildet werden, in immer höheren Schichten ihre endgültige Position finden. Alle sich entwickelnden Neurone stammen von Neuroblasten ab, die ihren Ursprung in der Ventrikulärzone, die an

---

die Seitenventrikel angrenzt, haben. Neurone, die später gebildet werden, müssen daher an älteren Neuronen, die bereits ihren Bestimmungsort in der Großhirnrinde gefunden haben, vorbeiwandern. Ähnliche Vorgänge der Zellwanderung lassen sich auch bei zahlreichen anderen geschichteten Strukturen im Gehirn beobachten.

Für die Wegfindung eines Axons sind chemische Faktoren oder Leitmoleküle notwendig. Eine Gruppe von Membranproteinen, die sogenannten Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAM) fungieren als wichtige Leitmoleküle. Durch adhäsive Zell-Zell-Kontakte zwischen Molekülen des Wachstumskegels eines Neurons (einer spezialisierten Struktur an der Spitze des auswachsenden Axons) und Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Nachbarzellen oder in der extrazellulären Matrix, ist die zielgerichtete Führung von Axonen möglich. Die Gruppe der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle lässt sich in fünf Familien einteilen: Cadherine<sup>2, 3</sup>, Integrine<sup>4, 5</sup>, Selektine<sup>6, 7</sup>, Moleküle der extrazellulären Matrix<sup>4, 8</sup> und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie<sup>9, 10</sup>. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf das zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende, besonders interessante und gut untersuchte neurale Zelladhäsionsmolekül L1.

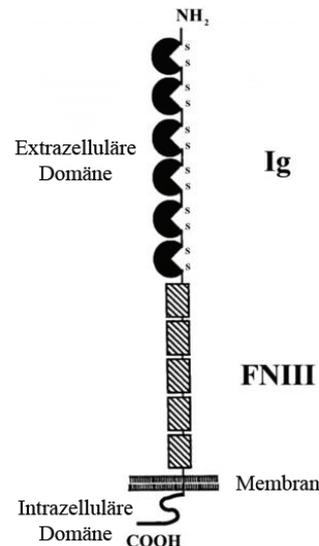
## 1.1 Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 (L1CAM)

Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 wurde erstmals 1984 von Frau Prof. Schachner beschrieben (antigen identified by monoclonal antibody R1)<sup>11</sup>. Es ist ein Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle. CAMs sind auf der Zelloberfläche lokalisiert und entweder durch eine Transmembrandomäne oder eine Glykosylphosphatidylinositolbindung (GPI-Anker) mit der Membran verbunden. L1 ist ein transmembranes Glykoprotein mit einer Masse von ca. 200kDa<sup>12-14</sup>.

Wie in **Abb. 1.1** dargestellt, setzt sich der extrazelluläre Teil aus sechs ähnlichen Ig-Domänen zusammen, gefolgt von fünf Fibronektin-Typ III FNIII-Domänen. Jede Ig-Domäne besteht aus 110 Aminosäuren und bildet eine  $\beta$ -Faltblattstruktur, fixiert durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen je zwei Cysteinen im Abstand von 55 AS. Die folgenden FNIII-Domänen weisen eine Länge von jeweils 90 AS auf. L1 besitzt eine einfache, die Membran nur einmal durchquerende, durchspannende Transmembrandomäne aus 23 hydrophoben AS, gefolgt von einem kurzen (114 AS langen) zytoplasmatischen Anteil<sup>9, 15</sup>.

---

Dieser Aufbau ist bei Säugern hochkonserviert: 80-95% der Aminosäuren in der extrazellulären sowie 100% der Aminosäuren in der zytoplasmatischen Domäne variieren nicht in dieser Klasse<sup>16</sup>.

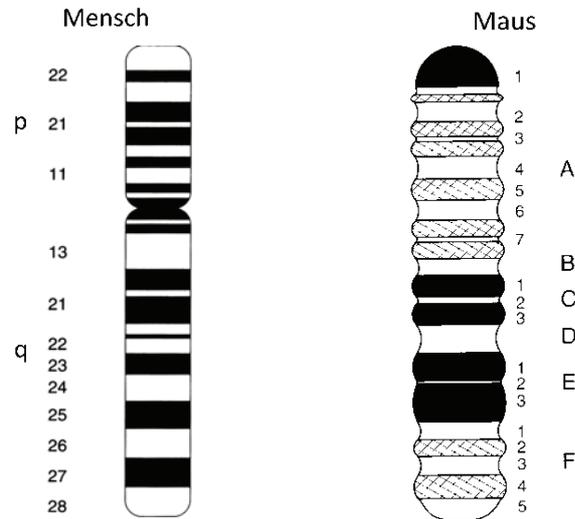


**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1.** Charakteristikum der Immunglobulin-Superfamilie sind die Ig-Domänen im extrazellulären Bereich (dunkle Loops). Einige Vertreter dieser Familie (z.B. L1) verfügen über sich anschließende FNIII-Domänen (schraffierte Rechtecke), der intrazelluläre Bereich ist hoch konserviert (nach Hortsch<sup>17</sup>).

In Vertebraten bildet L1 mit anderen verwandten Molekülen die L1-Subfamilie: Phylogenetisch gehören beim Menschen hCHL1 (*close homolog of L1*), NrCAM (NgCAM-*related molecule*) und Neurofascin zur L1 Unterfamilie<sup>17</sup>. Daneben sind die folgenden zu L1 homologen Moleküle bei Vertebraten bekannt: l1 in der Maus<sup>11</sup>, NILE (*nerve-growth factor-inducible large external glycoprotein*) in der Ratte<sup>18, 19</sup>, NgCAM (*neuron-glia cell adhesion molecule*) im Huhn<sup>20, 21, 22</sup>, L1.1 und L1.2 im Zebrafisch, Fugu und Goldfisch<sup>23</sup>, Tractin beim Blutegel<sup>24</sup>, Neuroglian in der Fruchtfliege *Drosophila* und im Falter *Manduca*<sup>25</sup> sowie Lad-2 in *C. Elegans*<sup>26</sup>.

### 1.1.1 Gen und Protein

Das Gen, das das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 codiert, ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Der Genlocus befindet sich beim Menschen nahe dem Telomer des langen Arms, an Position Xq28<sup>27</sup>, bei der Maus liegt er an Position A6-B des X-Chromosoms (**Abb. 1.2**).



**Abb. 1.2: Organisation des X-Chromosoms bei Mensch und Maus.** Es lassen sich mindestens acht verschiedene homologe Bereiche definieren, die jeweils mehrere orthologe Gene und DNA-Sequenzen enthalten. (Strachan und Read, S.255)

*L1* ist ein *single copy* Gen. Die genomische DNA umfaßt 16kb und beinhaltet 28 Exons. Exon 1 und 2 werden nicht translatiert. Exon 3 bis 14 kodieren die sechs Ig- Domänen, Exon 15 bis 24 die fünf FNIII-Domänen, Exon 25 die Transmembrandomäne und Exon 26 bis 28 den C-terminalen zytoplasmatischen Anteil<sup>28, 29</sup>. Das offene Leseraster (*open reading frame*, ORF) erstreckt sich über 3825bp. Die 4,5kb große mRNA kodiert beim Menschen für ein 1275 Aminosäuren langes Protein. Das native Protein besitzt 19 weitere AS, dieses Signalpeptid wird allerdings proteolytisch abgespalten. Zwei Exone können alternativ gespleißt werden: Exon 2, Teil des N-terminalen Endes des Proteins, und Exon 27, das 4 AS in der zytoplasmatischen Domäne betrifft. In Leukozyten tritt ein um beide Exone verkürztes L1-Molekül auf, einer Isoform in Schwann'schen Zellen fehlt Exon 27<sup>30, 31</sup>.

Das Expressionsmuster von L1 ist zeitlich und räumlich determiniert. Die Expression setzt relativ spät in der Entwicklung ein, bei der Maus ab dem 10. Tag der Embryonalentwicklung (E10)<sup>32-34</sup>.

Während der Entwicklung wird L1 auf der Oberfläche wachsender Axone und auf Wachstumskegeln postmitotischer Neurone<sup>13</sup> sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem sowie auf Schwann'schen Zellen des peripheren Nervensystem exprimiert<sup>35</sup>. Im adulten Nervensystem ist die Expression von L1 auf nicht myelinisierte Axone beschränkt. Darüber hinaus wird L1 auch in nicht-neuronalen Geweben beschrieben: im Darm<sup>36</sup>, im Immunsystem<sup>37, 38</sup>, im männlichen Urogenitaltrakt<sup>39</sup>, in der Niere<sup>40</sup> und in Epithelien, u.a. der Lunge<sup>41</sup>. L1 ist auch in mehreren peripheren Tumoren nachweisbar, so z.B. in Pankreas-, Ovarial-, Brust- und Kolonkarzinomen<sup>42, 43, 44, 45</sup>. L1 wurde außerdem häufig mit Metastasierung und einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht<sup>46</sup>. Bei Kindern mit Neuroblastom ist L1 dagegen mit einem positiven Verlauf der Erkrankung assoziiert<sup>47</sup>.

### 1.1.2 Interaktionspartner und Funktionen

Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 ist essentiell für die Entwicklung des Nervensystems, spielt aber auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle. Es übt seine Funktionen sowohl über Zelladhäsion als auch über Signaltransduktion aus.

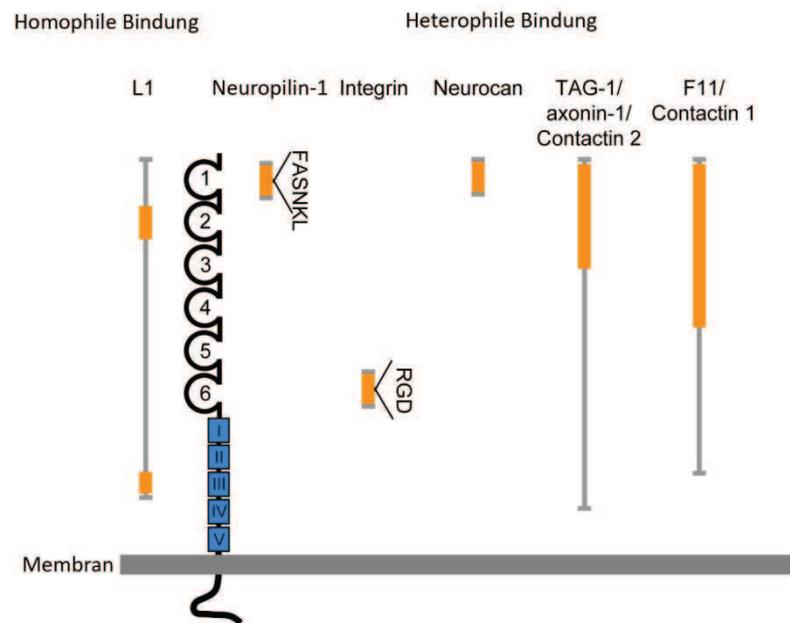
L1 kann mit der zweiten Ig- und der dritten FNIII-Domäne des extrazellulären Anteils homophile Bindungen eingehen, d.h. mit einem zweiten L1-Molekül interagieren<sup>48</sup>. Dies geschieht entweder in *cis* Position, wobei zwei Moleküle derselben Zelle miteinander in Wechselwirkung treten, oder die Interaktion findet in *trans* statt, so daß zwei Moleküle auf unterschiedlichen Zellen eine Bindung eingehen. Zusätzlich zur homophilen Bindung wurde für L1 eine Bindung mit anderen Molekülen, die sogenannte heterophile Bindung, nachgewiesen. Heterophile Bindungspartner können entweder lösliche oder unlösliche Moleküle der extrazellulären Matrix sein, wie Laminin, Neurocan oder Phosphocan, oder sie stammen aus der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle, z.B. der Ig-Superfamilie oder der Integrine<sup>17, 49</sup>. Wie homophile Bindungen können auch heterophile Bindungen in *cis* und in *trans* Position stattfinden.

Darüber hinaus kann L1 mit der zytoplasmatischen Domäne Bindungen eingehen. Dies kann durch direkte Interaktion mit dem Zytoskelett sowie durch Signaltransduktion über *second messenger* oder Kinasen und Phosphatasen, denen L1 als Substrat dient, geschehen<sup>50</sup>. Die

---

Fähigkeit mit einer großen Zahl anderer Moleküle zu interagieren, ermöglicht L1 so unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung und bei regenerativen Prozessen auszuüben.

Die verschiedenen extrazellulären Interaktionspartner von L1 sowie die an der Bindung beteiligten Regionen sind in der folgenden Abbildung (**Abb. 1.3**) zusammengefasst.



**Abb. 1.3: Schematische Übersicht der extrazellulären Bindungspartner und -domänen von L1.** Über die Ig2- und die dritte FNIII-Domäne kann L1 homophile Bindungen eingehen. Heterophile Interaktionen finden v.a. über die Ig-Domänen mit folgenden Zelladhäsionsmolekülen bzw. Molekülen der Extrazellulären Matrix statt: Neuropilin-1 Konsensussequenz FASNKL, Ig1-Domäne, Integrine (RGD-Motif, Ig6), Neurocan (Ig1) und Contactine (diese benötigen mehrere zusammenhängende Domänen). Die zentralen Bindungsstellen sind orange markiert, die grauen Regionen sind ebenfalls an der Bindung beteiligt.

L1 übt im Nervensystem vielfältige Funktionen aus. Eine wichtige Funktion ist die Vermittlung der Adhäsion zwischen Neuronen bzw. zwischen Neuronen und Schwann'schen Zellen<sup>11, 51</sup>. Während der Entwicklung des Gehirns spielt L1 eine äußerst wichtige Rolle für die Proliferation, die Organisation des Wachstumskegels, das Auswachsen von Axonen, die Migration der Neurone, die axonale Wegfindung und die Axonbündelung (Faszikulierung). Im peripheren Nervensystem ist L1 zudem an der Myelinisierung beteiligt<sup>52, 53, 54</sup>. Im reifen Nervensystem ist L1 an Lern- und Gedächtnisvorgängen (Langzeit-Potenzierung, synaptische Plastizität) sowie an der Regeneration nach Verletzungen beteiligt<sup>55</sup>.

Die Funktionen von L1 in der Entwicklung des Nervensystems werden besonders deutlich bei der Betrachtung seiner Mutationen und deren Folgen.

## 1.2 Das L1-Syndrom

Das Gen für das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Mutationen im *L1* Gen sind für ein breites Spektrum neurologischer Erkrankungen mit geistiger Unterentwicklung verantwortlich.

Bickers und Adams beschrieben 1949 erstmals das HSAS-Syndrom (Hydrozephalus durch Stenose des *Aquaeductus Sylvii*) als eine Erkrankung, die auf eine gonosomal rezessive Mutation zurückzuführen sei<sup>56</sup>. 1961 wurde die Erkrankung von Edwards wiederentdeckt<sup>57</sup>. Seitdem gab es zahlreiche Berichte über Familien mit ähnlichen Formen X-chromosomal gekoppelter geistiger Retardierung und Anomalitäten in der Entwicklung des Nervensystems. Das Spektrum klinischer Auffälligkeiten variierte dabei stark, bestimmte Charakteristika traten allerdings vermehrt auf: ein niedriger Intelligenzquotient (20-60), ein vergrößerter oder asymmetrischer Kopf, spastische Lähmungen der Beine, Aphasie und adduzierte Daumen (**Abb. 1.4**). Neben HSAS wurden so noch drei weitere X-chromosomal gekoppelte Syndrome mit denselben charakteristischen Symptomen beschrieben: MASA (**M**entale Retardierung, **A**phasie, **S**chlurfender Gang, **A**ngewinkelte Daumen), SP1 (Spastische Paraparese Typ I) und ACC (Agenesie des Corpus Callosum).

1992 fanden Rosenthal *et al.* die erste *L1*-Mutation in einer Familie mit HSAS<sup>58</sup>. Durch umfangreiche genetische Untersuchungen der beiden Arbeitsgruppen von Susan Kenwrick und Patrick J. Willems konnte 1995 gezeigt werden, daß es sich bei den vier X-chromosomal gekoppelten Syndromen geistiger Retardierung mit Gehirnmißbildungen (HSAS, MASA, SP1, ACC) um unterschiedlich schwere Ausprägungen eines klinischen Krankheitsbildes handelt<sup>59</sup>. Alle sind auf Mutationen im *L1* Gen zurückzuführen und wurden aus diesem Grund zunächst unter dem Akronym „CRASH“-Syndrom (*corp*us *callosum* *hypoplasia*, *retardation*, *adducted thumbs*, *spastic paraparesis* and *hydrocephalus*) zusammengefaßt<sup>60</sup>, das später aus Pietätgründen durch die neutralere Bezeichnung „L1-Syndrom“ ersetzt wurde<sup>61</sup>.

Das L1-Syndrom (OMIM #308840) ist eine seltene X-chromosomal gekoppelte Erkrankung und tritt mit einer Häufigkeit von ca. 1:30000 auf<sup>62</sup>. Gemeinsame Hauptmerkmale der vier, oben genannten, neurologischen Erkrankungen sind ein Hydrozephalus, geistige

---

Retardierung, eine spastische Lähmung sowie „eingeschlagene“ (adduzierte) Daumen. Die inter- und intrafamiliäre Variabilität der Ausprägung der Krankheit ist sehr hoch, was wahrscheinlich auf die Multifunktionalität von L1 zurückzuführen ist. Meist treten gemischte Phänotypen der einzelnen Symptome auf (Polyphänie, pleiotrope Manifestation).



**Abb. 1.4:** „Eingeschlagener“ Daumen. Durch eine angeborene Hypo- oder Aplasie des langen Daumenstreckers (*M. extensor pollicis longus*) treten zur Handfläche hingezogene Daumen auf. Dieses für das L1-Syndrom typische Symptom wurde 1976 erstmals von Holtzman *et al.* beschrieben<sup>63</sup>.

### 1.2.1 Mutationen im L1 Gen

Missense Mutationen, Mutationen in den *Splice* Stellen, *frameshift* und *nonsense* Mutationen, Deletionen sowie Duplikationen kommen verteilt über das gesamte L1 Gen vor, es gibt jedoch keine „hot spots“. Bis zum jetzigen Zeitpunkt (Stand Okt. 2006) sind 178 verschiedene Mutationen in 206 unabhängigen Familien beschrieben<sup>64</sup>.

Das Spektrum klinischer Auffälligkeiten, das durch Mutationen im L1 Gen verursacht wird, ist komplex und sehr variabel. Die Mutationen können allerdings entsprechend ihrer Lage und damit ihrer Auswirkungen (auf Expression und Struktur des Proteins und damit auf die Ausprägung der Erkrankung) in drei Kategorien eingeteilt werden. Während in jeder Klasse Individuen mit unterschiedlichem Schweregrad bestimmter Symptome zu finden sind, wobei der genetische Hintergrund oder andere von L1 unabhängige Faktoren möglicherweise eine Rolle spielen, sind zwischen den drei Klassen eindeutige Unterschiede zu beobachten<sup>65</sup>. Die starke Korrelation zwischen Mutationstyp und Schwere der Erkrankung ist in **Tab. 1.1** zusammengefaßt.

Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne (CD; C-terminales Ende des Proteins) werden als Klasse I bezeichnet. *Missense* oder *nonsense* Mutationen, frameshifts oder große

Rearrangements wie Duplikationen oder Deletionen führen zu Störungen in der Signaltransduktion über *second messenger* in der Zelle sowie zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts. Die extrazelluläre sowie die Transmembrandomäne bleiben intakt und somit auch die L1-vermittelte Zelladhäsion.

In der Klasse II werden *missense* Punktmutationen in der extrazellulären Domäne (Ektodomäne, ED) von L1 zusammengefaßt. Das mutierte Protein bleibt membranständig, die Transmembrandomäne und der zytoplasmatische Anteil sind nicht betroffen. Wahrscheinlich ist die Bindungskapazität von L1 zu seinen Liganden durch eine veränderte Faltung der Ig-Domänen beeinträchtigt. Allerdings betrifft dies, auf Grund der unterschiedlichen Bindungsstellen, nicht gleichzeitig alle Bindungspartner.

Zur Klasse III gehören *nonsense* oder *frameshift* Mutationen im extrazellulären Bereich, die zu einem verfrühten Abbruch der Translation und damit zu einem verkürzten Protein (*loss of function*) führen. Das mutierte Protein besitzt keine Transmembrandomäne und wird deshalb in den Extrazellulärraum sezerniert. Eine Zell-Zell-Adhäsion durch L1 ist damit nicht mehr möglich. Auch Signalkaskaden über L1-assoziierte Kinasen und die Interaktion mit dem Zytoskelett über Ankyrin können nicht stattfinden. Dennoch kann das lösliche L1 zum Teil Funktionen ausüben, wie die Aktivierung des FGF-Rezeptors oder die Bindung der Liganden TAG-1, F3/F11 und Phosphocan, was möglicherweise zu abnormen Signalkaskaden oder einer kompetitiven Inhibition führt. Mutationen der Klasse III führen in den meisten Fällen zu einem gravierenden Phänotyp, Mutationen der Klasse I zur einer milderer Ausprägung der Erkrankung<sup>66, 67</sup>.

---

**Tab. 1.1: Mit L1 Mutationen assoziierte Anomalitäten des Nervensystems** (nach Kamiguchi<sup>65</sup>)

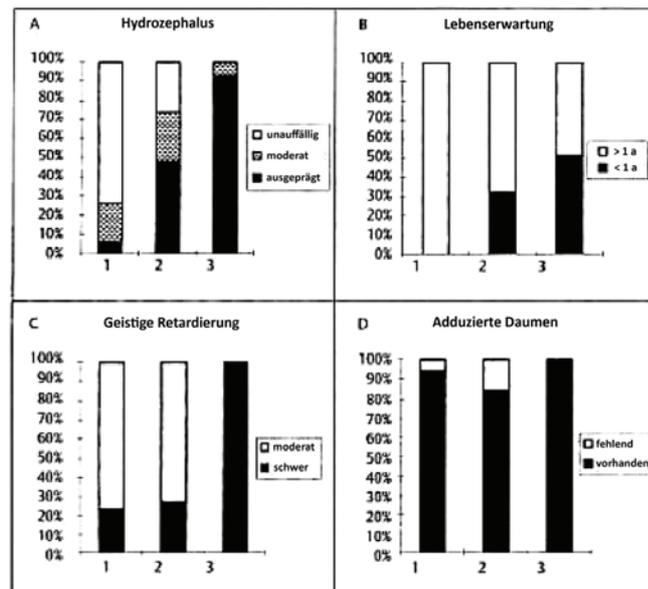
	Humane L1 Mutationen		
	Klasse I Mutation in der CD	Klasse II <i>missense</i> Mutation in der ED, Konformations- änderung möglich	Klasse III <i>nonsense</i> oder <i>frameshift</i> Mutation → verkürztes Protein
Dilatation der Ventrikel	selten	moderat	schwerwiegend
Lebenserwartung	> 1 Jahr	30% < 1 Jahr	50% < 1 Jahr
Lernfähigkeit und Gedächtnis	in 25% der Fälle IQ <50	in 25% der Fälle IQ <50	IQ <50
Spastische Paraparese (Hypoplasie des Corticospinaltrakts)	sehr häufig	sehr häufig	sehr häufig
Vermis cerebelli (Kleinhirnwurm)	Hypoplasie*	Hypoplasie*	Hypoplasie*
Corpus callosum (Balken)	Hypoplasie oder Aplasie*	Hypoplasie oder Aplasie*	Hypoplasie oder Aplasie*
Adduzierte Daumen	sehr häufig	sehr häufig	sehr häufig

\*Die Inzidenz wurde für die einzelnen Klassen nicht ermittelt.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutationen der drei oben beschriebenen Klassen lassen Rückschlüsse auf die Funktionen verschiedener Abschnitte des L1 Proteins zu.

Die angewinkelten Daumen, ein typisches und häufiges Symptom des L1-Syndroms, resultieren aus dem Verlust der Innervierung des *Musculus extensor pollicis longus* (langer Daumenstrecker), der für die Extension und Adduktion der Daumen sorgt<sup>63</sup>. Wahrscheinlich ist eine Fehlfunktion der zytoplasmatischen Domäne bzw. der Signaltransduktion hierfür verantwortlich, da Patienten mit Mutationen aller drei Klassen dieses Symptom zeigen.

Ein schwerer Hydrozephalus korreliert dagegen eher mit dem Verlust der Zelladhäsion. Bei Klasse I-Mutationen tritt dieses Merkmal selten auf (6%). Die Sterblichkeit und der Grad der geistigen Beeinträchtigung sind wahrscheinlich sekundäre Folgen des Hydrozephalus, wobei eine mentale Retardierung auch durch die fehlende Ausbildung neuronaler Verbindungen, unabhängig von einem Hydrozephalus, vorkommen kann (**Abb. 1.5**)<sup>68</sup>.



**Abb. 1.5: Korrelation der Klasse der L1 Mutation mit klinischen Befunden.** Dargestellt ist jeweils der Prozentsatz an Patienten mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad eines Hydrozephalus, Lebenserwartung, geistiger Retardierung und adduzierten Daumen (A – D). Die Ziffern 1 – 3 stehen für die Mutationsklassen I – III (aus Yamasaki<sup>68</sup>)

### 1.2.2 X-Inaktivierung und heterozygote Trägerinnen

Die bei Frauen auftretende Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen, die sogenannte Lyonisierung (nach der englischen Genetikerin Mary Frances Lyon<sup>69</sup>), findet bei allen Säugetieren statt. Sie führt bei den Weibchen zu einer selektiven Inaktivierung der Allele auf einem der beiden X-Chromosomen<sup>70</sup>. In jeder Zelle, aus der der weibliche Fetus entsteht, wird zufällig eines der beiden von den Eltern ererbten X-Chromosomen in stark komprimiertes Heterochromatin umgewandelt (Chromatinstrukturveränderung), so daß die Transkription inhibiert wird. In der Folge bleibt diese Inaktivierung in allen Tochterzellen erhalten und das Inaktivierungsmuster des X-Chromosoms wird klonal weitergegeben. Das bedeutet, daß in weiblichen Säugetieren Mosaik auftritt, da sie aus einer Mischung von Zelllinien bestehen, in denen entweder das von der Mutter oder das vom Vater erhaltene X-Chromosom inaktiviert ist (genetisch unterschiedliche Zelllinien, die von einer einzigen Zygote abstammen).

Zweck der Inaktivierung eines X-Chromosoms bei Säugern ist es, die Unterschiede im Verhältnis X-gekoppelter Gene in männlichen und weiblichen Zellen auszugleichen, für die es keine homologen Gene auf dem Y-Chromosom gibt (Gendosiskompensation). Für einige wenige X-chromosomal gekoppelte Gene gibt es jedoch auf dem Y-Chromosom funktionsfähige Gegenstücke (kleine pseudoautosomale Region an der Spitze des p-Arms).

Diese werden demzufolge nach der X-Inaktivierung exprimiert, unabhängig davon, ob sie sich auf dem aktiven oder dem inaktiven X-Chromosom befinden. Ein einmal inaktiviertes X-Chromosom bleibt ein Leben lang genetisch stumm. Während Männer mit ihrem einen X-Chromosom konstitutionell hemizygot für dessen Gene sind, werden Frauen dadurch funktionell hemizygot, daß eines ihrer beiden von den Eltern ererbten X-Chromosomen inaktiviert wird. Mensch und Maus weisen ein unterschiedliches Inaktivierungsmuster des X-Chromosoms auf<sup>71</sup>.

In der frühen Embryonalphase von Säugetieren sind beide X-Chromosomen aktiv. Die X-Inaktivierung beginnt mit den ersten Differenzierungsschritten, wenn der junge Embryo aus 1000 bis 2000 Zellen besteht. Bei Mäusen wird dieser Prozess im späten Blastulastadium eingeleitet: zuerst wird im extraembryonalen Trophektoderm spezifisch das paternale X-Chromosom inaktiviert, etwas später, zur Zeit der Gastrulation, erfolgt die Inaktivierung eines X-Chromosoms in den embryonalen Zelllinien; diese betrifft zufällig entweder das väterliche oder das mütterliche X-Chromosom. Bei der Entwicklung des Menschen wird sowohl in embryonalen als auch in extraembryonalen Zellen zufällig das paternale oder das maternale X-Chromosom stillgelegt<sup>72, 73</sup>.

Der Prozess der X-Chromosom-Inaktivierung ist komplex und hängt vom XIC (*X inactivation center*), einer besonderen chromosomalen Region, ab. Grundlegend für die Inaktivierung ist die Hemmung der Transkription, wobei zu Beginn wahrscheinlich das gesamte Chromosom blockiert ist, während man davon ausgeht, daß die Inhibierung im weiteren Verlauf Locus für Locus aufrechterhalten wird. Das XIST-Gen, das dafür direkt verantwortlich ist, wird ausschließlich vom inaktivierten X-Chromosom exprimiert. Seine 14kb lange, nichtkodierende RNA, das *X inactive specific transcript*, wird benötigt, um die Inaktivierung des X-Chromosoms zu initiieren. Andere molekulare Mechanismen sind dafür verantwortlich sind diese weiter aufrechtzuerhalten<sup>74</sup>. Die Stabilisierung geht mit einer Methylierung von CpG-Dinukleotid-Folgen in den Promotoren vieler Gene einher, verbunden mit einer Kondensierung des Chromatins zu genetisch stummen Heterochromatin.

Weibliche Trägerinnen einer Krankheit (Konduktorinnen) können auf der Ebene des gesamten Organismus heterozygot sein, jedoch funktionell exprimiert jede Zelle entweder das normale oder das mutierte Allel. Es läßt sich also nicht so eindeutig wie bei autosomalen Krankheiten zwischen dominant und rezessiv unterscheiden. Trägerinnen „rezessiv“ X-gekoppelter Krankheiten zeigen häufig einige Symptome, Frauen, die für „dominante“

---

Krankheiten heterozygot sind, sind dagegen im Vergleich zu erkrankten Männern in der Regel wesentlich schwächer und auch sehr unterschiedlich betroffen<sup>71, 75</sup>. Es wird in diesem Zusammenhang diskutiert, Erkrankungen generell nicht als gonosomal rezessiv oder dominant zu klassifizieren, sondern X-chromosomal gekoppelt mit einer unterschiedlichen Penetranz und einem variierenden Schweregrad der Symptome<sup>76</sup>.

Über die Inaktivierung der X-Chromosomen im Gehirn ist relativ wenig bekannt; sie ereignet sich kurz nach dem Beginn der Neurulation<sup>72</sup>. Folglich sollten zahlreiche Zellklone im Gehirn von heterozygoten Trägerinnen zu finden sein, die ein abnormes L1 exprimieren. Warum die Trägerinnen scheinbar nicht beeinträchtigt sind, ist nicht sicher geklärt. Es ist denkbar, daß Zellen, die ein nicht mutiertes *L1* Gen exprimieren, auf Grund ihrer Fähigkeit normal zu migrieren oder korrekte Verknüpfungen der Axone herzustellen, einen Überlebensvorteil gegenüber Zellen mit mutiertem *L1* haben. Folglich könnten Zellen von Klonen mit normalem L1 das sich entwickelnde Gehirn besiedeln, während Zellen mit mutiertem L1 im Verlauf der Apoptose eliminiert würden<sup>59</sup>.

Die große Mehrheit der Berichte gibt an, daß heterozygote Trägerinnen des L1-Syndroms nicht beeinträchtigt sind; in der Literatur werden allerdings auch einige wenige Fälle von betroffenen Trägerinnen beschrieben, obgleich die Symptome von deutlich geringerem Grad sind und meist einzeln auftreten. Kaepernick *et al.* dokumentierten neun Konduktorinnen: drei zeigten einen Hydrozephalus und starben nach der Geburt, drei wiesen eine Lernschwäche bzw. milde geistige Behinderung auf, zwei besaßen adduzierte Daumen und eine Überträgerin war symptomlos<sup>77</sup>. In einer neurophysiologischen Studie wurde eine reduzierte Funktion des kortikospinalen Systems und, dadurch bedingt, eine leichte Beeinträchtigung der Geschicklichkeit der Extremitäten festgestellt<sup>78</sup>. Wahrscheinlich ist der Phänotyp meist so schwach ausgeprägt, daß Trägerinnen deshalb nur selten klinisch auffällig werden. Patientinnen mit vollständiger Ausprägung des L1-Syndroms sind sehr selten, wurden jedoch auch beobachtet<sup>79, 80</sup>. Die Autoren hielten hier eine unvorteilhafte Lyonisierung für die Ursache.

### 1.3 Mausmodelle

Die Seltenheit des L1-Syndroms und somit die Schwierigkeit humane Gewebeproben für Expressionsanalysen im Gehirn zu erhalten, stellt ein großes Hindernis dar den direkten

---

Einfluß von Mutationen im *L1* Gen auf die Entwicklung des menschlichen Gehirns zu untersuchen. Das L1 Protein der Maus weist mit 88% eine hohe Homologie zum humanen Protein auf<sup>81</sup>. Die Untersuchung von transgenen Tieren ermöglicht somit einen alternativen Ansatz für diese Fragestellung. Bisher existieren drei unabhängig voneinander generierte L1 Knockout-Mauslinien, die große Ähnlichkeiten mit den klinischen Symptomen von Patienten mit L1-Syndrom aufweisen und als etablierte Mausmodelle für diese Erkrankung gelten.

Im Folgenden werden die drei Mauslinien nacheinander vorgestellt. Eine anschließende Tabelle (**Tab. 1.2**) faßt deren Charakteristika vergleichend zusammen.

In der Schweiz und in Großbritannien wurden parallel die ersten L1 Knockout-Mäuse hergestellt und 1997 publiziert<sup>82, 83</sup>. Bei der ersten führte die Insertion einer Thymidinkinase-Neomycin-Kassette in Exon 9 zur funktionellen Nullmutation (etwa 10% der RNA- und 0,3% der Protein-Expression verblieben), bei der zweiten wurde eine solche Kassette in Exon 13 und 14 inseriert. Drei Jahre später generierte Michael Kutsche in unserer Arbeitsgruppe eine weitere L1 Knockout-Maus. Hier wurde das *L1* Gen durch eine tTA-neo (Tetrazyklintransaktivator-Neomycinresistenz) Kassette unterbrochen, die sich in Exon 2 direkt *in frame* dem *L1* Startkodon anschloß (unveröffentlichte Ergebnisse).

Phänotypisch unterscheiden sich die drei Linien kaum. Die männlichen Knockout-Tiere weisen eine höhere Sterblichkeit bis zur ersten Woche nach der Geburt auf und ihr Gewicht beträgt nur 60-80% dessen der Wildtyp-Tiere. Wenn die Mäuse das Erwachsenenalter erreichen, normalisiert sich der Gewichtsunterschied allerdings nahezu. Einige Individuen pflanzen sich fort, die Mehrheit ist jedoch nicht fortpflanzungsfähig, obwohl Spermien vorhanden sind. Die Mäuse haben geschwächte Hinterbeine und ziehen diese nach; daher fallen auch lange Nägel an den Hinterbeinen auf. Die Tiere besitzen ein anomales Fell, ihre Augen sind eingesunken und tränen. Darüber hinaus sind Verhaltensauffälligkeiten zu beobachten. Knockout-Tiere sind im Vergleich zu Wildtyp-Tieren weniger berührungs- und schmerzempfindlich und zeigen eine verzögerte motorische Reaktion. Sie sind hypoaktiv (Aktivität im Käfig), das typische Erkundungsverhalten fehlt ihnen („*open field*“- und „*social exploration*“ Experimente) und sie weisen ein Defizit im räumlichen Lernen auf. Außerdem ist die Präpulsinhibition bei einer akustische Schreckreaktion reduziert<sup>84</sup>.

Die von Dahme *et al.* hergestellten Mäuse wurden sowohl auf einen C57BL/6J Hintergrund als auch einem 129/SvEv Hintergrund gezüchtet<sup>82</sup>; die L1/tTA-Tiere sowie die von Cohen *et al.* besitzen einen kongenen 129Sv-Hintergrund<sup>83</sup>. Dies ist entscheidend für die Ausbildung

---

eines Hydrozephalus, denn es zeigte sich, daß dieses Symptom abhängig vom genetischen Hintergrund des Mausstamms ist. Bei Knockout-Tieren mit C57BL/6J-Hintergrund ist ein zum Teil schwerer Hydrozephalus mit einer Vergrößerung des Schädels zu finden, der mit massiv vergrößerten Ventrikeln und einer deutlich dünneren oder sogar komplett zurückgebildeten Großhirnrinde (Cortex cerebri) einhergeht. Bei L1/tTA-Mäusen ist ein Hydrozephalus dagegen selten<sup>85</sup>; bei den Mutanten von Cohen *et al.* tritt er nicht auf. Neben L1 scheinen weitere modifizierende Gene oder sekundäre Faktoren für die Ausbildung eines Hydrozephalus verantwortlich zu sein. Unterschiede sind auch in Bezug auf die Seitenventrikel zu beobachten. Die lateralen Ventrikel sind bei L1/tTA-Tieren geringfügig vergrößert. Mit hochauflösender Magnetresonanztomographie konnte bei den 129Sv-Mäusen von Cohen *et al.* eine Dilatation der Seitenventrikel und des 4. Ventrikels gezeigt werden; letztere ist wahrscheinlich durch die Hypoplasie des Kleinhirnwurms (Vermis cerebelli) bedingt. Bei diesen Mäusen ist auch das Volumen des gesamten Gehirns sowie des Cerebellums reduziert<sup>67</sup>. Darüber hinaus fanden Demyanenko *et al.* 1999 eine Dysgenese des Corpus callosum: die rostrocaudale Länge ist um 81% reduziert, die dorsoventrale Dicke etwa halbiert<sup>86</sup>. Der kortikospinale Trakt ist unabhängig vom genetischen Hintergrund in seiner Größe reduziert. In erwachsenen Säugetieren verbindet der kortikospinale Trakt den sensomotorischen Cortex mit Motorneuronen und Interneuronen des Rückenmarks, um eine Kontrolle der Bewegung der Extremitäten, insbesondere der Feinmotorik zu gewährleisten<sup>87</sup>. In L1 Knockout-Tieren sind erhebliche Fehler in der korrekten Ausbildung und Verknüpfung der kortikospinalen Axone an der Kreuzung der Pyramidenbahn zu beobachten und eine Projektion im Rückenmark über das zervikale Segment (Halsmark) hinaus ist nicht vorhanden.

Folgende histomorphologische Auffälligkeiten sind bei den Mausmutanten zu beobachten: Die Anzahl der inhibitorischen Parvalbumin-positiven Interneurone in der CA1-Region des Hippocampus junger L1 Knockout-Mäuse unterscheidet sich nicht von der der Wildtyp-Mäuse. Allerdings sind weniger (perisomatische) inhibitorische Synapsen vorhanden, während die Dichte der exzitatorischen Synapsen in der Region unverändert ist. Die aktiven Zonen der inhibitorischen Synapsen sind kleiner und die Verteilung der synaptischen Vesikel diffuser<sup>88</sup>. Im Hippocampus adulter L1 defizienter Mäuse wurde eine um ca. 30% reduzierte Anzahl an Neuronen und Gliazellen beschrieben sowie eine abnorme Morphologie der Dendriten der Pyramidenzellen in der Großhirnrinde<sup>86</sup>.

---

Tab. 1.2: Vergleich der drei etablierten L1 Knockout-Mauslinien

		L1 Knockout-Mäuse (jeweils im Vergleich mit Wildtypen)	
		L1/tTA KI B. Rolf, 2001	Cohen, 1997 Fransen, 1998*, Demyanenko, 1999#
Strategie	Thymidinkinase (TK)-Neomycin (Neo)-Kassette in Exon 9 (Ig4-Domäne, Mutation der Klasse III)	tTA-Neo in Exon 2 (Mutation der Klasse III)	TK-Neo in Exon 13 und 14 (Ig-6-Domäne, Mutation der Klasse III)
Genetischer Hintergrund	C57BL/6J	129/SvEv	129/Sv
RNA/Protein	~10% / minimal (190 kD)	~75% / fehlend	fehlend* / fehlend
Lebens-/ Reproduktionsfähigkeit	nur 23% > 8 Tage / kaum vorhanden	vermindert / kaum vorhanden	uneingeschränkt / kaum vorhanden
Körpergewicht	60-80%	/	60 → ≥ 80%
Hydrozephalus	vorhanden	fehlend	fehlend*
Dilatation der Ventrikel	vorhanden	fehlend	4. Ventrikel und Seitenventrikel (unterentwickelter Kleinhirnwurm)*
Gehirnvolumen	/	/	reduziert (auch des Cerebellums)*
Hirnrinde (Cortex cerebri)	Hypoplasie oder vollständige Atrophie	/	keine Veränderung in Größe und Grobstruktur, Pyramidenzellen jedoch mit abnormer Morphologie der Dendriten#
		seiten	Corpus callosum: rostrocaudale Länge –81%, dorsoventrale Dicke –50%#
		Hypoplasie oder vollständige Atrophie	
Kortikospinaler Trakt	Hypoplasie	/	erhebliche Fehler in der axonalen Wegfindung (im Rückenmark reichen kortikospinale Axone nicht über das cervicale Segment hinaus)
Zelluläre Veränderungen	/	/	um ~30% reduzierte Anzahl an Neuronen und Gliazellen im Hippocampus#
Verhalten	geringere Berührungs- und Schmerzempfindlichkeit	reduzierte Präpulsinhibition	kein Erkundungsverhalten, Defizite im räumlichen Lernen*
Lokomotion	verzögerte motorische Reflexe, schwache Hinterläufe	/	Nachziehen der Hinterläufe (>12Monate), Hypoaktivität*
Verschiedenes	eingesunkene Augen	/	eingesunkene, tränende Augen, lange Nägel an den Hinterpfoten, anomales Fell

/ = keine Angaben

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Nervensystems, einschließlich neuronaler Migration, Differenzierung, Neuritenwachstum, axonaler Wegfindung und Faszikulierung. Mutationen im auf dem X-Chromosom gelegenen *L1* Gen führen zu dem sogenannten L1-Syndrom, das in variabler Ausprägung geistige Minderentwicklung, eine Hypoplasie des Corpus Callosum, adduzierte Daumen, eine spastische Paraparese sowie einen Hydrozephalus zur Folge hat.

Über heterozygote Trägerinnen des L1-Syndroms ist sehr wenig bekannt. Meist werden sie in der Literatur als asymptomatisch beschrieben, allerdings gibt es Berichte über einige betroffene Trägerinnen. Diese weisen meist nur ein klinisches Merkmal auf, z.B. angewinkelte Daumen, milde geistige Retardierung bzw. Lernschwierigkeiten oder Hydrozephalus<sup>77</sup>.

2001 wurde in unserem Labor eine L1 Knockout-Mausmutante generiert, bei der die Proteinexpression von L1 komplett aufgehoben ist (L1ki129, M. Kutsche). Diese Linie stellt, neben den beiden 1997 von Dahme und Cohen generierten, ein drittes Mausmodell für das humane L1-Syndrom dar. Ein Ziel meiner Arbeit war es, diese bislang kaum beschriebene Mutante L1ki129 zu charakterisieren. Das Hauptaugenmerk meiner Studie lag jedoch auf der Analyse heterozygot L1 defizienter Mäuse dieses Stamms. Diese „Trägerinnen“ sollten auf etwaige funktionelle sowie morphologische Unterschiede gegenüber Wildtyp-Mäusen untersucht werden, um die Auswirkungen eines inaktiven *L1*-Allels weiter aufzuklären und so die klinischen Auffälligkeiten heterozygoter Patientinnen zu erklären.

---

MATERIAL

---

---

## 2. Material

---

### 2.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

---

Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmittel sowie deren Hersteller sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität (pro analysis, p.a.) bezogen. Weitere Standardchemikalien wurden von folgenden Firmen bestellt: Biorad, Invitrogen, Merck, Perbio, Polysciences, Roth, Serva und Sigma-Aldrich.

$^{32}\text{p}$ dCTP	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, D)
$^{35}\text{S}$ UTP	Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, D)
96-Well Reaktionsplatte	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Acrylamid	Serva (Heidelberg, D)
Agarose	Serva (Heidelberg, D)
Ambion-Wasser	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ampicillin	Roche (Mannheim, D)
Antibody Diluent Reagent Solution	Zymed (München, D)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Bromodeoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Chlorophorm	Merck (Darmstadt, D)
Digoxigenin – UTP	Boehringer (Mannheim, D)

---

---

DPX mounting medium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Eukitt	Kindler (Freiburg, D)
Fluoromount oder Aqua Polymount	Southern Biotech (Birmingham, USA)
Formaldehyd	Th. Geyer (Renningen, D)
Formamid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Fuji Imaging Plate	Fuji (Düsseldorf, D)
Glyzeringelatine	Merck (Darmstadt, D)
Hybond-N+ Membran	Amersham (Freiburg, D)
Hyperfilm MP	Amersham (Freiburg, D)
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Peqlab (Erlangen, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)
Kodak Biomax Light Film (WB)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Kodak Biomax MR (ISH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Kodak D 19 Entwickler	Kodak (Rochester, USA)
Kodak NTB Emulsion	Carestream Health (New Haven, USA)
Kodak Unifix	Kodak (Rochester, USA)
2-Methyl-Butan (Isopentan)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Mayers Hämalaun	Merck (Darmstadt, D)
MicroAmp Optical 96-Well Platte	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Narcoren	Merck (Hallbergmoos, D)
NBT/BCIP (Substrat für Alkaline Phosphatase)	Roche (Grenzach-Wyhlen, D)

---

---

Normal Goat Serum (NGS)	Jackson Immunoresearch Laboratories (Suffolk, UK)
Optiphase HiSafe III	PerkinElmer (Waltham, USA)
PapPen liquid blocker	SCI Science Services (München, D)
Paraffin	Vogel Medizintechnik Elektronik Gießen, D)
PCR-Soft Stripes 0,2ml	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Peroxidase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Phenol-Chlorophorm	Biomol (Hamburg, D)
Reaktionsgefäße à 0,5, 1,5 und 2ml	Eppendorf (Hamburg, D)
Roti-Hybri-Quick	Carl Roth (Karlsruhe, D)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Superfrost Plus slides	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
SuperSignal West DURA Substrate	Thermo (Bonn, D)
TEMED	Merck (Darmstadt, D)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, D)
TritonX-100	Fluka (Neu-Ulm, D)
TRIzol Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TWEEN	Merck (Darmstadt, D)
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D galactosidase)	Peqlab (Erlangen, D)
Xylol	Th. Geyer (Renningen, D)

---

---

---

## 2.2 Lösungen und Puffer

---

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Puffer mit bidestilliertem Wasser ( $H_2O_{dd}$ ) angesetzt.

<b>Acetylierungspuffer</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	0.1 M Triäthanolamin (Sigma) 0.9 % 5M NaCl 2.5 ml/l Essigsäureanhydrid (Sigma)
<b>„Antigen retrieval“ Lösung</b> (Immunhistochemie)	10mM Na-Zitrat-Dihydrat (pH 9,0)
<b>BCA-Reagenz A</b> (BCA-Test)	1% (v/v) Bicinchoninsäure Dinatriumsalz 1,7% (w/v) $Na_2CO_3 \times H_2O$ 0,16% (w/v) Natriumtartrat 0,4% (w/v) NaOH 0,95% (w/v) $NaHCO_3$ (pH 11,25)
<b>BCA-Reagenz B</b> (BCA-Test)	4% (w/v) $CuSO_4 \times 5 H_2O$
<b>Bisbenzimid-Lösung</b> (Immunhistochemie)	5 $\mu$ g/ml Bis-benzimide in PBS
<b>Blockierungslösung</b> (Immunhistochemie)	5% (v/v) Normales Ziegen Serum 0,2% (v/v) Triton X-100 0,02% (w/v) $NaN_3$ in PBS
<b>Blockierungslösung</b> (Western Blot)	3% (w/v) fettfreies Milchpulver in 1 x TBS
<b>Blottingpuffer (5 x)</b> (Western Blot)	72g Glycin 15g Tris

---

---

<b>Boston Puffer</b> (Genotypisierung)	50mM Tris pH 8.0 50mM KCl 2,5mM EDTA 0,45% NP-40 0,45% Tween 20 0,1mg/ml Proteinase K
<b>Cacodylat Puffer</b> (Immunhistochemie)	0,2M Na-Cacodylat 0,2M HCl
<b>Carrageenan-Lösung</b> (Immunhistochemie)	0,5% w/v lambda-Carrageenan 0,02% w/v Natriumazid in PBS
<b>DAB-Stammlösung</b>	200 mg DAB ad 40ml TBS/Triton (2x filtern)
<b>DAB-Reaktionslösung</b> (Immunhistochemie)	1ml TBS mit 100µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mischen, davon 300µl zu 9ml TBS/Triton geben und 1ml DAB-Stammlösung zusetzen
<b>DEPC H<sub>2</sub>O</b> (Northern Blot)	1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) 1l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
<b>DNA-Probenpuffer (5x)</b>	20% (w/v) Glycerol in TAE Puffer 0,025 % (w/v) Orange G
<b>DNase-Lösung</b>	10 µl DNase-stock Lösung (Qiagen) in 70 µl RDD-Puffer
<b>dNTP-Stammlösung</b>	je 20mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
<b>Ethidiumbromid-Färbepad</b>	10µg/ml Ethidiumbromid in 1xTAE
<b>EB-Puffer</b>	10mM Tris-HCl (pH 8.5)
<b>Farblösung NBT/BCIP</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	Puffer 2 0,5% NBT/BCIP (Roche) 0,25‰ 1M Levamisol (Sigma)

---

---

<b>Hämalaun</b>	1‰ (w/v) Hämatoxylin 0,2‰ (w/v) Natriumiodat 20% (w/v) Aluminiumkaliumsulfat 20% (w/v) Chloralhydrat 1‰ (w/v) Zitronensäure
<b>Hybridisierungspuffer</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	50% entionisiertes Formamid 5x Hybridisierungssalz (20x) 5x Denhardt'sche Lösung (100x) 0,2% SDS 10mM DTT 10% Dextransulfat 250 µg/ml Heringspermien DNA 250 µg/ml Hefe tRNA
<b>Hybridisierungssalz (20x)</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	3M NaCl 0,1M PIPES 0,1M EDTA (pH 6,8)
<b>Denhardt'sche Lösung (100x)</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	2% Ficoll 2 % Polyvinylpyrrolidon 2 % BSA
<b>Ladepuffer</b> (Northern Blot)	43,75µl 10x MEA 87,5µl Formaldehyd (37%) 250µl Formamid 62,5µl 1xMEA 50% Glycerol 50µl OrgangeG in H <sub>2</sub> O 6,25µl H <sub>2</sub> O 1µl Ethidiumbromid (10mg/ml)
<b>MEA (10x)</b> (Northern Blot)	200mM MOPS 10mM di-Na EDTA 50mM Na Azetat (pH 7, dunkel lagern)

---

---

<b>MOPS</b> (Northern Blot)	0,2M MOPS [3-( <i>N</i> -Morpholino)- Propansulfonsäure] (pH 7,0) 0,05M Natriumacetat (in DEPC H <sub>2</sub> O) 0,01M EDTA (in DEPC H <sub>2</sub> O) (dunkel lagern!)
<b>Paraformaldehyd (PFA)</b> (Immunhistochemie)	4% Formaldehyd 0.1% CaCl <sub>2</sub> in 0.1 M Cacodylat Puffer (pH 7.3)
<b>PCR-Puffer</b>	2ml 1M Tris (pH 8,4) 2,5ml 100mM MgCl <sub>2</sub> 3ml H <sub>2</sub> O
<b>Puffer 1</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	100mM TrisHCl (pH 7,5) 150mM NaCl 0,1% Tween oder 0,3% Triton X 100
<b>Puffer 2</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	100mM Tris-HCl (pH 9,5) 100mM NaCl
<b>PFA-Lösung</b> (Immunhistochemie)	4% Paraformaldehyd 0,1M Cacodylat Puffer 1,3g CaCl <sub>2</sub> Dihydrat pH 7,3
<b>PBS (10x)</b>	1,37M NaCl 100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 27mM KCl 20mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>PBST</b>	0,05% TWEEN 20 in 1x PBS
<b>RIPA-Puffer</b> (Zellyse)	50mM Tris-HCl (pH 7.4) 1% (w/v) Triton X-100 150mM NaCl 1mM EGTA 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1x Protease-Inhibitor

---

---

<b>Sammelgel (5%ig)</b> (SDS-PAGE)	3,77ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 0,32ml 1M Tris (pH 6,8) 0,05ml 10% SDS 0,83ml Acrylamid-Bis 29:1 25µl 10% APS 5µl TEMED
<b>SDS Probenpuffer (5x)</b> (SDS-PAGE)	2,2ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 0,5ml Tris, pH 6,8 1,6ml 10% SDS 3,2ml Glycerol 0,1ml 2% Bromphenolblau 0,4ml β-Mercaptoethanol
<b>SDS Laufpuffer (10x)</b> (SDS-PAGE)	10g SDS 30,2g Tris 144,2g Glycin
<b>SSC (20x)</b>	3M NaCl 0,3M di-Na Zitrat
<b>Sucrose-Lösung</b> (Immunhistochemie)	15% Sucrose 0,1M Cacodylate Puffer
<b>„Stripping“-Lösung</b> (Northern Blot)	0,1% SDS in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
<b>„Stripping“-Lösung</b> (Western Blot)	0,5M NaCl 0,5M Essigsäure
<b>TAE (50x)</b> (DNA-Gele)	2M Tris-Acetat (pH 8,0) 100mM EDTA
<b>TBE</b>	89mM TRIS Base 89mM Borsäure 2mM EDTA-Na <sub>2</sub> ad 1l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

---

<b>TBS (10x)</b>	1,5M NaCl 100mM Tris (pH 8)
<b>TBST</b>	0,05% Tween 20 in 1x TBS
<b>TE (10x)</b>	0,1M Tris-HCl (pH 7,5) 10mM EDTA
<b>Trenngel (10%ig)</b> (SDS-PAGE)	3,92ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 5,26ml 1M Tris, pH 8,8 0,14ml 10% SDS 4,7ml Acrylamid-Bis 29:1 70µl 10% APS 7µl TEMED
<b>Waschpuffer</b> (Northern Blot)	1x SSC + 0,1% SDS in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> 0,1x SSC + 0,1% SDS in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
<b>Waschpuffer</b> ( <i>In situ</i> -Hybridisierung)	2x SSC + 50% Formamid + 0,05% Tween 20 1x SSC + 50% Formamid + 0,05% Tween 20 0,1x SSC + 50% Formamid + 0,05% Tween 20

---

### 2.3 Medien und Zusätze

LB-Medium („lysogeny broth“)	10g/l NaCl 10g/l Bakto-Trypton 5g/l Hefeextrakt
LB <sup>amp</sup> -Medium	100mg/l Ampicillin in LB-Medium
LB <sup>amp</sup> -Platten	20g/l Agar in LB-Medium 100mg/l Ampicillin
LB <sup>amp</sup> -Platten mit IPTG und X-Gal	0,5mM IPTG 80µg/ml X-Gal
X-Gal	100mg X-Gal in 2ml N,N'-dimethylformamide

---

## 2.4 Bakterien

Stamm	Relevante Eigenschaften	Herkunft
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17 ( $r_k^- m_k^+$ ), recA1, relA1, supE44, thi-1, $\Delta(\text{lacZYA-argFV169})$ , $\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ , F <sup>-</sup>	Clontech (Heidelberg, D)

## 2.5 Enzyme und Kits

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent (Santa Clara, USA)
Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System	GR Healthcare (München, D)
HotGoldstar DNA Polymerase	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Venlo, NL)
Megaprime DNA labelling kit	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Venlo, NL)
GFX Micro Plasmid Prep Kit der Firma	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK)
Pelettpaint	Merck (Darmstadt, D)
Pfu	Promega (Mannheim, D)
pGEM-T Vector	Promega (Mannheim, D)
Plasmid purification NucleoBond AX PC50	Macherey-Nagel (Düren, D)
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Venlo, NL)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Venlo, NL)
qPCR Core Kit	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Restriktionsendonukleasen Ascl, BspHI, NcoI, NotI, PstI, SacII, Sall	New England Biolabs, NEB (Frankfurt am Main, D)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Venlo, NL)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Venlo, NL)
SuperScript III Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Taq	GIBCO (Karlsruhe, D)

---

## 2.6 DNA-, RNA- und Proteingrößenstandards (Marker)

---

100-bp-DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe, D)
1-kb Plus-DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe, D)
RNA Ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
RNA Millenium Marker™	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
<i>Precision Plus Protein Dual Color Standards</i> Protein Marker	Bio-Rad (München, D)
<i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein</i> <i>Ladder</i>	Fermentas (Ontario, Kanada)

---

---

## 2.7 Plasmide

---

p924neol-pPGKL1	C. Bernreuther
pGEM-T Easy	Promega (Mannheim, D)
pGEM-T Easy Aktin #5	N. Akyüz
TREtight-mL1	J. Schmid

---

## 2.8 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, D) synthetisiert. Die Orientierung ist in 5' → 3'-Richtung angegeben; F steht für *forward* (vorwärts), R für *reverse* (rückwärts).

Name	Sequenz	Produkt	Verwendung
<b>Aktin-77F</b> <b>Aktin-1210R</b>	CGCCATGGATGACGATATCGCTG GCCTAGAAGCACTTGCGGTGCA	1133bp	Northern Blot
<b>Aktin-890F</b> <b>Aktin-1023R</b>	TCCTGTGGCATCCATGAAACT TTCTGCATCCTGTCAGCAATG	~130bp	qPCR
<b>Cga-141F</b> <b>Cga-283R</b>	TGTCCATGTTCTGCATATTCTTCA GGAGAAGCAACAGCCCATACT	~140bp	qPCR
<b>CHST12-425F</b> <b>CHST12-573R</b>	GCCCCAGCAAGCCAGTCTTG AGGCTGGCGTTGGCACAGAAGT	~150bp	qPCR
<b>Gh-504F</b> <b>Gh-614R</b>	TGATGCAGGAGCTGGAAGATG CATAGTTTTTGAGCAGCGCGT	~110bp	qPCR
<b>HPRT-306F</b> <b>HPRT-425R</b>	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGATTACA TCCCCGTTGACTGATCATTACA	~120bp	qPCR
<b>Pomc-41F</b> <b>Pomc-241R</b>	TGGCCCTCCTGCTTCAGAC GACCCATGACGTA CTCCGG	~200bp	qPCR
<b>Start-NEO</b> <b>Stop-NEO</b>	ATGGATTGCACGCAGGTTCTCCG TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG	~1000bp	ISH
<b>L1 arm 2</b> <b>L1-5'up2</b>	GGAATTTGGAGTTCAAACAAGGTGATC AGAGGCCACACGTACCGCAGCATC	351bp	Genotypisierung
<b>tTA up 3</b>	TACATGCCAATAACAATGTAGGCTGC	454bp	
<b>Y-B</b> <b>Y-A</b>	AGGTGAGAGGATGTGGACAGC CGGCACACCCAGTATTCTCAC	670bp	Genotypisierung
<b>Oligo(dT)<sub>18</sub></b>	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT		Reverse Transkription
<b>T7</b>	GTAATACGACTCACTATAGGGC		Sequenzierung
<b>SP6</b>	ATTTAGGTGACACTATAG		Sequenzierung

## 2.9 Antikörper und Kernfarbstoffe

### 2.9.1 Primärantikörper

Für immunhistochemische Färbungen (IHC) und Western Blot Analysen (WB) wurden die folgenden Primärantikörper eingesetzt:

Antigen	Verdünnung	Spezies	Hersteller
<b>Aktin</b>	1:2000 (WB)	Hase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
<b>BrdU</b>	1:200 (IHC)	Ratte	Abcam (Cambridge, UK)
<b>Caspase-3</b>	1:2000 (IHC)	Hase	R&D Systems (Minneapolis, USA)
<b>Doublecortin (DCX)</b>	1:100 (IHC)	Ziege	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, USA)
<b>Ki-67</b>	1:500 (IHC)	Hase	Abcam (Cambridge, UK)
<b>L1 555</b>	1:10000 (WB)	Ratte	Loers, ZMNH
<b>L1 polyklonal</b>	1:500 (IHC) 1:5000 (WB)	Hase	Pineda (Berlin, D)
<b>NeuN</b>	1:1000 (IHC)	Maus	Chemicon (Temecula, CA, USA)
<b>Parv</b>	1:1000 (IHC)	Maus	Sigma (Deisenhofen, D)
<b>S-100</b>	1:500 (IHC)	Hase	Dako (Hamburg, D)

### 2.9.2 Sekundärantikörper

Antigen	Verdünnung	Spezies	Kopplung	Hersteller
Hase-IgG	1:200 (IHC)	Ziege	Cy3	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
	1:10000 (WB)		HPR (Meerrettichperoxidase)	Dianova (Hamburg, D)
Maus-IgG	1:200	Ziege	Cy3	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
Ratte-IgG	1:200 (IHC)	Ziege	Cy3	Dianova Hamburg, D)
	1:10000 (WB)		HPR	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
Ziege-IgG	1:200	Esel	Cy3	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, UK)
Digoxigenin	1:500	Schaf	AP (Alkalische Phosphatase)	Boehringer (Mannheim, D)

### 2.9.3 Kernfarbstoffe

Bisbenzimid (Hoechst 33258) 5µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
DAPI 50µg/ml PBS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Meyer's Hämalaun-Lösung	Merck (Darmstadt, D)

---

## 2.10 Geräte

---

ABI Prism 377 DNA Sequenzer	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Axioskop	Zeiss (Jena, D)
mit Neurolucida	BioMetric Systems (Weiterstadt, D)
Axiovert 200M (mit AxioCam HRC)	Zeiss (Jena, D)
DNA Engine PTC-200 (Peltier Thermal Cycler)	MJ Research (Waltham, USA)
Fujifilm FLA-3000 Scanner	Fujifilm (Düsseldorf, D)
Gelelektrophoresekammer Sub-Cell GT	Biorad (München, D)
Gelelektrophoresekammer Mini Sub-Cell GT	Biorad (München, D)
Hybaid Mini 10 Hybridisierungsöfen	Thermo (Erlangen, D)
Kryostat Leica CM3050	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Liquid Scintillation Counter (Wallac 1409)	PerkinElmer, (Waltham, USA)
TCS SP2 Laser Scanning Spectral Confocal Microscope	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Mikrotom Leica VT 1200	Leica Microsystems (Wetzlar, D)
Mikrozentrifuge	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Photometer BioSpec-mini	Shimadzu (Duisburg, D)
Polytron PT 1200 (Homogenisator)	Kinematica (Littau, CH)
PowerPac 200	Biorad (München, D)
Schlauchpumpe	Ismatec (Wertheim-Mondfeld, D)
Sorvall RC 5C Plus	DuPont (Newton, USA)
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg, D)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, D)
Ultraviolet Crosslinker	Amersham (Freiburg, D)
Wasserbad GFL 1086	GFL (Burgwedel, D)
µQuant	BioTek (Bad Friedrichshall, D)

---

---

## 2.11 Software und Internetquellen

---

Allen Brain Atlas of the mouse brain	<a href="http://www.brain-map.org">www.brain-map.org</a>
Blast-, Nucleotide-, Gene-, OMIM- und PubMed-Server der NCBI ( <i>National center for Biotechnology Information</i> )	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
DNASStar	<a href="http://www.dnastar.com">www.dnastar.com</a>
Electronic Prenatal Mouse Brain Atlas, EPMBA	<a href="http://www.epmba.org/gd16coronal/index.php">www.epmba.org/gd16coronal/index.php</a>
ImageJ	<a href="http://www.rsb.info.nih.gov/ij">www.rsb.info.nih.gov/ij</a>
L1CAM Mutation Web Page	<a href="http://www.rug.nl/umcg/faculteit/disciplinegroepen/medischegenetica/hereditarydiseases/l1cam/index">www.rug.nl/umcg/faculteit/disciplinegroepen/medischegenetica/hereditarydiseases/l1cam/index</a>
Mouse Genome Informatics	<a href="http://www.informatics.jax.org">www.informatics.jax.org</a>
NEB Cutter	<a href="http://www.tools.neb.com">www.tools.neb.com</a>
PrimerQuest	<a href="http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest">www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest</a>
Prism3.0	GraphPad Software, Inc.
Statistica 6	StatSoft (Tulsa, USA)
TINA 2.0 Software	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
UTHSCSA ImageTool	<a href="http://www.ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html">www.ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html</a>

---

## METHODEN

---

## **3. Methoden**

### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (DH5 $\alpha$ )**

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  wurde eine Bakterienkolonie auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht (ü. N.) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde von einem Klon eine 10ml Übernachtskultur in LB-Medium angeimpft und ü. N. bei 37°C kultiviert. 1ml dieser Übernachtskultur wurden mit 100ml LB-Medium versetzt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,3-0,4 kultiviert. Die Zellen wurden 10min auf Eis gekühlt, anschließend 5min bei 5000rpm, 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 30ml TFB I Puffer resuspendiert, 10min auf Eis gekühlt und erneut 5min bei 5000rpm, 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 4ml TFB II Puffer resuspendiert, erneut 10min auf Eis gekühlt und anschließend in 100 $\mu$ l Aliquots bei -80°C gelagert<sup>89</sup>.

#### **3.1.2 Erhaltung von Bakterienstämmen (Glycerol-Stock)**

Ausgewählte Bakterienstämme wurden in Flüssigkultur (OD<sub>600</sub> 0,5-0,6) 1:1 mit 100% Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

#### **3.1.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien**

Bei dieser Methode wurden 100 $\mu$ l Bakteriensuspension langsam auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA (10pg-10ng) oder einem Ligationsansatz (50ng Vektor-DNA) versetzt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1,5min bei 42°C wurden 500 $\mu$ l LB-Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C unter stetigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100 $\mu$ l Transformationsansatz auf eine, der restliche Ansatz auf eine zweite LB-Agar-Platte (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausgestrichen. Die Platten wurden ü.N. bei einer Temperatur von 37°C kultiviert<sup>90</sup>.

---

### 3.1.4 Plasmidisolierung aus 1,5 ml *E. coli* Bakterienkulturen

Zur DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen in kleinem Maßstab wurde das GFX Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences) verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14000g und Raumtemperatur (RT) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durchgeführt.

2ml einer 5ml Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien 1min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150µl Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 150µl Lösung II und 10-15maliges Invertieren lysiert. Das Lysat wurde 3min bei RT inkubiert und durch Zugabe von 300µl Lösung III (10-15x invertieren) gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 5min zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu präzipitieren. Der Überstand wurde auf eine GFX-Säule pipettiert, 1min zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 500µl PE-Puffer gewaschen. Nach einminütiger Zentrifugation wurde der Durchlauf wieder verworfen und die Säule erneut für 1min zentrifugiert, um alle Ethanolrückstände zu entfernen. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 50µl TE-Puffer in die Mitte der Säule pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei RT wurde die Säule 1min zentrifugiert, um die Plasmid-DNA zu eluieren.

### 3.1.5 Plasmidisolierung aus 200 ml *E. coli* Bakterienkulturen

Zur Isolierung großer Mengen DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. Alle verwendeten Puffer sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

200ml Übernachtskultur (mit entsprechendem Antibiotika versetzt) wurde durch Zentrifugation bei 6000xg für 15min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 10ml Resuspensionspuffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 10ml Puffer P2, fünfmaligen Invertieren und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde 10ml Neutralisationspuffer P3 zupipettiert, sechsmal invertiert und das Lysat in eine QIAfilter Spritze, die unten verschlossen wurde, überführt. Während der folgenden 10minütigen Inkubation bei RT wurde eine Qiagen Säule mit 10ml Puffer QBT äquilibriert. Auf diese wurde der Überstand dann überführt. Nachdem die Lösung passiert hatte, wurde zweimal mit jeweils 30ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15ml Puffer QF in ein 30ml Corex-Glasröhrchen eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5ml Isopropanol und anschließender 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10000xg gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (10000xg; 15min; 4°C) in 100-300µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

---

### 3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Für die Reaktionen wurden die vom Enzym-Hersteller empfohlenen Puffer benutzt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die vom Hersteller vorgeschlagenen Pufferbedingungen gewählt. Das Volumen der eingesetzten Enzymlösung betrug maximal 1/10 des Gesamtrestriktionsvolumens.

Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden 50-500ng DNA mit 1µl 10x Restriktionspuffer, 1µl 10x BSA und 1-5U Enzym in einem Gesamtrestriktionsansatz von 10µl vereint und bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 30-60min inkubiert<sup>90</sup>. Das Restriktionsprodukt wurde, je nach Verwendungszweck, entweder direkt eingesetzt oder mittels *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurden die Fragmente gelelektrophoretisch analysiert (vgl. 3.1.12).

Für einen präparativen Restriktionsansatz wurden 1-7µg DNA mit 5-20U Enzym und dem Gesamtvolumen von 30-50µl entsprechenden Mengen 10x Puffer und 10x BSA versetzt. Der Restriktionsansatz wurde bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 2-3 Stunden inkubiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel extrahiert (vgl. 3.1.13).

### 3.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation eines bestimmten, durch zwei Oligonukleotide (Primer) definierten, DNA-Bereiches<sup>91</sup>.

Die Amplifikation von DNA wurde in 50µl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurden die folgenden Reagenzien auf Eis pipettiert und die DNA je nach Anwendung entweder mit Hilfe von *Taq DNA Polymerase* (Life Technologies) oder *Pfu Turbo DNA Polymerase* (mit Fehlerkorrektur-Aktivität, Stratagene) vervielfältigt. Die eingesetzten Primer sind unter 2.8 aufgelistet.

x µl	DNA (5-10ng)
5µl	Primer 1 (5pM)
5µl	Primer 2 (5pM)
5µl	dNTPs (je 2mM)
5µl	PCR-Puffer (10fach)
0,5-2,5 U	Polymerase
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ad 50µl	

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

---

94 – 98°C	30sek – 5min
94 – 98°C	30sek (Denaturierung des Doppelstranges)
x °C	30sek – 1min (Hybridisierung der Primer)
68 – 72°C	30sek – 1 min/1000 Basenpaare des Amplikons (Elongation)
	25-35 Zyklen
68 – 72°C	10min
4°C	∞

---

Bei Verwendung von Primern mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) wurde die PCR bei der niedrigeren  $T_{m-5^\circ\text{C}}$  durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (vgl. 3.1.12) und entweder per Gelextraktion (vgl. 3.1.13) oder mit Hilfe eines PCR-Aufreinigungskits (vgl. 3.1.11) isoliert.

### 3.1.8 Genotypisierung mittels PCR (multiplex PCR)

Um zwischen verschiedenen Genotypen der Mäuse unterscheiden zu können, wurden Schwanzbiopsien (ca. 0,2-0,5cm) genommen und diese ü. N. bei 55°C in 100µl Boston-Puffer verdaut. 1µl genomische DNA wurde für eine Standard-PCR (vgl. 3.1.7) eingesetzt. Die drei verwendeten Primer wurden so gewählt, daß sie die mutierte Region flankieren, wodurch nach einer Gelelektrophorese unterschiedlich große PCR-Produkte für Knockout- und Wildtyp-Tiere sowie eine Doppelbande für den heterozygoten Genotyp nachgewiesen werden konnte.

### 3.1.9 Poly-Adenylierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte mit glatten Enden wurden poly-adenyliert, bevor sie für die Ligation im pGEM-T Easy-System (Promega) eingesetzt wurden. Die PCR-Produkte wurden über eine Qiagen-Säule aufgereinigt (vgl. 3.1.10). 7µl gereinigtes PCR-Produkt (300-500ng) wurden mit 1µl 10x Taq-Puffer, 1µl dATP (2mM), 0,3µl 50mM MgCl<sub>2</sub> und 1µl Taq-DNA-Polymerase versetzt. Der Ansatz wurde bei 70°C für 30min inkubiert und anschließend direkt für die Ligation (vgl. 3.1.10) eingesetzt.

---

### 3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit dem pGEM-T Easy Kit (Promega) durchgeführt. Gemäß den Herstellerangaben wurden in einem 10µl Ligationsansatz 1µl (50ng) pGEM-T Easy-Vektor im molaren Verhältnis 1:1-1:8 mit dem PCR-Fragment, 1µl 10x T4 Ligase-Puffer und 1U T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert<sup>90</sup>. 5µl der Ligationsansätze wurden im Anschluß direkt für die Transformation (vgl. 3.1.3) eingesetzt.

### 3.1.11 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des MiniElute<sup>TM</sup> PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (13000xg, RT) durchgeführt.

Der PCR-Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen PB-Puffer und mit dem einfachen Volumen Isopropanol versetzt, anschließend auf ein QIAQuick-Säulchen überführt und 1min zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit 500µl PE-Puffer gewaschen, zentrifugiert und, nachdem der Durchlauf verworfen wurde, erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 30µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> in die Mitte der Säule pipettiert, 1min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (1min) eluiert.

### 3.1.12 Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren, mit dem Nukleinsäuren ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Die Trennfähigkeit der Agarosegele ist von ihrer Konzentration abhängig. Je nach Fragmentgrößen wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele in 1X TAE verwendet<sup>90</sup>.

Die DNA wurde mit der entsprechenden Menge 5x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein angemessener Längenstandard mit aufgetragen. Je nach Anwendung und Gelgröße wurde die Elektrophorese bei 80-120 Volt durchgeführt. Die Laufzeit wurde der erwarteten DNA-Fragmente angepasst. Anschließend wurden die Gele 30min in Ethidiumbromidlösung (0,5µg/ml in 1x TAE-Puffer) gefärbt und die DNA-Banden mit Hilfe eines Dokumentationssystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB) unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

### 3.1.13 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus einem Agarosegel wurde das MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (13000xg, RT) durchgeführt.

Nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung (vgl. 3.1.12) wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht (360nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wurde bei 50°C in dreifachem Volumen Gelsolubilisierungspuffer-QG für 10min aufgelöst, anschließend mit einfachem Volumen Isopropanol versetzt und auf eine MinElute-Säule pipettiert. Die Säule wurde für 1min zentrifugiert und mit 700µl PE-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen und der restliche Puffer durch erneute Zentrifugation entfernt. Die Säule wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 30µl TE-Puffer in die Mitte pipettiert, 1min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (1min) eluiert.

### 3.1.14 DNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration

Die Reinheit und Konzentration von DNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (BioSpec Mini, Shimdazu) über die Extinktion bei 260nm ( $OD_{260}$ ) und 280nm ( $OD_{280}$ ) gegen Wasser als Referenz bestimmt. Der Quotient von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  gibt Aufschluß über die Reinheit der isolierten DNA. Werte  $<1,8$  weisen auf eine Verunreinigung mit Aromaten (wie z.B. Ethanol) oder Proteinen hin, Werte  $>2$  auf eine RNA-Kontamination der Probe. Die Konzentration doppelsträngiger DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wird wie folgt ermittelt:  $OD_{260} \times 0,05 \times \text{Verdünnung}^{90}$ .

### 3.1.15 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte in der Sequenzierabteilung des ZMNH (Hamburg, D). Hierzu wurde 0,6-1µg DNA in 6µl  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  oder Tris (pH8) gelöst, mit 2µl des entsprechenden Sequenzierprimers (5pM) versetzt und an die Sequenzierabteilung weitergegeben.

### 3.1.16 RNA-Isolierung aus Gesamtgehirn

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

### 3.1.17 Aufreinigung der RNA

RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit und des RNase-Free DNase Set (Qiagen) aufgereinigt. Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (13000xg, RT) durchgeführt.

100µl RNA wurden mit 350µl Puffer-RLT gemischt, 250µl 100% Ethanol zugegeben, der Ansatz durch auf und ab pipettieren gemischt und auf eine RNeasy Mini Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 30sek wurde der Durchlauf verworfen und die an die Säule gebundene DNA in der Säule verdaut. Hierfür wurden 10µl DNase-Stock (30U) mit 70µl RDD-Puffer gemischt und auf die Silica-Membran der Säule pipettiert, die zuvor einmal mit 350µl Puffer-RW1 gewaschen wurde. Der DNase-Verdau wurde nach 15min durch Zugabe von 350µl Puffer-RW1 gestoppt und der Ansatz für 30sek zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde für 2min zentrifugiert, um die Säulenmembran vollständig zu trocknen. Die Säule wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA mit 30-50µl RNase freiem Wasser, nach einminütiger Inkubation bei RT, durch Zentrifugation für 1min eluiert. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde das Eluat erneut auf die Säule aufgetragen, 1min bei RT inkubiert und nochmals zentrifugiert. Nach Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung (vgl. 3.1.18), wurde die RNA bis zu weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.1.18 RNA-Reinheitsanalyse und Bestimmung der Konzentration

Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels eines 1,5%igen TBE-Agarosegels überprüft. Zu je 4µl RNA wurden 4µl Formamid-Ladepuffer gegeben, die Probe wurde für 3min bei 55°C denaturiert und dann auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 90V ca. eine Stunde lang<sup>90</sup>. Zusätzlich wurde die Integrität der Proben mit Agilent RNA 6000 Nano Chips überprüft. Die RNA wurde in 10µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> 1:20 verdünnt und die Messung den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

Die Reinheit und Konzentration der einzelnen RNA-Proben wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (BioSpec Mini, Shimadzu) über deren optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Für RNA gilt folgender Richtwert:  $OD_{260} \times 0,04 \times$  Verdünnung entspricht der RNA-Konzentration in µg/µl. Ein Quotient von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  von 1,9 zeigt an, daß die isolierte RNA frei von Proteinen ist.

### 3.1.19 Reverse Transkription

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

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

Für die Erststrangsynthese wurde die gereinigte mRNA mit Hilfe der RNase H defizienten SuperScript II (Invitrogen) in cDNA transkribiert. Hierfür wurden 2µg RNA in 11µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt, 1µl dNTPs (jeweils 10mM) und 1µl Oligo dT-Primer (100µM, Metabion) zugegeben und durch Erhitzen auf 65°C für 5min und Abkühlen auf 4°C hybridisiert. Nach Zugabe von 2µl DTT (0,1M), 4µl 5x *First Strand*-Puffer und 1µl RNase Out (Invitrogen) wurde der Ansatz für 2min bei 42°C inkubiert, bevor mit Zugabe von 1µl SuperScript II Reverse Transkriptase die Erststrangsynthese bei 42°C für 50 min folgte. Anschließend wurde das Enzym durch 15minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert und die cDNA bei -20°C gelagert.

### 3.1.20 Northern Blot

Northern Blotting ist ein Verfahren, bei dem nach der elektrophoretischen Auftrennung von RNA in einem denaturierenden Formaldehydgel die Moleküle durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran übertragen, immobilisiert und zur Analyse mit spezifischen, radioaktiv markierten Sonden hybridisiert werden. Die quantitative und/oder qualitative Identifikation spezieller Sequenzen erfolgt dann per Autoradiographie<sup>92</sup>.

#### Elektrophoretische Auftrennung der RNA

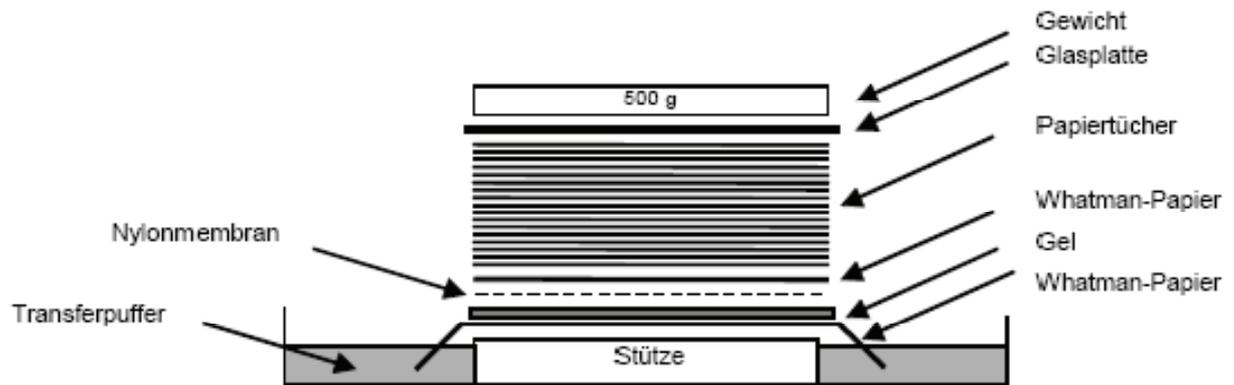
Für das Gel wurde 1g Agarose in 10ml 10x MEA Puffer und 81,8ml DEPC H<sub>2</sub>O gelöst (etwa 1%iges Gel, für RNA-Moleküle zwischen 500bp und 10kb) und anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. Unter einer Abzugshaube wurden 8,2ml Formaldehyd (12,3M) zugegeben. Dann wurde das Gel in eine für RNA vorgesehene Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet.

Es wurden 15µg RNA jeder Probe in das Gel geladen. Dafür wurden die entsprechend verdünnten RNA-Proben mit 40% Ladepuffer versetzt und 5min bei 70°C inkubiert. Das Gel wurde in einem elektrischen Feld mit 5V/cm ca. 3h laufen gelassen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde das Agarose-Formaldehydgel unter UV-Licht betrachtet und (mit einem angelegten Lineal als Größenmaßstab) fotografiert. Nur die rRNA-Moleküle der zellulären Gesamt-RNA sind als zwei scharfe Banden sichtbar. In Säugetierzellen entsprechen sie den 18S- und den 28S-Molekülen (1,9kb bzw. 4,7kb). Dieser interne Marker kann später auch zur Identifizierung der Bandenpositionen auf der Membran dienen.

#### Transfer der RNA

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mehrere Male mit deionisiertem Wasser gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen, das den Transfer der RNA auf die Nylonmembran behindert. Der Kapillartransfer auf eine Hybond-N+ Membran (Amersham) erfolgte anschließend in 10x SSC über Nacht. Zum Aufbau des Blots vgl. **Abb. 3.1**.

---



**Abb. 3.1: Schematischer Aufbau eines Northern Blots.** Eine Brücke aus doppeltem Whatman-Papier führt über eine Stütze und taucht auf beiden Seiten in den 10x SSC Transferpuffer. Darauf werden das Gel, die Nylonmembran, zwei Lagen Whatman-Papier, ein Stapel zugeschnittenes, saugfähiges Papier und eine Glasplatte gelegt. Ein Gewicht stabilisiert den Aufbau. Die RNA wird mit Hilfe von Kapillarkräften aus dem Gel auf die Membran übertragen.

### Vorbereitung der Membran

Am darauf folgenden Tag wurde die Nylonmembran aus dem Aufbau entnommen, zur Orientierung markiert und mit 2x SSC abgespült, um anhaftende Agarosepartikel zu entfernen und überschüssiges Salz abzuwaschen. Sowohl die Membran als auch das Gel wurden zur Kontrolle der Transfereffizienz fotografiert. Dann wurde die Membran zum Trocknen auf Whatman-Papier gelegt. Durch anschließende UV-Bestrahlung in einem UV-Transilluminator (Wellenlänge 254nm, 70mJ/cm<sup>2</sup>; Ultraviolet Crosslinker, Amersham) wurde die RNA immobilisiert, d.h. kovalent und dauerhaft an die Nylonmembran gebunden (UV *cross-linking*).

### Herstellung der Sonden

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sonden wurden mittels Restriktionsverdau aus in der Arbeitsgruppe vorhandenen Plasmiden hergestellt. Je 10µg Plasmid-DNA wurden in einem präparativen Ansatz über Nacht gespalten.

Plasmid	Enzym	Sonde	Sondengröße	Herkunft
TREtight-mL1	PstI	L1	ca. 1kb	J. Schmid
p924neol-pPGKL1	AscI und BspHI	Neo	ca. 1,6kb	C. Bernreuther
PGEM-T Easy Aktin #5	NotI	Aktin	ca. 1,1kb	N. Akyüz

Die Restriktionsprodukte wurden in einem 0,7%igem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und die DNA-Fragmente mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) in 20µl EB-Puffer eluiert.

#### Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente

Zur radioaktiven Markierung der DNA-Fragmente (*Labeling*) wird die Methode der „*random oligonucleotide-primed synthesis*“ nach Feinberg und Vogelstein<sup>93</sup> verwendet. Auf diese Weise lässt sich eine gleichmäßig radioaktiv markierte DNA-Sonde mit hoher spezifischer Aktivität herstellen.

Zuerst wurden die DNA-Moleküle verdünnt (25ng DNA in 45µl Ambion H<sub>2</sub>O) verdünnt und denaturiert (5min bei 95°C). Dann wurde der Ansatz in ein Reaktionsgefäß des Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System überführt, mit 5µl dCTPs, die ein radioaktives  $\alpha^{32}$  Phosphor-Isotop enthielten, gemischt und 30min bei 37°C inkubiert. Die Hexanukleotide können sich zufällig an verschiedenen Positionen entlang des Templates anlagern und dort dann als Primer fungieren. Das Klenow-Enzym setzt an den Hexanukleotiden an und synthetisiert wieder einen Doppelstrang, indem es die Lücken mit dNTPs auffüllt. Auf diese Weise werden beide Stränge gelabelt. Die überschüssigen dNTPs wurden mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen) den Herstellerangaben folgend entfernt und die fertige Sonde schließlich in 100µl EB eluiert. 1µl der Lösung wurde abgenommen, in 8ml Optiphase HiSafe III (PerkinElmer) verdünnt und zur Überprüfung der Einbaurate der Radioaktivität im Szintillationszähler (Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer) gemessen (5µl = 50µCi [ $\alpha^{32}$  P] dCTP, 3000Ci/mmol). Vor der Hybridisierung wurde die Sonde erneut für 5min auf 95°C erhitzt (Denaturierung) und dann auf Eis abgekühlt.

#### Hybridisierung der Membran

Die Nylonmembran wurde (mit der RNA-Seite nach innen) in eine sterile Hybridisierungsröhre gelegt. Dann wurde sie mit 10ml Roti-Hybri-Quick (Carl Roth) bei 68°C für zwei Stunden unter Drehen im Hybridisierungsschrank prähybridisiert. Die Membran equilibriert sich so an die Lösung und der Hintergrund wird blockiert. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die denaturierte cDNA-Sonde (100µl) dazugegeben. Die Membran wurde unter Drehen bei 68°C über Nacht inkubiert.

Die Sonden können in Hybridisierungslösung eingefroren (-20°C) und wiederverwendet werden.

---

### Waschen der Nylonmembran

Nach der Hybridisierung muß die überschüssige Radioaktivität bzw. unspezifisch gebundene Sonden abgewaschen werden, um die Hintergrundstrahlung so gering wie möglich zu halten. Hierfür wurden zwei Waschpuffer mit steigender Stringenz verwendet: Die Membran wurde zuerst 30min mit 1x SSC/0,1%SDS bei 68°C gewaschen, dann folgte ein Waschschritt mit der gleichen Lösung für weitere 15min. Anschließend wurde die Membran für 1min mit 0,1x SSC/0,1% SDS bei RT inkubiert und ihre Restaktivität mit dem Geigerzähler überprüft.

### Exposition

Um ein Austrocknen der Membran zu verhindern, wurde sie in Plastikfolie gepackt, zentriert in eine Kassette gelegt und mit einem spezialbeschichteten *Screen* (Fuji Imaging Plater, Fuji), je nach Aktivität, mehrere Stunden oder über Nacht exponiert (Autoradiographie). Mit einem PhosphorImager (Fujifilm FLA-3000, Fuji) wurde der *Screen* eingelesen und mit TINA 2.0 Software (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) am Computer quantitativ ausgewertet. Zusätzlich wurden die Membranen zwei bis acht Wochen bei -80°C auf Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham) exponiert und danach konventionell entwickelt.

### *Stripping* für weitere Hybridisierungen

Ein und dieselbe Nylonmembran kann mehrfach verwendet werden. Um sie später mit weiteren Sonden hybridisieren zu können, sollte sie vorher gestrippt werden. Die Sonde wird entfernt, ohne daß dabei die Membran beschädigt wird oder die gebundene RNA verloren geht. Die Membran darf allerdings zwischen Hybridisierung und *Stripping* nicht austrocknen, da die Sonde sonst irreversibel an die Matrix bindet.

Das *Stripping* wurde für 3x 5min in 0,1%SDS in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> bei 98°C durchgeführt. Anschließend wurde die Membran kurz in DEPC H<sub>2</sub>O geschwenkt, auf Whatman-Papier getrocknet und das erfolgreiche Entfernen der Sonde per Geigerzähler sowie per Autoradiographie überprüft. Bei 4°C wurde die Nylonmembran in Plastikfolie bis zur nächsten Hybridisierung aufbewahrt.

### **3.1.21 *In situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin- sowie radioaktiv markierten Sonden**

Die *in situ*-Hybridisierung ist eine Methode Nukleinsäuren in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen sichtbar zu machen. Damit läßt sich eine Nukleinsäure gewissermaßen *in vivo* lokalisieren, räumliche und zeitliche Expressionsmuster von Genen können in

---

Gewebeschnitten und in Präparationen ganzer Organismen bestimmt werden. Die Methode erlaubt außerdem eine grobe quantitative Abschätzung der mRNA-Menge und Rückschlüsse über das Verhältnis zwischen mRNA-Synthese einerseits und Proteinproduktion, Morphogenese und Feinstruktur andererseits.

Die nachzuweisende Nukleinsäuresequenz wird durch Einbau eines radioaktiven oder nichtradioaktiven Markers markiert. Unter kontrollierten experimentellen Bedingungen hybridisiert dann die einzelsträngige c-RNA Sonde mit einer komplementären mRNA des Präparats. Das neu gebildete doppelsträngige Molekül läßt sich aufgrund seiner Markierung nachweisen und die Lokalisation durch mikroskopische Verfahren sichtbar machen. Die Nachweismethode hängt von der Markierung der Sonde ab. Hier wurde Neomycin-RNA sowohl mittels Digoxigenin- als auch radioaktiv markierten Sonden nachgewiesen. Digoxigenin (DIG) ist ein Steroid aus dem Fingerhuts (*Digitalis purpurea* und *lanata*). DIG ist an Uridintriphosphat (UTP) gekoppelt und wird bei der Transkription der Plasmid-DNA in cDNA eingebaut. Die Detektion erfolgt durch einen Anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit dem Reporter-Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt ist, das wiederum eine Farbreaktion auslöst. Digoxigenin wird nur in gebundenen Zustand erkannt, ungebundene Sonden lassen sich abspülen und verursachen keinen Hintergrund. Zur radioaktiven Markierung wird  $^{35}\text{S}$ -UTP eingesetzt, das wie DIG während der Transkription eingebaut wird. Die Detektion erfolgt per Autoradiografie. Radioaktive Signale sind in der Regel stärker jedoch diffuser als die bei einer Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden zu erwartenden. Das *Labeling* wurde jeweils den Herstellerangaben gemäß durchgeführt (PCR DIG Labeling Mix, Roche sowie MAXIscript In Vitro Transcription Kit, Ambion). Bis zur Hybridisierung sind die beiden Protokolle identisch. Präparation des Gewebes

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Gehirne von neugeborenen Mäusen (P0) des Stamms L1ki129 untersucht. Die Tiere wurden per Scherenschlag dekapitiert, das Gehirn entnommen und sofort auf Trockeneis gefroren, um eine Degradation der RNA zu minimieren. Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden  $16\mu\text{m}$  dicke Kryostatschnitte auf Superfrost Plus Objektträgern (Menzel-Gläser) angefertigt. Die Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Herstellung der Neomycin-Sonde

Ein in unserer Arbeitsgruppe vorhandenes Plasmid (p924neol-pPGKL1, C. Bernreuther) diente als *template*, um ein Neomycin-spezifisches 780bp-Fragment zu amplifizieren. Hierfür

---

wurde eine Standard-PCR mit Pfu-Polymerase (Promega) durchgeführt. Das Produkt wurde aufgereinigt, poly-adenyliert und anschließend den Herstellerangaben gemäß mit dem pGEM T-easy Vektor (Promega) ligiert. Anschließend wurden DH5 $\alpha$  Bakterien transformiert und mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung ein positiver Klon identifiziert. Darüberhinaus wurde mit Hilfe einer NCBI Blast Suche ausgeschlossen, daß die Sonde unspezifisch an größere homologe Bereiche im Mausgenom bindet.

Der Vektor pGEM T-easy enthält Promotorsequenzen der Bakteriophagen-RNA-Polymerasen T7 und SP6. Die entsprechende RNA-Polymerase synthetisiert *in vitro* in Gegenwart von markierten und unmarkierten Nukleotiden einzelsträngige RNA-Sonden, sogenannte Ribosonden. Die hohe Promotorspezifität von Bakteriophagenpolymerasen erlaubt es, einzelsträngige RNA-Sonden herzustellen, die wahlweise komplementär zum codierenden (*sense*) oder nichtcodierenden (*antisense*) Strang sind. Beim Nachweis von mRNA dient die Hybridisierung mit dem codierenden Strang als Negativkontrolle, um die Spezifität der positiven, *antisense* Sonde zu überprüfen.

Vor der *in vitro*-Transkription (PCR) wurde der Vektor unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen SacII für die *antisense*- und Sall für die *sense*-Sonde linearisiert. Vor der Markierung wurden die Fragmente unter denaturierenden Bedingungen in einem TBE-Agarosegel (1,11 % Formaldehyd) sowie mittels Sequenzierung überprüft.

#### Fixieren der Schnitte

Die Schnitte wurden bei 4°C 10min in 4% Paraformaldehyd (in 1 x PBS) fixiert und anschließend 2x 5min in 1 x PBS gewaschen.

Quervernetzende Fixiermittel (wie Glutaraldehyd und Formaldehyd) erhalten zwar die Struktur des Gewebes und begrenzen den Verlust enthaltener Nukleinsäuren, vermindern jedoch die Permeabilität, so daß Sonde und Nachweisreagentien schlecht eindringen können. Der Grad der Fixierung ist umgekehrt proportional zur Durchlässigkeit des Gewebes. Eine anschließende Acetylierung dient u.a. der Neutralisierung positiv geladener sowie basischer Moleküle und verhindert eine unspezifische Bindung der Sonde. Die Schnitte wurden 10min in Acetylierungspuffer inkubiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (60%, 80%, 90%, 95% und 100% für jeweils 5min) entwässert. Es folgten eine Inkubation in Chloroform und 100% Ethanol für 5min, dann wurden die Schnitte getrocknet und in einer feuchten Kammer bei 50°C für 2-3h mit je 0,5-1ml Prähybridisierungspuffer (enthält außer Dextransulfat die gleichen Bestandteile wie Hybridisierungspuffer) inkubiert.

---

Für die Hybridisierung wurde der Prähybridisierungspuffer entfernt, 100µl Hybridisierungspuffer mit 20ng DIG-markierter bzw.  $2 \times 10^6$ cpm radioaktiv markierter Sonde auf jeden Objektträger gegeben und bei 50°C ü. N. inkubiert.

#### Nachweis der RNA

Die mit der DIG-Sonde hybridisierten Objektträger wurden bei RT viermal je 5min in 2x SSC gewaschen, anschließend bei 50°C 20min in 2x SSC/50% Formamid/0,05 % Tween 20, 30min in 1 x SSC/50% Formamid/0,05 % Tween 20 und 30min in 0,1x SSC/50% Formamid/0,05 % Tween 20. Blockiert wurde für 30min in 1% Blocking Reagenz (Boehringer) in Puffer1. Der immunologische Nachweis von Digoxigenin mit anti-Dig-AP Fab-Fragmenten (1:500 in 1% Blocking Reagenz, Boehringer) erfolgte in einer feuchter Kammer bei 37°C für 60 Min bzw. bei 4°C über Nacht. Nach drei Waschschrritten bei RT, 2x 15 Min in Puffer1 sowie 1x 5min in Puffer2, wurden die Präparate für mehrere Stunden bei RT im Dunkeln mit Farblösung (NBT/BCIP, einem Substrat der Alkalinen Phosphatase, Roche) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 10min in H<sub>2</sub>O gespült und mit Glyzeringelantine (Merck) eindeckelt. Zum Nachweis der radioaktiven Sonde wurden die Objektträger zuerst dreimal je 5min in 4x SSC gewaschen, dann folgte eine RNase-Behandlung, wobei die Präparate zunächst 30min bei RT in 0,5M NaCl, 10mM Tris-HCL (pH 7,5), 1mM EDTA und 40µg RNase A/ml inkubiert wurden und weitere 30min bei 37°C im gleichen Puffer ohne RNase. Dannach wurden die Objektträger zweimal 15min bei 50°C in 2 x SSC gewaschen. Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, auf einen Röntgenfilm gelegt (Kodak Biomax MR) und ü. N. bis mehrere Tage exponiert. Das Beschichten mit Kodak NTB Emulsion erfolgte durch Eintauchen in bei 42°C geschmolzene Emulsion und dreistündiges Trocknen. Der Emulsionsfilm wurde einige Tage bis mehrere Wochen bei 4°C in Kästen, die mit Trockenmittel versehen waren, exponiert. Die Entwicklung der Autoradiografie wurde standardmäßig durchgeführt (2min Kodak D19 Entwickler, 1min H<sub>2</sub>O, 2x 10min Kodak Unifix, 3x 5min H<sub>2</sub>O), eine Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (5min, Merck) wurde angeschlossen. Die Präparate wurden mit H<sub>2</sub>O gespült und in 1% HCl/70% Äthanol entfärbt, bis die Emulsion farblos war. Zum Schluß wurden die Schnitte ein weiteres Mal 10min mit H<sub>2</sub>O gewaschen, mit Hilfe einer Alkoholreihe dehydriert, 2x 10min in Xylol inkubiert und in Entellan bzw. DPX *mounting medium* (Sigma-Aldrich) eingebettet.

---

### 3.1.22 Microarray

Microarray Analysen ermöglichen die Messung von Genexpressionsmustern und den Vergleich zwischen zwei Genotypen in großem Maßstab. Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte „Whole Mouse Genome Oligo Microarray 4x44K“ der Firma Agilent beinhaltet über 40000 Gene und Transkripte der Maus. Bei der Agilent-Technologie wird aus Zellen oder Geweben Gesamt-RNA isoliert, der mRNA-Anteil der Gesamt-RNA wird zunächst in cDNA, dann in fluoreszenzmarkierte cRNA umgeschrieben. Nach einer Aufreinigung und Fragmentierung werden die cRNA Proben mit den Oligonukleotidsequenzen auf dem Microarray hybridisiert. Agilent nutzt die *Inkjet* Technologie um 60-mere Oligonukleotide direkt auf dem Trägermaterial zu synthetisieren. Jedes Transkript wird durch eine Vielzahl von Oligonukleotiden repräsentiert. Zusätzlich ist auf dem *Array* für jedes korrekt synthetisierte Oligonukleotid (*perfect match*) ein fehlerhaftes Kontrollnukleotid (*mismatch*) lokalisiert. Ungebundene Proben werden nach der Hybridisierung durch Waschen entfernt. Anschließend wird der Array gescannt und die Quantifizierung erfolgt über die Intensität der Fluoreszenzsignale.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Genexpressionsprofil von heterozygot L1 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht. Gesamt-RNA aus dem Gehirn von je vier neugeborenen weiblichen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Tieren (P0) wurde wie unter 3.1.16 – 3.1.18 beschrieben isoliert, aufgereinigt und auf ihre Qualität sowie Quantität geprüft. Die gesamte Analyse per Mikroarray sowie die statistische Auswertung der Daten wurde von Prof. Ron Hart und seinen Mitarbeitern (W.M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, Rutgers, USA) durchgeführt.

### 3.1.23 Semiquantitative *Realtime*-PCR (qPCR)

Die semiquantitative *Realtime*-PCR (qPCR) ist eine Methode zum Vergleich der relativen Expressionslevel eines Gens in den unterschiedlichen Genotypen. Mit der cDNA des zu untersuchenden Gens wird gleichzeitig die cDNA eines konstitutiv exprimierten Haushaltsgens wie *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoryltransferase) oder  $\beta$ -*Aktin*, amplifiziert. Die eigentliche PCR-Reaktion verläuft wie bei der qualitativen PCR, mit dem Unterschied, daß dem Reaktionsansatz aus cDNA und PCR-Reagenzien der an die DNA bindende Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen (Anregungswellenlänge: 470 nm; Emissionswellenlänge: 585 nm) zugesetzt wird. Dieser besitzt im ungebundenen Zustand

---

eine geringe Eigenfluoreszenz, die durch die Bindung an doppelsträngiger DNA-Moleküle (dsDNA) deutlich erhöht wird. Die Fluoreszenzintensität korreliert hierbei mit der Menge an dsDNA. Diese Fluoreszenz wird während des gesamten PCR-Verlaufs „in Echtzeit“ im Cycler gemessen. Bei der späteren Auswertung (siehe unten) macht man sich den Effekt zu Nutze, daß die Anzahl der benötigten PCR-Zyklen bis zum Erreichen eines bestimmten Fluoreszenzintensitätssignals, mit der Anfangskonzentration korreliert. Um unterscheiden zu können, ob das Fluoreszenzsignal durch eine spezifische oder eine unspezifische Amplifikation entstanden ist, werden die Dissoziationstemperaturen verglichen. Diese sind für jedes Amplikon spezifisch. Zur Bestimmung der Dissoziationskurve, bzw. der Dissoziationstemperatur, wird die Temperatur des Reaktionsansatzes mit einer geringen Heizrate von 60°C auf 95°C erhitzt und parallel wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Kommt es zum temperaturabhängigen Aufschmelzen der Doppelstränge nimmt das Fluoreszenzsignal ab. Durch die Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen die Temperatur erhält man die Schmelzkurve. Trägt man die erste Ableitung der Fluoreszenzsignalintensität gegen die Temperatur auf, kann man für jedes Amplikon am Höhepunkt der Schmelzkurve eine spezifische Temperatur ermitteln. Treten zusätzliche Spitzen auf, läßt dies auf unspezifische Nebenprodukte schließen. Für jedes Primerpaar wurde deshalb eine PCR durchgeführt, die kein Template enthielt, um Rückschlüsse auf eventuelle Primerdimerbildungen des entsprechenden Primerpaares zu erhalten.

Zusätzlich wurde für jede cDNA eine -RT-Kontrollmessung mit untranskribierter RNA durchgeführt. Da die -RT-Kontrolle keine cDNA enthält, wird der CT-Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“) während einer PCR demnach nur durch eventuelle genomische DNA-Kontaminationen oder eventuelle Primerdimere hervorgerufen. Unterscheiden sich der -RT-CT-Wert und cDNA CT-Wert ausreichend, d.h., um mindestens fünf Zyklen, kann die Probe für die eigentlichen Messungen herangezogen werden.

Zur Überprüfung der Spezifität einer *Realtime*-PCR, wurde das Amplikon jedes Primerpaares sequenziert (vgl. 3.1.15) und auf ein 6%iges PAA-Gel aufgetragen.

#### Durchführung

Für die *Realtime*-PCR wurden 25ng RNA pro Ansatz in cDNA umgesetzt. Für die PCR wurde ein Komponentenkit (qPCR Core Kit, Eurogentec) verwendet. Die eingesetzten Primer sind unter 2.8 aufgelistet. Alle Ansätze wurden als Triplikate gemessen.

Für 20µl-Ansätze wurden die folgenden Komponenten pipettiert:

---

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

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

Das Temperaturprogramm für die *Realtime*-PCR wurde entsprechend der Herstellervorschrift gewählt.

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

\*Die Dissoziation erfolgt mit 2 % der maximalen Heizrate

### Auswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM SDS 2.1 Software und nach dem „Standardkurven Protokoll, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, User Bulletin #2“. Zur relativen Quantifizierung der Genexpression ist die Quantifizierung von zwei unterschiedlichen Genen, eines Zielgens und einer natürlichen Kontrolle, notwendig. Die Kontrolle ist erforderlich, um Schwankungen der cDNA-Ausgangsmenge, die durch Pipettierfehler oder unterschiedliche Effizienzen der reversen Transkription bedingt sind, auszugleichen (Normalisierung). Für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit dienten zwei endogene Haushaltsgene, Aktin und HPRT, als Kontrolle, die in konstanter Konzentration vorlagen. Gemessen wurden die Fluoreszenzintensitäten die als  $R_n$  bzw.  $\Delta R_n$  ausgegeben werden.  $R_n$  ist der Quotient aus der emittierten Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffs und einer passiven Referenz.  $\Delta R_n$  ergibt sich durch Subtraktion des Baselinefluoreszenzsignals von  $R_n$ . Das Baselinefluoreszenzsignal ergibt sich aus den mittleren Fluoreszenzsignalen der manuell festgelegten anfänglichen Zyklen der PCR.

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

### Relative Standardkurven-Methode

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

Pro Gen wurde mittels qPCR ein  $C_T$ -Wert bestimmt. Da jeder Ansatz als Triplikat gemessen wurde, wurde zuerst aus allen Triplikaten ein Mittelwert gebildet und dieser im Folgenden als  $C_T$ -Wert für das jeweilige Gen behandelt. Für die Normalisierung wurden die individuellen  $C_T$ -Werte pro Referenzgen gemittelt und die Differenz der individuellen  $C_T$ -Werte des Referenzgens zu diesem Mittelwert gebildet ( $\Delta C_{TR}$ ).

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

Die Effizienz errechnet sich wie folgt<sup>94</sup>:

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

Anschließend wurde mit  $\Delta C_{TR}$ , der Effizienzen für Referenzgen und Zielgen der Faktor  $\Delta C_{T RE}$  berechnet:

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

Zur Berechnung der  $\Delta C_{TZ}$ -Werte wurden die individuellen  $\Delta C_{T RE}$  des  $C_T$ -Wert, des im selben Tier gemessenen Zielgens, subtrahiert:

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

**Tab. 3.1:** Übersicht der verwendeten Kalibrierungsformeln, Steigungen und Effizienzen der mittels qPCR untersuchten Gene.

Gen	Kalibrierungsformel	Korrelation	Steigung	-1/Steigung	Effizienz (%)
GH	$y = -3,9962x + 30,556$	$R^2 = 0,9868$	-3,9962	0,250237726	78
CGA	$y = -3,6236x + 24,49$	$R^2 = 0,9961$	-3,6236	0,27596865	89
POMC	$y = -4,3042x + 33,507$	$R^2 = 0,9987$	-4,3042	0,232331211	71
NEO	$y = -3,5067x + 25,318$	$R^2 = 0,9985$	-3,5067	0,285168392	93
Aktin	$y = -3,5193x + 23,339$	$R^2 = 0,9974$	-3,5193	0,284147416	92
HPRT	$y = -3,0107x + 21,368$	$R^2 = 0,9672$	-3,0107	0,33214867	115

Die Kalibrierungsformeln wurden der Bachelorarbeit von Kathrin Hoffmann entnommen (Hoffmann, 2007). Ein  $R^2$ -Wert zwischen 0,9 und 1 bedeutet eine Korrelation. Die Steigung ergibt sich aus der Formel  $y = ax + b$ , wobei  $a$  als Steigung definiert ist. Die Effizienzberechnung erfolgte nach Pfaffl *et al.*<sup>94</sup>.

Die so ermittelten  $\Delta C_T$ -Werte, wurden in die Kalibrierungsformel eingesetzt und die umgekehrten Logarithmen der Resultate ermittelt, um die Ausgangsmenge an eingesetzter RNA abzuschätzen. Anschließend wurde, um eine relative Expression des jeweiligen Gens zu ermitteln, ein Kalibrator (Wildtyp-Mäuse) definiert, dieser auf 1 gesetzt und alle anderen Werte in Relation dazu errechnet.

## 3.2 Biochemische Methoden

### 3.2.1 Isolierung von Protein

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Gesamthirnhomogenat sieben Tager alter Mäuse (P7) der Linie L1ki129 mittels Western Blot untersucht. Die Gehirne wurden einzeln in PBS-complete-Lösung auf Eis *gepottert*. In einem anschließenden Zentrifugationsschritt (1000xg bei 4°C für 15min) wurden die Zellkerne inklusive störender DNA abgetrennt. Nur der Überstand wurde weiterverwendet. Die Proteinbestimmung nach Bradford (BCA-Test) wurde in jeweils Dreifachansätzen durchgeführt.

### 3.2.2 Proteinbestimmung (BCA-Test)

Die Bestimmung der Konzentration von Proteingemischen<sup>95</sup> wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kits der Firma Pierce (Bonn) in Mikrotiter-Platten durchgeführt. Zur

Herstellung der BCA-Lösung wurden Reagenz A und B in dem Verhältnis 1:50 gemischt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 210µl. 10µl der zu analysierenden Probe wurden mit 200µl BCA-Lösung versetzt, der Ansatz gemischt und für 45min bei 37°C inkubiert. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach 45minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 560 nm. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe bestehend aus 0 µg/ml – 1000 µg/ml BSA (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml) in oben beschriebener Weise angesetzt und mit den zu analysierenden Proben inkubiert. Mit Hilfe der linearen Regression wurde anhand der gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt.

### **3.2.2 Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)**

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli<sup>96</sup> durchgeführt. Für die Analyse von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 50 – 200 kDa wurden 8%ige Trenngele von 1mm Dicke mit einer Laufstrecke von 0,5cm im Sammelgel und 5cm im Trenngel verwendet.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit SDS Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5min erhitzt und kurz zentrifugiert. Als Größenvergleich wurde zusätzlich ein Proteinmarker (Precision Plus Protein Dual Color Standards von Biorad) aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde für das Sammelgel bei 80V durchgeführt. Beim Übergang der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 130-160V erhöht (Mini-PROTEAN 3 Cell, BioRad, München). Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden Proteine mit Hilfe der Immunoblot-Analyse/Western Blot spezifisch über einen Antikörper nachgewiesen werden.

### **3.2.3 Western Blot**

Der Western Blot wurde von Towbin *et al.* 1979 eingeführt und bezeichnet das Verfahren Proteine, die zuvor elektrophoretisch getrennt wurden, auf eine Membran zu übertragen<sup>97</sup>. Der Nachweis erfolgt anschließend mit Hilfe von markierten Antikörpern.

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine von SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (Protan Nitrocellulosemembran, Schleicher & Schuell, Daßel) wurden MINI TRANSBLOT Apparaturen von Biorad (München) verwendet. Das Transfer-Sandwich, bestehend aus einem Schwamm, drei Whatman-Filtern (Whatman BIOMETRA, Göttingen),

---

dem SDS-Gel, der Nitrocellulose-Membran, wiederum drei Whatman-Filtern und einem Schwamm wurde nach Angaben des Herstellers in die Blotting-Apparatur eingesetzt (Kathode – Anode) . Alle Bestandteile des Sandwiches wurden vor dem Gebrauch in 1x Blottingpuffer getränkt. Der Transfer dauerte in der Regel 120min bei einer Stromstärke von 400 mA und wurde bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran kurz mit TBST gespült. Zur Überprüfung des Transfers ist es möglich die Proteine auf der Membran reversibel mit Ponceau-S-Lösung zu färben. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurden die hydrophoben Bereiche der Membran mit Milchpulverlösung (3% in TBS) für 1-2 h bei RT blockiert.

#### Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen für eine Stunde bei RT in 3 % Blockierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blockierungslösung) entweder für eine Stunde bei RT oder ü. N. bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert<sup>98</sup>. Alle weiteren Inkubations- und Waschschrte wurden bei RT durchgeführt. Nach sechs Waschschrten à 5min mit TBST wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in TBST) für 1h inkubiert. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die entsprechenden Verdünnungen sind Kapitel 2.9 zu entnehmen. Nach vier weiteren Waschschrten mit TBST à 10min wurde die Nachweisreaktion angeschlossen.

#### Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz

Die Nachweisreaktion erfolgte über das an die verwendeten Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish-peroxidase), das chemilumineszente Substrate umsetzen kann. Für die Nachweisreaktion wurden die Reagenzien Super Signal West Dura Extended Duration Substrate der Firma Perbio (Bonn) verwendet, im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Nitrocellulose-Membran gegeben und für 1min inkubiert. Danach wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Filmkassette gelegt. Die Auswertung erfolgte durch Belichtung eines Röntgenfilms (Kodak BioMax Light Film, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) über verschiedene Zeiträume.

---

### Stripping einer Western Blot Membran

Zur Detektion eines zusätzlichen Antikörpers auf einer bereits benutzten Nitrocellulose-Membran wurde diese mit einer Stripping-Lösung versetzt und für 20min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dies führt zum Ablösen der bereits gebundenen Antikörper. Nach einer fünf- bis zehnminütigen anschließenden Inkubation mit 1M Tris-HCl (pH 8,0) wurde mit dem immunologischen Nachweis, wie oben beschrieben, fortgefahren.

## 3.3 Immunhistomorphologie

### 3.3.1 Versuchstiere

Alle immunhistomorphologischen Untersuchungen wurden an Tieren der Linie L1ki129 durchgeführt. Es wurden Embryonen, neugeborene (P0), junge (P7) sowie adulte Mäuse (ca. 3 Monate) analysiert. Für die angegebenen Embryonalstadien gilt, E0 ist die Mitte des Tag-Nacht-Zyklus (00:00h) am Tag der Detektion des *vaginal plug*. Die Tiere waren in der Versuchstierhaltung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg untergebracht. Der Hell-Dunkel-Zyklus betrug 12 Stunden, die Tiere erhielten Nahrung und Wasser *ad libitum*. Die BrdU-Injektionen sowie die Organentnahme waren durch die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Hansestadt Hamburg genehmigt.

### 3.3.2 Präparation der Gewebe

Adulte Tiere wurden mit einer tödlich Dosis Narcoren (100µl pro Tier i.p., Merial) tief betäubt und mit PFA (4% Paraformaldehyd und 0.1% CaCl<sub>2</sub> in 0.1 M Cacodylat Puffer, pH 7.3) perfundiert. Das Gehirn wurde 2h *in situ* post-fixiert und anschließend entnommen. Schwangere Mäuse wurden durch zervikale Dislokation, Jungtiere per Scherenschlag getötet. Die Gehirne von P7-Tieren sowie Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden direkt entnommen und über Nacht bei 4°C in PFA fixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Gewebe anschließend für weitere 18 – 24 Stunden bei 4°C in PFA mit 15% Sucrose inkubiert. Die Proben wurden in gekühltem 2-Methylbutan (Isopentan) tiefgefroren und bei –20°C gelagert. An einem Kryostat (Leica) wurden 25µm dicke serielle koronare Schnitte der Embryonen sowie der Jungtiere angefertigt, auf SuperFrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen und bei –80°C aufbewahrt. Die Gehirne adulter Tiere wurden in 6% w/v Agar eingebettet und an einem Vibratom (Leica) geschnitten (50µm).

---

Zusätzlich wurden Gehirne adulter Mäuse direkt nach dem Perfundieren entnommen und maschinell in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 4µm Paraffinschnitte mit einem Mikrotom (Leica) hergestellt.

### 3.3.3 Immunfärbung

Die Fixierung mit Aldehyden führt zu einer Vernetzung der Moleküle, wodurch die Antigene „maskiert“ werden. Für die Immunfärbung wurden die Schnitte auf den Objektträgern zunächst aufgetaut (15min bei 37°C). Zur „Demaskierung“ der Antigene (*antigene retrieval*) wurden die Schnitte für 30min im Wasserbad in 10mM Na-Zitrat-Lösung auf 80°C erhitzt<sup>99</sup>. Nach dem Abkühlen der Küvette (15-20min bei RT), wurden die Objektträger mit PBS gespült und anschließend eine Stunde bei RT in normalem Eselserum (NDS) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der Primärantikörper wurde in Lamda-Carrageen verdünnt und die Schnitte darin mindestens 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnungen sind Kapitel 2.9 zu entnehmen. Alle weiteren Schritte wurden bei RT durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger in PBS folgte die Inkubation in Sekundärantikörper (1:200 in lambda-Carrageenan) für 2 Stunden im Dunkeln. Zur Kernfärbung wurden die Schnitte nach erneutem Waschen (3x 15 Minuten in PBS) für 10min mit Bis-Benzimid in PBS inkubiert. Abschließend wurden die Objektträger zweimal 5min in PBS gewaschen, kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült und dann mit Fluoromount-G (Southern Biotech) eingedeckelt<sup>100, 101</sup>. Nach 24 Stunden waren die Schnitte ausgehärtet und konnten mikroskopiert werden. Sie wurden bei 4°C dunkel gelagert.

Für die BrdU-Markierung wurde schwangeren Mäusen zwei Stunden vor der Tötung BrdU (in PBS, 100µg/g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die Schnitte dieser Tiere wurden 20min bei 60°C mit 0,1M HCl inkubiert, um die DNA zu denaturieren und damit die Bindung der Antikörper an BrdU zu ermöglichen. Anschließend wurden die Präparate 3x 10min mit 50mM Glycin in PBS gespült und für die immunhistochemische Färbung wurde wie oben beschrieben verfahren.

### 3.3.4 Analyse und Statistik

Alle quantitativen Analysen erfolgten an einem Axioskop Mikroskop (Zeiss), das mit einem Neurolucida System (BioMetric, Weiterstadt) ausgerüstet war. Volumina wurden mit Hilfe der UTHSCSA ImageTool Software nach dem Prinzip von Cavalieri bestimmt. Um die Dichte an Zellen pro Fläche ( $N_A$ ) in Dichte pro Volumen ( $N_V$ ) angeben zu können, fand in einigen Fällen folgende Formel Anwendung<sup>102, 103</sup>:

$$N_V = \frac{N_A}{t+d}$$

$t$  gibt die Dicke des Schnitts an,  $d$  den mittleren Durchmesser einer Zelle.

Für die statistische Auswertung wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

---

## ERGEBNISSE

---

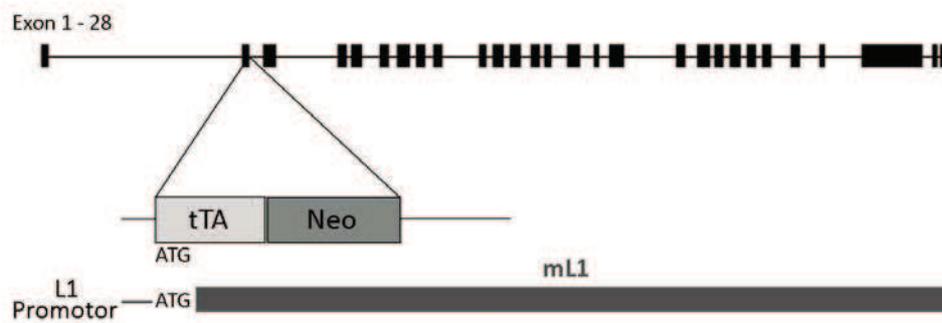
## 4. Ergebnisse

Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 spielt eine Schlüsselrolle während der Entwicklung des Nervensystems, einschließlich neuronaler Migration, Neuritenwachstum, axonaler Wegfindung und Faszikulierung. Mutationen in *L1* sind verantwortlich für ein breites Spektrum neurologischer Beeinträchtigungen, Fehlbildungen des Gehirns und geistiger Unterentwicklung (L1-Syndrom). Über heterozygote Trägerinnen ist sehr wenig bekannt. Meist werden sie in der Literatur als asymptomatisch beschrieben, es gibt allerdings Berichte über einige betroffene Trägerinnen. Diese weisen häufig nur ein klinisches Merkmal des L1-Syndroms auf, z.B. angewinkelte Daumen oder milde geistige Retardierung bzw. Lernschwierigkeiten, es kann allerdings auch ein Hydrozephalus (mit neonatalem Tod) auftreten<sup>77, 104</sup>.

2001 wurde in unserem Labor eine L1 Knockout-Mausmutante generiert, bei der die Proteinexpression von L1 vollständig aufgehoben ist (L1ki129, M. Kutsche). Diese Linie stellt neben den beiden 1997 von Dahme<sup>82</sup> und Cohen<sup>83</sup> generierten Mausmodellen ein drittes für das humane L1-Syndrom dar. Ein Ziel meiner Arbeit war es, diese bislang kaum beschriebene Mutante L1ki129 zu charakterisieren. Das Hauptaugenmerk meiner Studie lag jedoch auf der Analyse heterozygot L1 defizienter Mäuse dieses Stamms. Diese „Trägerinnen“ wurden auf funktionelle sowie morphologische Unterschiede gegenüber Wildtyp-Mäusen untersucht. Die Auswirkungen eines inaktiven *L1*-Allels weiter aufzuklären und somit Erklärungen für die klinischen Auffälligkeiten heterozygoter Individuen zu finden.

## 4.1 Charakterisierung der Mauslinie L1ki129

Die L1/tTA Knockout-Maus, im Folgenden L1 Knockout-Maus genannt, wurde generiert, indem eine tTA-Neo (Tetrazyklintransaktivator-Neomycinresistenz) Kasette direkt *in frame* hinter das Startkodon des *L1* Gens kloniert wurde. Die inserierten 2,6kb ersetzen den codierenden Teil des Exons 2 sowie 50bp des Introns 2 (**Abb. 4.1**). Die regulatorischen Elemente des Introns blieben erhalten, die Translation von L1 wurde hierdurch jedoch unterbunden (M. Kutsche, Zentrum für Molekulare Neurobiologie, AG Schachner).



**Abb. 4.1: Strategie zur Generierung der L1/tTA Knockout-Maus.** Im oberen Bereich der Grafik ist die genomische Struktur des *L1* Gens der Maus dargestellt (Exon 1-28). Darunter ist das targeting Konstrukt skizziert, das aus einer tTA-Neo (Tetrazyklintransaktivator-Neomycinresistenz) Kasette besteht, flankiert von 1,1kb bzw. 7,2kb großen homologen Bereichen. Der DNA-Strang unten im Schaubild zeigt den Wildtyp-Zustand.

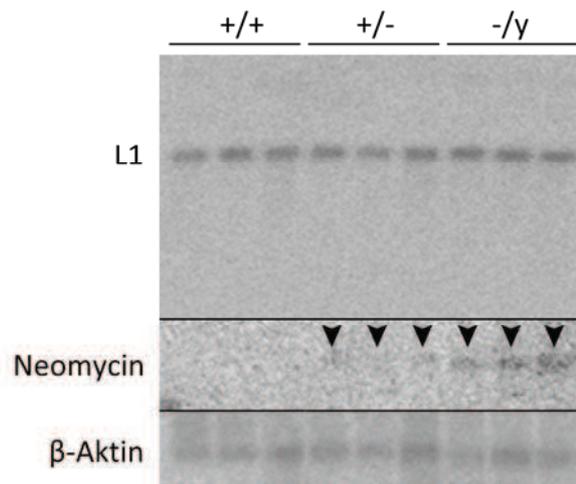
In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der L1 mRNA quantitativ mittels Northern Blot untersucht. Um festzustellen, ob bei heterozygoten Mäusen im Gehirn eine präferentielle X-Inaktivierung des mutierten Chromosoms stattfindet bzw. ob die inaktiven und aktiven X-Chromosomen gleichmäßig verteilt oder in Clustern angeordnet sind, wurden *in situ*-Hybridisierungen und immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten durchgeführt.

### 4.1.1 Expression der mRNA

Aus dem Gesamthirnhomogenat neugeborener Wildtyp-, heterozygot L1 defizienter und L1 Knockout-Mäuse (postnataler Tag 0, P0) wurde RNA gewonnen. Die Qualität der isolierten

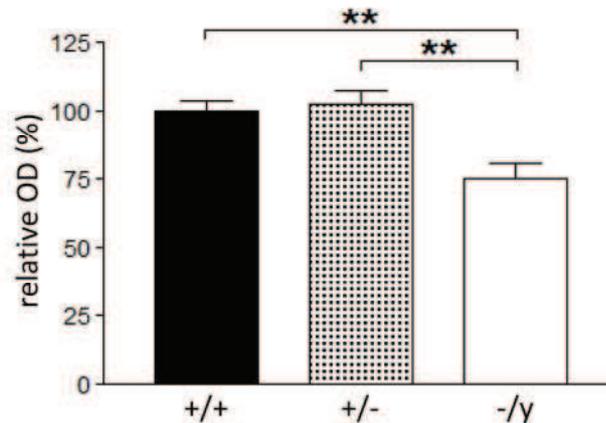
RNA wurde durch Gelelektrophorese in einem 1,5%igem TBE-Agarosegel sowie mit einem Agilent RNA 6000 Nano Chip überprüft.

Durch Restriktionsverdau in der Arbeitsgruppe vorhandener Plasmide wurden 1-1,6kb große Sonden zur Detektion der mRNA von *L1*, Neomycin und Aktin als Ladekontrolle hergestellt. Die Restriktionsfragmente wurden hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität kontrolliert. Dann wurden die drei Sonden radioaktiv ( $p32$ ) markiert und zum Nachweis der Expression der Zielgene im Northern Blot verwendet. Dabei diente die *L1*-Sonde sowohl dem Nachweis der Expression des Wildtyp-*L1* Gens als auch des mutierten *L1* Gens (mit Insertion der tTA-Neo Kasette), während die Neomycin-Sonde ausschließlich das mutierte *L1* Gen detektierte. Die Expression der *L1* mRNA war in allen drei Genotypen detektierbar. Neomycin mRNA ließ sich deutlich in den Knockout-Tieren (homozygot *L1* defizient) nachweisen, während in den heterozygoten Tieren nur eine schwache Bande erkennbar war. In den Wildtyp-Tieren fehlte das Signal erwartungsgemäß. Die Hybridisierung mit der Sonde zum Nachweis von  $\beta$ -Aktin veranschaulicht die gleichmäßige Expression des Kontrollgens in den untersuchten Wildtyp- sowie den heterozygot *L1* defizienten und den *L1* Knockout-Mäusen. **Abb. 4.2** zeigt einen repräsentativen Northern Blot.



**Abb. 4.2: Northern Blot.** Es wurden je 20 $\mu$ g RNA aus Gesamthirnhomogenat von Wildtyp- (+/+), heterozygot *L1* defizienten (+/-) sowie Knockout-Mäusen (-/y) der Linie *L1ki129* aufgetragen. Dargestellt ist die Hybridisierung derselben Membran mit Sonden für *L1*, Neomycin und das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. In allen drei Genotypen ist mRNA des *L1* Gens detektierbar. Eine Expression von Neomycin läßt sich deutlich in -/y-Mäusen nachweisen, in heterozygoten Mäusen ist ebenfalls eine schwache Bande erkennbar (siehe Pfeilspitzen). Wildtyp-Tieren fehlt das Signal erwartungsgemäß.

Zur Quantifizierung des Expressionsniveaus der L1 mRNA wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Das Haushaltsgen Aktin diente der Normalisierung. Die quantitative Analyse der mRNA-Expression im Northern Blot zeigte eine signifikante Reduktion in den Knockout-Tieren um etwa 25%. Die Wildtyp- und die heterozygot L1 defizienten Tiere unterschieden sich hinsichtlich des Expressionsniveaus der L1 mRNA nicht (Abb. 4.3).



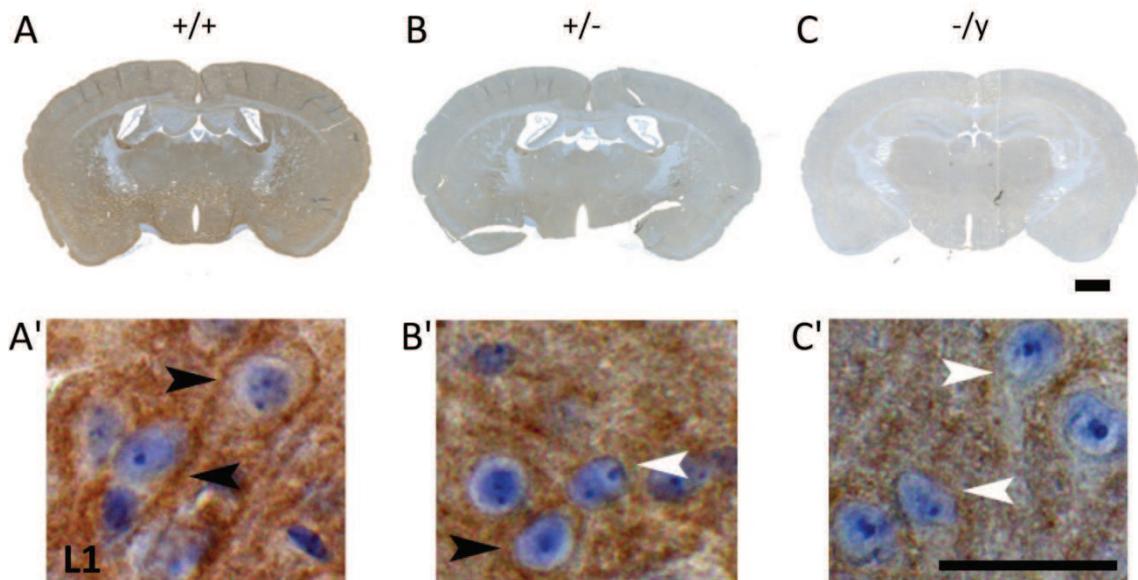
**Abb. 4.3: Quantitative Analyse der L1 mRNA Expression** in drei voneinander unabhängigen Northern Blot Experimenten (vgl. 4.1). In allen drei Genotypen war die mRNA des *L1* Gens detektierbar. Jede Probe wurde mit dem Haushaltsgen Aktin normalisiert. Die Expressionsniveaus sind in Prozent angegeben (mit Standardabweichung, SD) bezogen auf das Expressionsniveau der Wildtyp-Tiere, das auf 100% festgesetzt wurde. Zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen besteht kein quantitativer Unterschied, die Expression in L1 Knockout-Mäusen ist signifikant reduziert (Mann-Whitney-U-Test, \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 4.1.2 Lokalisation von mRNA und Protein

Das mutierte X-Chromosom in heterozygot L1 defizienten Mäusen könnte sowohl präferentiell als auch zufällig inaktiviert werden. Bei einer zufälligen X-Inaktivierung könnten die inaktiven und aktiven X-Chromosomen gleichmäßig verteilt oder in Clustern angeordnet sein. Um die Art der X-Inaktivierung zu untersuchen, wurden *in situ*-Hybridisierungen und immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten durchgeführt.

Für die *in situ*-Hybridisierung wurde unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) eine Sonde zur Detektion der mRNA von Neomycin amplifiziert. Im Mausgenom sind keine homologen Regionen zum *Neomycin*-Gen vorhanden, so daß eine unspezifische Hybridisierung mit genomischer DNA unwahrscheinlich ist. Die *antisense*- und *sense*-Sonden wurden mittels Sequenzierung und Agarosegel auf ihre Qualität und Menge überprüft. Der

Nachweis erfolgte sowohl mit Digoxigenin als auch radioaktiv ( $^{35}\text{S}$ ). Der Einsatz radioaktiv markierter Sonden lieferte ein stärkeres, jedoch gröberes Signal (nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden in Paraffinschnitten L1-positive Zellen mit Antikörpern (L1 555) detektiert und mit Hilfe von DAB (3,3'-Diaminobenzidin) sichtbar gemacht (**Abb. 4.4**). Beide Methoden lieferten vergleichbare Ergebnisse. Große Cluster L1-positiver oder L1-negativer Bereiche waren nicht zu erkennen, ein deutlicher quantitativer Unterschied bestand dennoch zwischen den drei Genotypen, wie die Übersicht (**Abb. 4.4 A, B, C**) zeigt. Auf Zellebene konnten nur die Paraffinschnitte untersucht werden. Hier bestätigte sich der makroskopische Befund: In heterozygot L1 defizienten Mäusen wurden einzelne L1-positive neben einzelnen L1-negativen Neurone detektiert (siehe schwarze und weiße Pfeilspitzen in **Abb. 4.4 B'**), während in den Wildtyp-Mäusen alle Neurone angefärbt waren (**Abb. 4.4 A'**) und in den Knockout-Mäusen keine L1-positiven Neurone identifiziert werden konnten (**Abb. 4.4 C'**).

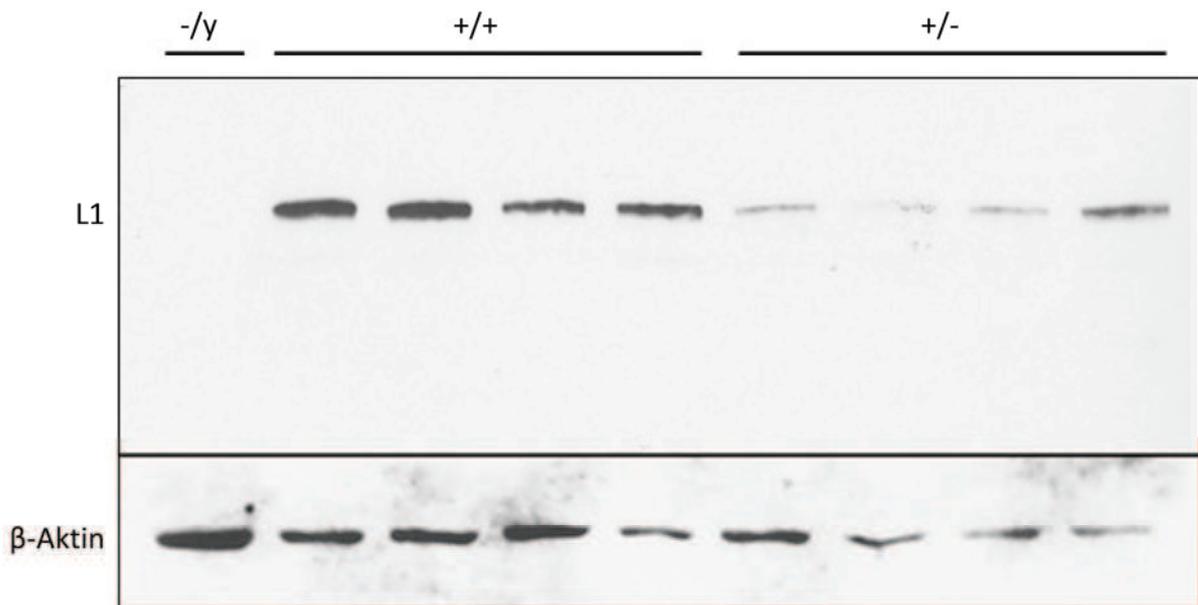


**Abb. 4.4: Immunhistochemische Färbung von L1 in Paraffinschnitten.** Zur Lokalisation von L1 bzw. um die Verteilung L1-positiver und L1-negativer Zellen in heterozygot L1 defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte von adulten Wildtyp- (+/+), heterozygot L1 defizienten (+/-) sowie homozygot L1 defizienten Mäusen (L1 Knockout, -/-) mit monoklonalen anti-L1 Antikörpern (555) gefärbt. In den Übersichtsaufnahmen ist ein deutlicher quantitativer Unterschied zwischen den drei Genotypen erkennbar (**Abb. A-C**). Auf Zellebene bestätigte sich dieser Befund. L1 wird an der Zelloberfläche exprimiert und ist als braune Färbung (DAB) sichtbar (schwarze Pfeilspitzen). Die Zellkerne sind in blau dargestellt (Hämalaun). Da L1 auch auf den Neuriten der Neurone exprimiert wird, ist auch der Gewebsgrund angefärbt. In Wildtyp-Tieren war L1 auf allen Zelloberflächen zu detektieren (**Abb. A'**) wohingegen in heterozygoten Tieren L1-positive neben L1-negativen Zellen (weiße Pfeilspitzen) vorlagen (**Abb. B'**). Diese waren nicht in Clustern sondern gleichmäßig verteilt. In L1 Knockout-Mäusen waren erwartungsgemäß keine L1-Moleküle nachweisbar (**Abb. C'**).

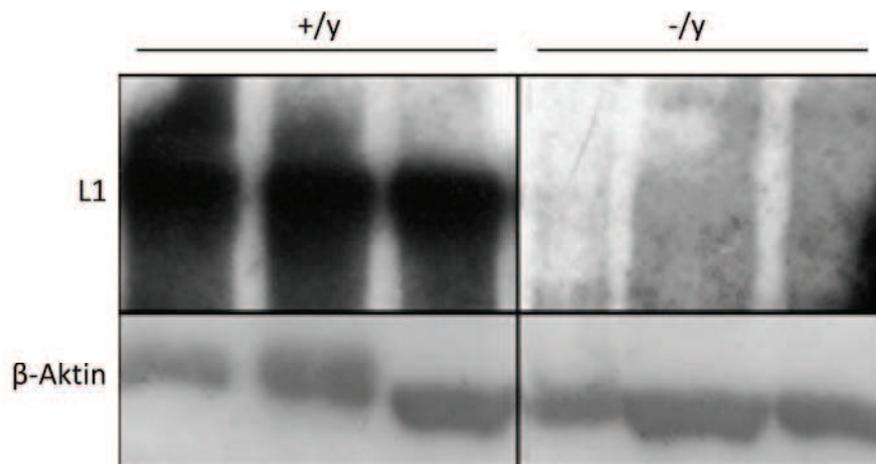
### 4.1.3 Proteinexpression

Die früher publizierten L1 Knockout-Mäuse stellten funktionelle Nullmutationen des Gens dar, die Proteinexpression des *L1* Gens war jedoch nicht vollständig unterdrückt. Dahme *et al.*<sup>82</sup> beschrieben in der Western Blot Analyse ihrer zwei Monate alten L1 Knockout-Mäuse eine sehr schwache Bande bei 190kDa (diese kleinere Isoform war vermutlich die Folge alternativen Spleißens). Cohen *et al.* zeigten ebenfalls das Fehlen des Wildtyp-Proteins (ca. 200kDa) sowie anderer, neuer Produkte mit geringerem Molekulargewicht in adulten Tieren, präsentierten allerdings keine längere Exposition des Western Blots<sup>83</sup>.

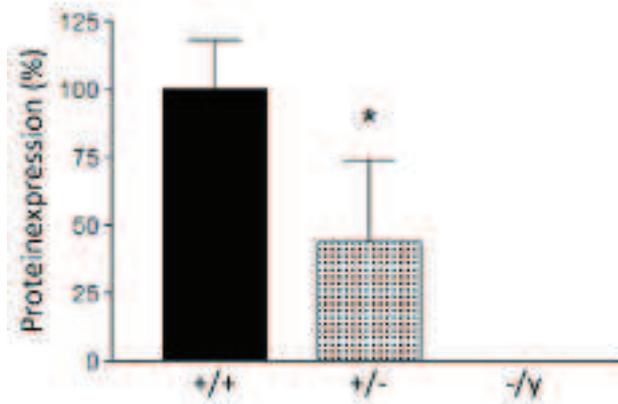
In meiner Arbeit wurde zur Analyse der Proteinexpression in Tieren des L1ki129-Stammes Gesamthirnhomogenat 7 Tage alter Mäuse (P7) verwendet. Die Lysate (10µg und 25µg) wurden im Western Blot mit einem monoklonalen sowie einem polyklonalen Antikörper gegen L1 (L1 555, L1 polyklonal) und einem Antikörper gegen Aktin als Ladekontrolle untersucht. **Abb. 4.5** zeigt einen repräsentativen Western Blot. Auch nach einer langen Exposition des Films war kein Protein detektierbar, so daß das Vorliegen einer kompletten Nullmutation bezüglich des *L1* Gens in L1 Knockout-Mäusen der L1ki129-Linie nachgewiesen werden konnte (**Abb. 4.6**). Darüber hinaus zeigte die quantitative Auswertung eine um etwa 50% reduzierte Expression von L1 in heterozygoten Weibchen (**Abb. 4.7**). Dieser Befund spricht gegen eine präferentielle X-Inaktivierung des mutierten X-Chromosoms in heterozygot L1 defizienten Tieren.



**Abb. 4.5: Western Blot.** In jeder Spur wurden 10µg Protein aus Gesamthirnhomogenat neugeborener Mäuse (P7) aufgetragen. Zuerst wurde die Membran mit einem monoklonalen Antikörper gegen L1 (555) inkubiert, anschließend, zum Nachweis einer gleichmäßigen Beladung, mit einem Antikörper gegen β-Aktin. In Knockout-Tieren ließ sich L1 nicht nachweisen. Die Proteinexpression in heterozygoten Mäusen war, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, deutlich verringert.



**Abb. 4.6: Western Blot.** Um das vollständige Fehlen der Expression des L1 Moleküls (komplette Nullmutation) in Knockout-Tieren der Linie L1ki129 zu zeigen, wurden je 25µg Protein von drei Wildtyp-Männchen (+/y) und drei Knockout-Tieren (-/y) aus demselben Wurf auf das oben dargestellte Gel geladen. Der Nachweis erfolgte mit dem L1-555-Antikörper sowie mit β-Aktin als Ladekontrolle. Auch nach einer sehr langen Exposition war bei -/y Mäusen kein L1 Protein nachweisbar.



**Abb. 4.7: Die quantitative Auswertung der Proteinmengen** basiert auf drei voneinander unabhängigen Experimenten (mit jeweils  $n = 4$  Tieren). In heterozygoten Mäusen wurde etwa 50% der Menge an L1 detektiert (dargestellt mit Standardabweichung), die in Wildtyp-Mäusen nachweisbar war (Mann-Whitney-U-Test,  $* p < 0.05$ ). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß während der X-Inaktivierung nicht präferentiell das mutierte X-Chromosom der heterozygoten „Trägerinnen“ inaktiviert wird. Knockout-Tiere zeigten keine L1 Proteinexpression.

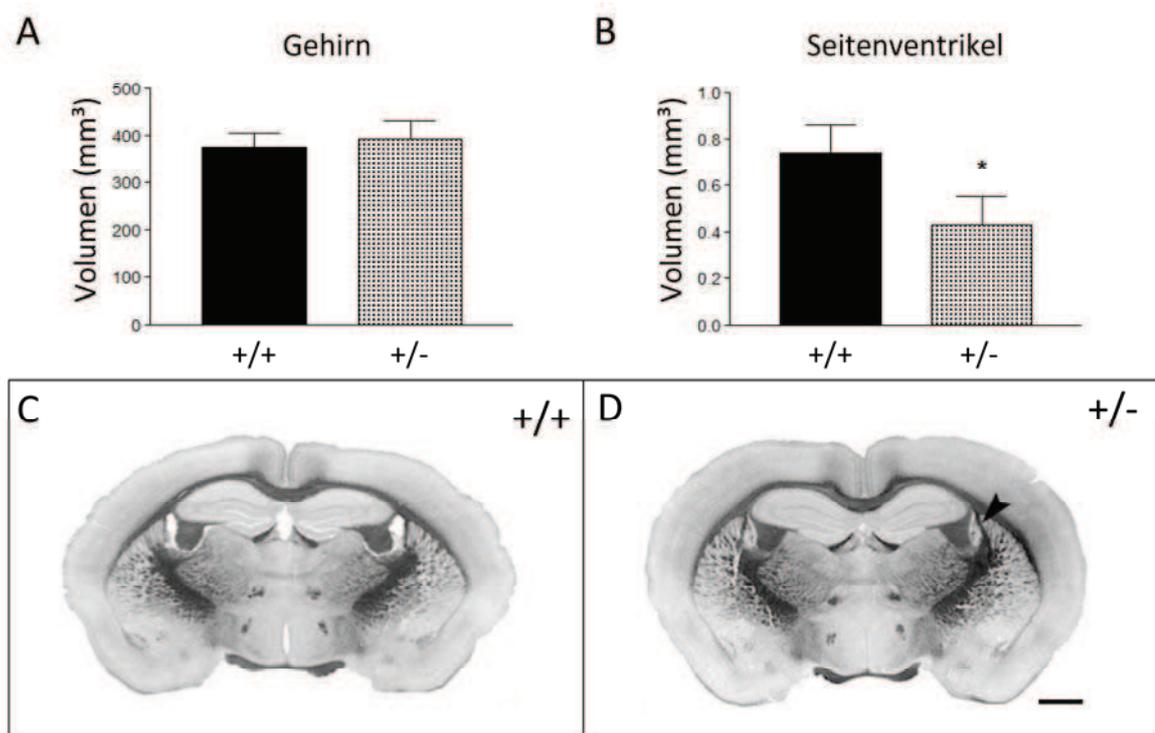
## 4.2 Analyse heterozygot L1 defizienter Tiere

### 4.2.1 Physiologische Untersuchungen

Das Gehirn von L1 Knockout-Mäusen wird in der Literatur als anatomisch normal beschrieben<sup>86</sup>, wobei das Gesamthirnvolumen in Übereinstimmung mit dem geringeren Körpergewicht der Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen jedoch signifikant reduziert ist. Die Seitenventrikel sind deutlich vergrößert<sup>67</sup>. Rolf *et al.* konnten zeigen, daß sowohl die Dilatation der Seitenventrikel als auch das Auftreten eines Hydrozephalus abhängig vom Mausstamm, d.h. vom genetischen Hintergrund der L1 Knockout-Tiere, sind. L1 defiziente C57BL/6J-Mäuse entwickeln zum Teil einen schweren Hydrozephalus mit massiv erweiterten Ventrikeln und einer stark atrophierten Großhirnrinde, während Mäuse mit 129Sv-Hintergrund nur leicht vergrößerte Seitenventrikel aufweisen und ein Hydrozephalus selten auftritt<sup>85</sup>.

Dieselben Parameter wurden bei adulten heterozygot L1 defizienten Weibchen der L1ki129-Linie im Vergleich mit Wildtyp-Weibchen untersucht.

Das Gesamtvolumen des Gehirns wurde nach dem Cavalieri Prinzip berechnet. Zwischen adulten Wildtyp- und heterozygoten Tieren wurde bezüglich des Gehirnvolumens kein Unterschied festgestellt (**Abb. 4.8 A**). Auch für das Volumen des Hippocampus ergaben sich vergleichbare Werte in beiden Genotypen ( $11,5 \pm 1,0 \text{ mm}^3$  in Wildtyp- bzw.  $12,6 \pm 0,4 \text{ mm}^3$  in heterozygot L1 defizienten Mäusen). Das Körpergewicht unterschied sich ebenfalls nicht (**Tab. 4.1**). Auffällig war jedoch, daß das Volumen der Seitenventrikel bei heterozygot L1 defizienten Mäusen signifikant reduziert war (**Abb. 4.8 B,C und D**). Hervorzuheben ist, daß die heterozygoten Tiere bezüglich dieses Parameters weder einen den Knockout- oder Wildtyp-Tieren ähnlichen Befund aufwiesen noch eine Zwischenstufe zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren darstellten. In L1 Knockout-Mäusen wurden die Seitenventrikel stets als vergrößert beschrieben (siehe oben). Diese Sonderstellung, die die heterozygot L1 defizienten Mäuse damit einnehmen, wurde im Folgenden weiter untersucht.



**Abb. 4.8: Volumen des Gehirns und der Seitenventrikel.** Das Gesamtvolumen des Gehirns adulter Tiere (**Abb. C**) sowie das Volumen der Seitenventrikel (**Abb. B**) wurde mit Hilfe des Cavalieri Prinzips bestimmt (SD, n = 5). Das Gesamtvolumen des Gehirns heterozygoter Tiere (+/-) ist unauffällig, die Seitenventrikel weisen jedoch ein signifikant verringertes Volumen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (+/+) auf (Kolmogorow-Smirnow-Test, \* p < 0.05). In der unteren Hälfte der Abbildung sind lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Hirnschnitte von +/+ (**Abb. C**) und +/- Mäusen, (**Abb. D**) dargestellt. Maßstabsbalken = 1mm.

In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln konnten weitere funktionelle Daten erhoben werden. In physiologischen Untersuchungen wird die Dynamik der physikalischen, biochemischen und informationsverarbeiteten Funktionen der Mäuse erfaßt und so beispielsweise die biochemische Aktivität im Gehirn abgebildet.

Bezüglich des mittleren arteriellen Blutdruckes, des arteriellen pH-Wertes und der Partialdrücke von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> im arteriellen Blut zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Tab. 4.1). Zur Messung der Durchblutung (*cerebral blood flow*, CBF), der Proteinsynthese (*cerebral protein synthesis*, CPS) sowie des pH-Wertes im Gehirn wurde den Tieren radioaktiv markiertes <sup>3</sup>H-Leucin und <sup>14</sup>C-Iodoantipyrin injiziert. Anschließend angefertigte Gehirnschnitte wurden autoradiographisch ausgewertet. Der pH-Wert wurde mit Hilfe der Umbelliferon-Methode bestimmt. Die grobe Betrachtung der Autoradiogramme sowie der computergenerierten biochemischen Abbildungen des Gehirns wies keine qualitativen Anomalitäten auf. Um hämodynamische und metabolische Veränderungen zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen festzustellen, wurden einzelne Werte für das gesamte Gehirn analysiert. Das auffälligste Ergebnis war der signifikant niedrigere pH-Wert in heterozygot L1 defizienten Tieren (**Tab. 4.2**). Der angegebene Wert ist das gewichtete Mittel der intrazellulären und interstitiellen pH-Werte. Bei einem Verhältnis von extra- zu intrazellulärem Volumen von 30% zu 70% und einem interstitiellen pH von etwa 7,3, liegt der intrazelluläre pH-Wert des Wildtyps bei 7,10, was den Literaturangaben entspricht, und der der heterozygoten Mutante bei 6,68. Die Durchblutung sowie die Proteinsynthese wurden sowohl global als auch lokal bestimmt. Die mittlere cerebrale Proteinsynthese war in heterozygot L1 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren signifikant erhöht (**Tab. 4.2**). Darüber hinaus wurden auch 49 einzelne Regionen im Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon und der Weißen Substanz untersucht, wobei im sensomotorischen Cortex (sensorisches und motorisches Areal des Cortex) der Wildtyp-Mäuse eine fraktionelle Leucinaufnahme von  $0,16 \pm 0,04$  gemessen wurde, wohingegen der Wert in heterozygot L1 defizienten Mäusen mit  $0,28 \pm 0,08$  deutlich erhöht war (**Abb. 4.9** und Anhang Tab. 8.1). Die Meßwerte für den gesamten cerebralen Blutfluß unterschieden sich in beiden Genotypen nicht (**Abb. 4.7** und Anhang Tab. 8.2). In den 15 lokal analysierten Regionen des Großhirns war der Blutfluß nur im visuellen Cortex heterozygoter Mäuse signifikant erhöht, im sensomotorischen Cortex war allerdings auch

---

eine Tendenz erkennbar ( $1,09 \pm 0,25$  in Wildtyp-Mäusen gegenüber  $1,21 \pm 0,4$  in heterozygot L1 defizienten Mäusen).

Zusammengefaßt stellte sich eine erhöhte metabolische Aktivität, vor allem in Form einer erhöhten Proteinbiosynthese, im Cortex heterozygot L1 defizienter Tiere dar.

**Tab. 4.1: Physiologische Parameter**

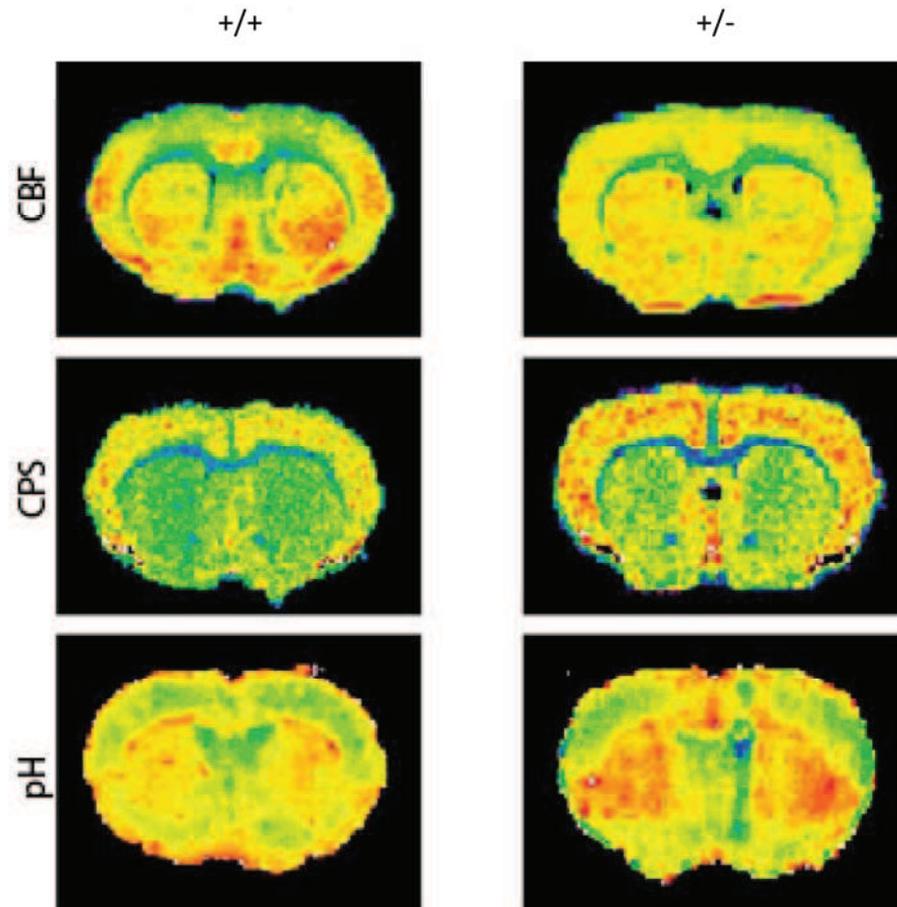
Parameter	+/+	+/-
Körpergewicht (g)	$22,6 \pm 0,9$	$23,4 \pm 1,7$
MABP (mmHg)	$91,8 \pm 5,4$	$92,0 \pm 2,3$
Arterieller pH (Einheiten)	$7,34 \pm 0,1$	$7,35 \pm 0,1$
Arterieller pCO <sub>2</sub> (mmHg)	$46,5 \pm 6,1$	$39,5 \pm 2,7$
Arterieller pO <sub>2</sub> (mmHg)	$141 \pm 66$	$153 \pm 33$

Aufgeführt sind die Werte für das Körpergewicht, den mittleren arterieller Blutdruck (MABP), den arteriellen pH-Wert sowie die Partialdrücke von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> im arteriellen Blut. Bezüglich dieser physiologischen Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen heterozygot L1 defizienten Mäusen und korrespondierenden Wildtyp-Tieren detektiert werden. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

**Tab. 4.2: Blutfluß (CBF), Proteinsynthese (CPS) und pH-Wert des cerebralen Gewebes**

Parameter	+/+	+/-	Signifikanz
Cerebraler Blutfluß (ml/g/min)	$1,26 \pm 0,1$	$1,23 \pm 0,3$	
Cerebrale Proteinsynthese (fraktionelle Resorptionsrate)	$0,14 \pm 0,1$	$0,22 \pm 0,1$	*
pH-Wert des cerebralen Gewebes (Einheiten)	$7,10 \pm 0,1$	$6,87 \pm 0,1$	**

Die Wert aller seriellen Hirnschnitte eines Tieres wurden gemittelt und gingen dann in die statistische Analyse des gesamten cerebralen Blutflusses (CBF, *global cerebral blood flow*), der gesamten Proteinsynthese im Großhirn (CPS, *global cerebral protein synthesis*) und des pH-Werts im Gehirn ein. Heterozygot L1 defiziente Mäuse zeichnen sich durch eine signifikant gesteigerte Proteinsynthese sowie einen deutlich reduzierten pH-Wert gegenüber Wildtyp-Tieren aus. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).



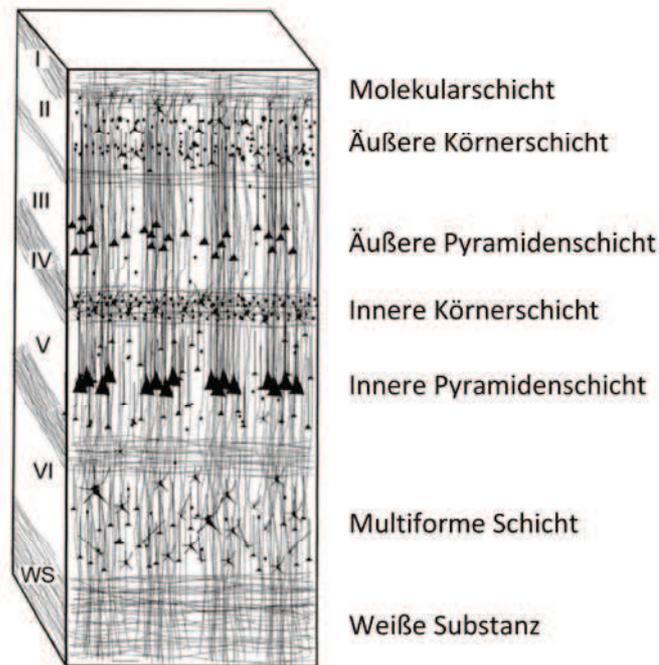
**Abb. 4.9: Autoradiographische Analyse hämodynamischer und metabolischer Parameter.** Abgebildet sind repräsentative qualitative Bilder der radioaktiven Messungen des cerebralen Blutflusses (CBF), der cerebralen Proteinsynthese (CPS) sowie des pH-Wertes in koronaren Hirnschnitten adulter Wildtyp- (+/+) und heterozygot L1 defizienter Tiere (+/-). Hohe Meßwerte bzw. eine Acidose sind graphisch durch gelb-rote Farbgebung dargestellt, niedrige Meßwerte bzw. eine Alkalose dementsprechend durch grün-blaue Färbung. Quantifizierungen der Parameter können den Tab. 4.1 und 4.2 entnommen werden.

#### 4.2.2 Histomorphologische Analyse

Aufgrund der funktionellen Befunde, die vor allem Veränderungen im Cortex der heterozygot L1 defizienten Mäuse gegenüber Wildtyp-Mäusen aufzeigten, wurden detailliertere histomorphologische Untersuchungen dieser Gehirnregion durchgeführt.

Die Großhirnrinde (Cortex cerebri) gliedert sich in sechs übereinander angeordnete Schichten, die sogenannten Laminae (**Abb. 4.10**). Diese unterscheiden sich in ihrer zellulären Zusammensetzung und im Verlauf der dominierenden Bahnen. Allgemein finden sich im

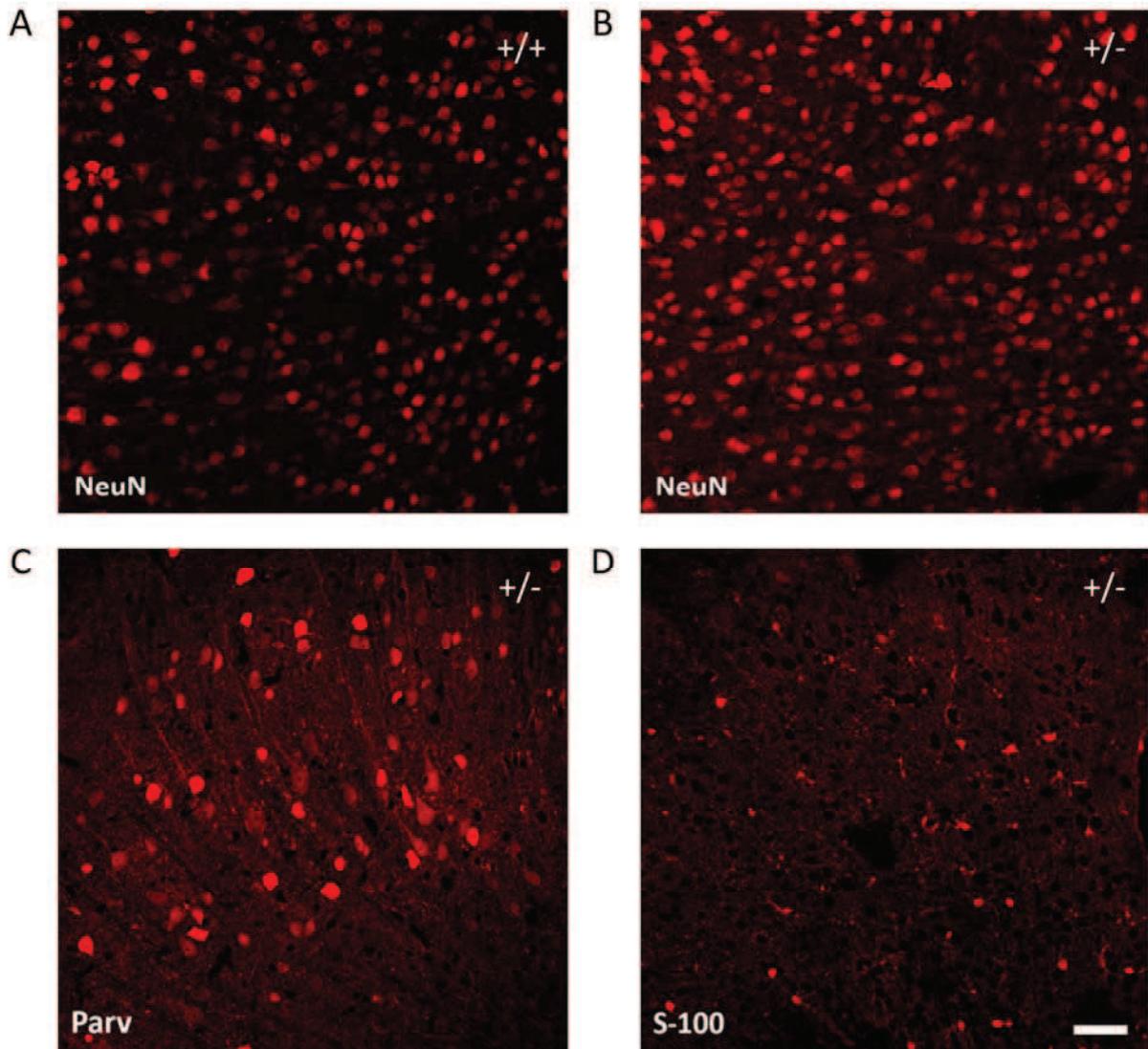
Cortex Pyramidenzellen (ca. 80% aller Neurone), Körnerzellen/bedornete Sternzellen und Interneurone. Zusätzlich zu den Nervenzellen ist auch eine Vielzahl an Gliazellen vorhanden.



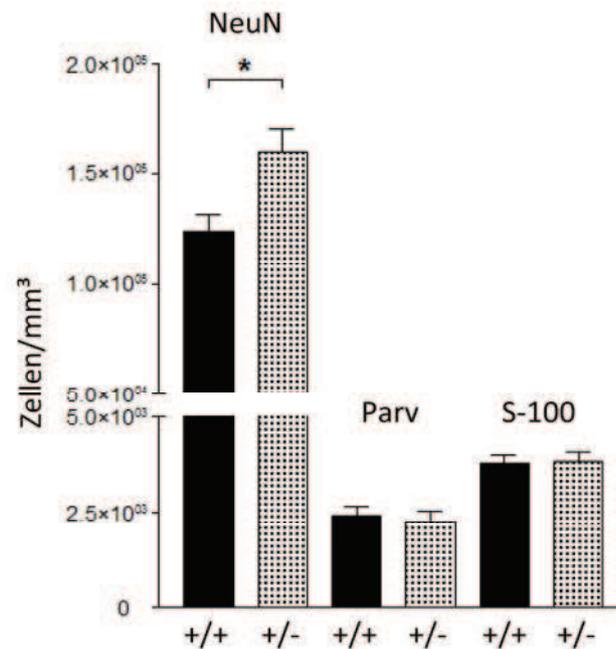
**Abb. 4.10:** Schematische Darstellung der Schichtung des Cortex

(nach Bentivoglio *et al.*, 2003)

Zur histomorphologischen Charakterisierung heterozygot L1 defizienter Mäuse wurden zunächst immunhistochemische Färbungen an koronaren Schnitten von adulten Tieren durchgeführt. Aufgrund der vermehrten Proteinsynthese im Cortex wurde dort zunächst die Anzahl aller Neuronen (identifiziert durch immunhistochemische Anfärbung mit Antikörpern gegen NeuN), der Interneuronen (immunhistochemische Anfärbung mit Antikörpern gegen Parvalbumin) und der Gliazellen (immunhistochemische Anfärbung mit Antikörpern gegen S-100) ermittelt (**Abb. 4.11**). Auffälligerweise war die neuronale Dichte (NeuN-positive Zellen/ $\mu\text{m}^3$ ) im sensomotorischen Cortex von heterozygot L1 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht. In Bezug auf GABAerge Interneurone und Astrozyten bestand kein Unterschied zwischen Wildtyp- und mutanten Tieren (**Abb. 4.12**).

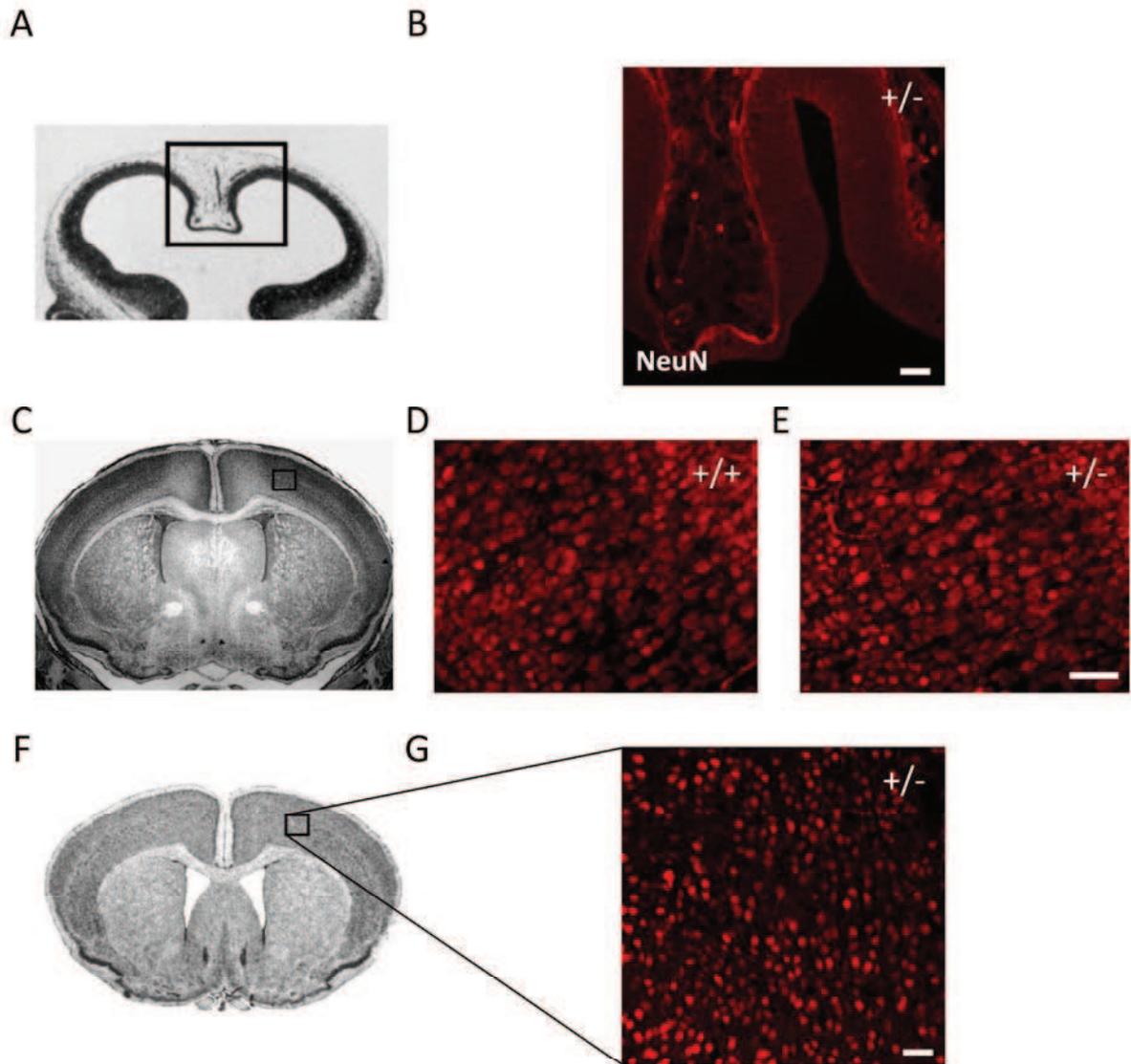


**Abb. 4.11: Immunohistochemische Färbungen.** Zur Quantifizierung reifer Neurone (NeuN), der Subpopulation der Interneurone (Parv; überwiegend GABAerge Interneurone, die bis zu 30% aller kortikalen Nervenzellen ausmachen, die übrigen Neurone sind hauptsächlich glutamaterge Pyramidenzellen) sowie der Gliazellen (S-100) im sensomotorischen Cortex adulter Mäuse wurden Immunfärbungen an koronaren Schnitten (50 $\mu$ m) durchgeführt. Mit dem jeweiligen Antikörper markierte Zellen erscheinen rot. Abgebildet sind LSM-Aufnahmen (Größenstandard 50 $\mu$ m). **Abb. A** zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus dem Cortex einer Wildtyp-Maus, **Abb. B** einen vergleichbaren Ausschnitt einer heterozygot L1 defizienten Maus. Die um fast 30% erhöhte Anzahl an Neuronen in +/- Tieren ist deutlich erkennbar. Für die Färbung der Interneurone (**Abb. C**) sowie der Gliazellen (**Abb. D**) sind nur Bilder von heterozygoten Mäusen dargestellt, da sich die beiden Genotypen in diesen Parametern nicht unterscheiden.

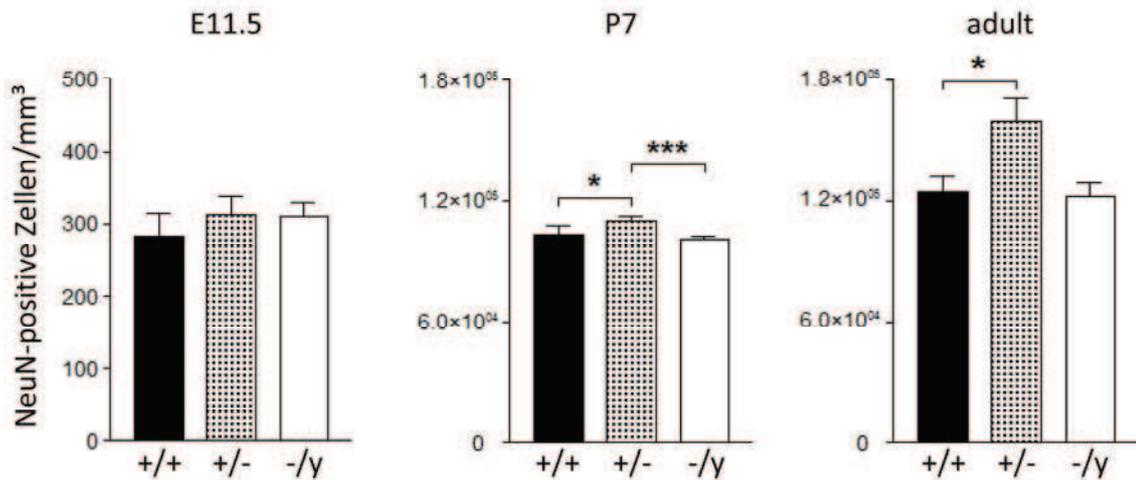


**Abb. 4.12:** Das Balkendiagramm zeigt die **Quantifizierung der Immunfärbungen** aus **Abb. 4.9**. Dargestellt ist die mittlere Dichte (Marker-positive Zellen/ $\mu\text{m}^3$ ) mit Standardabweichung aller postmitotischen Neurone (NeuN), der Parvalbumin-positiven Interneurone (Parv) und der Gliazellen (S-100) im Cortex adulter Wildtyp-(+/+) und heterozygot L1 defizienter Mäuse (+/-) ( $n = 5$ ). Der Unterschied in Bezug auf die neuronale Dichte ist signifikant (Mann-Whitney-U-Test, \*  $p < 0.05$ ), die Anzahl an Interneuronen und Gliazellen pro Fläche ist in beiden Genotypen vergleichbar.

Um den Zeitpunkt des Auftretens dieses Phänomens zu bestimmen, d.h. um herauszufinden, ob sich die erhöhte neuronale Dichte im Cortex heterozygot L1 defizienter Tiere erst im Erwachsenenalter manifestiert oder bereits während der Embryonalentwicklung angelegt wird, wurden Mäuse im adulten Stadium, an dem früh postnatalen Zeitpunkt P7 sowie am Tag 11.5 der Embryonalentwicklung (E11.5), zu Beginn der Neurogenese im Embryo, immunhistochemisch untersucht (**Abb. 4.13**). Zusätzlich zu Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Tieren wurden L1 Knockout-Mäuse analysiert. Sowohl zum Zeitpunkt P7 als auch im adulten Tier wiesen heterozygot L1 defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp- und L1 defizienten Mäusen eine erhöhte neuronale Dichte auf, wobei schon während der Embryonalentwicklung (E11.5) die Tendenz zu einer erhöhten Dichte an Neuronen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen erkennbar war. L1 Knockout-Mäuse zeigten zu allen drei Zeitpunkten vergleichbare Befunde wie Wildtyp-Mäuse, während sich heterozygote Mäuse signifikant von den beiden Genotypen unterschieden und damit eine Sonderstellung einnehmen (**Abb. 4.14**).



**Abb. 4.13: Immunohistochemische Färbung von Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung.** **Abb. A** (aus Kaufman<sup>105</sup>) zeigt einen koronaren Schnitt durch den Kopf eines Mausembryos am Tag E11.5. Der mit dem schwarzen Rechteck umrissene Bereich kennzeichnet die anatomische Lage des NeuN-gefärbten Ausschnitts in **Abb. B** (+/- Tier). Entsprechend veranschaulicht **Abb. C** (aus Paxinos<sup>106</sup>) einen koronaren Schnitt durch das Gehirn eines sieben Tage alten Jungtieres (P7). Rechts daneben sind repräsentative Aufnahmen der NeuN-Färbung einer Wildtyp- (**Abb. D**) und einer heterozygoten Maus (**Abb. E**) abgebildet. Der Schnitt durch ein adultes Gehirn ist in **Abb. F** dargestellt (aus Sidman<sup>107</sup>), daneben (**Abb. G**) die Färbung reifer Neurone (+/- Tier). Bei allen Aufnahmen handelt es sich um konfokale Aufnahmen (Größenstandard 50µm).

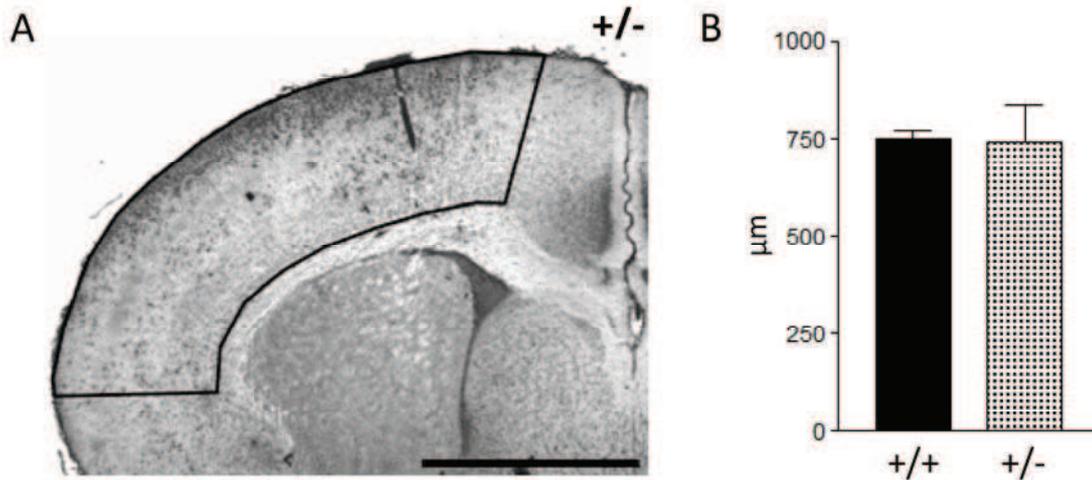


**Abb. 4. 14: Neuronale Dichte im sensomotorischen Cortex im zeitlichen Verlauf.** Die drei Balkendiagramme veranschaulichen die Entwicklung der erhöhten Dichte an Neuronen im Cortex heterozygot L1 defizienter Mäuse (+/-) im Vergleich mit Wildtyp- (+/+) und L1 Knockout-Mäusen (-/-). Im embryonalen Entwicklungsstadium E11.5 (**Abb. A**) war noch kein signifikanter Unterschied zwischen heterozygoten Tieren und Wildtyp- bzw. Knockout-Tieren erkennbar. Bereits zum früh postnatalen Zeitpunkt P7 (**Abb. B**) zeigte sich jedoch ausschließlich in heterozygoten Mäusen eine erhöhte neuronale Dichte. Dieser Befund bestätigte sich auch im Erwachsenenalter (**Abb. C**). Angegeben ist jeweils die Dichte der NeuN-positiven Zellen (NeuN+) mit der entsprechenden Standardabweichung (Mann-Whitney-U-Test, \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001, jeweils n = 5).

Eine erhöhte Zelldichte könnte aus dem verringerten Gesamtvolumen des Cortex oder aus dem Anstieg der absoluten Zellzahl innerhalb desselben Volumens resultieren. Um dies zu überprüfen, wurde zu dem Zeitpunkt, an dem zuerst das Auftreten eines signifikanten Unterschieds der neuronalen Dichte in heterozygot L1 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden konnte (P7), die kortikale Dicke der beiden Genotypen bestimmt. Da die Dicke innerhalb eines kortikalen Segments (Kontur in **Abb. 4.15 A**) variiert, wurde die mittlere Dicke wie folgt berechnet<sup>108</sup>:

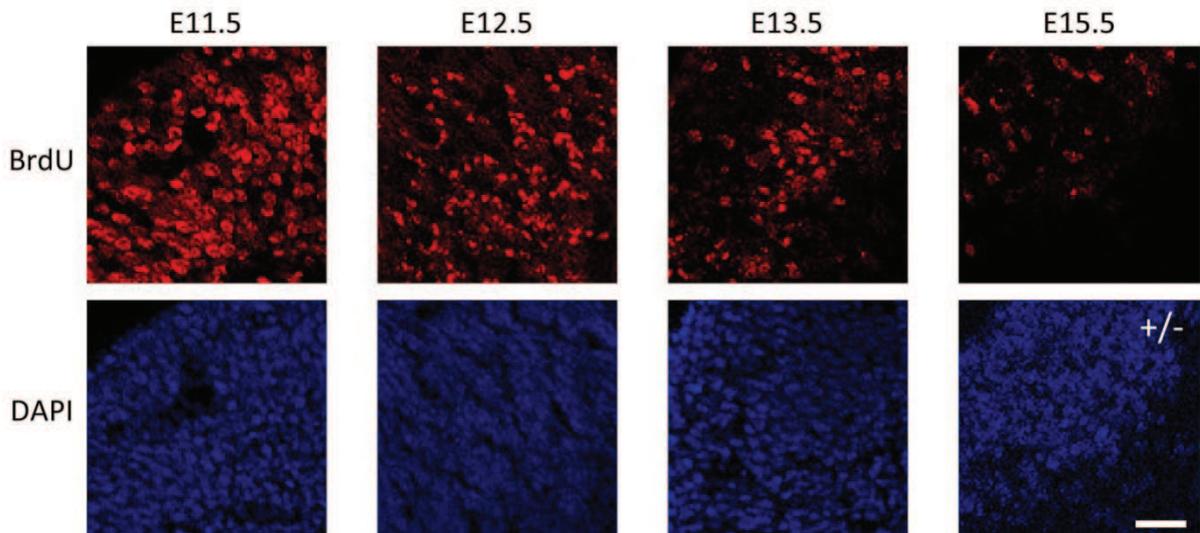
$$\text{kortikale Dicke} = \frac{\text{Fläche des kortikalen Segments}}{\text{Länge der Oberflächenkante}}$$

Diese Struktur unterscheidet sich nicht zwischen heterozygoten und Wildtyp-Tieren (**Abb. 4.15 B**). Die bereits zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöhte neuronale Dichte spiegelt also tatsächlich eine erhöhte Zahl an Neuronen wider, nicht etwa eine gleichbleibende Anzahl an Zellen innerhalb einer kleineren Fläche.

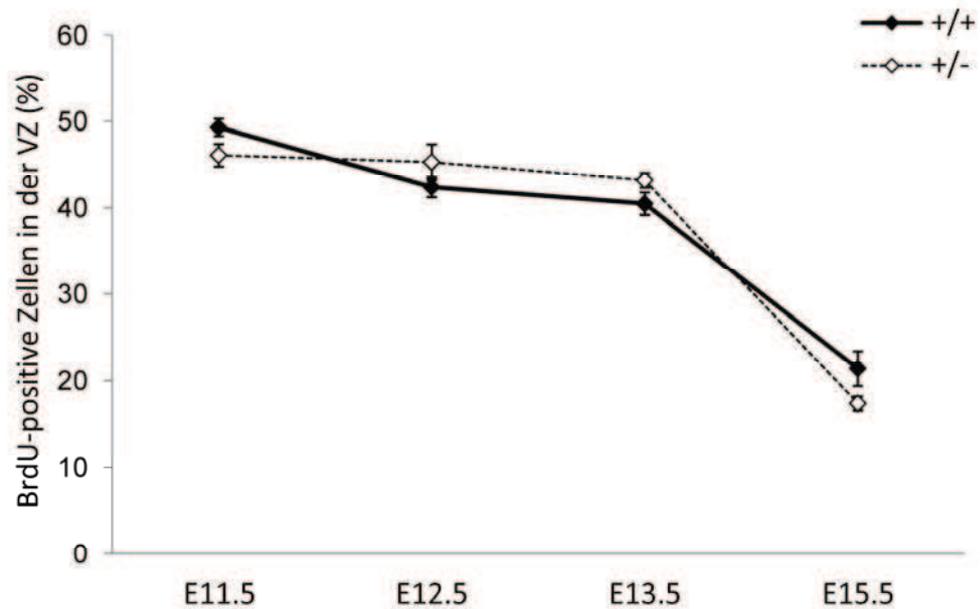


**Abb. 4.15: Kortikale Dicke.** Aus dem Quotienten der Fläche des kortikalen Segments (schwarz umrissener Bereich in **Abb. A**) und der Länge dessen Oberflächenkante wurde die mittlere Dicke der Hirnrinde für jedes Tier berechnet (Größenstandard 1mm). In **Abb. B** sind die so ermittelten Mittelwerte mit Standardabweichung für Wildtyp- und heterozygot L1 defiziente Mäuse ( $n = 5$ ) graphisch dargestellt. Die beiden Genotypen unterschieden sich hinsichtlich der kortikalen Dicke nicht.

Diese Befunde deuteten darauf hin, daß die Ursache der erhöhten neuronalen Dichte in der Embryogenese oder frühen postnatalen Entwicklung der heterozygot L1 defizienten Mäuse zu suchen war. Es ist bekannt, daß die überwiegende Zahl der Neurone während der Embryonalentwicklung im Zeitraum zwischen E10 und E17 gebildet wird, so daß zunächst die Proliferation als Grundlage der Neurogenese in diesem Zeitraum untersucht wurde. Zu diesem Zweck wurde schwangeren Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten BrdU (Bromodeoxyuridin), ein Thymidinanalogon, das in proliferierenden Zellen in die neu synthetisierte DNA inkorporiert wird und somit sich teilende Zellen markiert, injiziert. Zwei Stunden später wurden die Mäuse getötet und die Embryonen entnommen. **Abb. 4.16** und **Abb. 4.17** veranschaulichen den zeitlichen Verlauf proliferierender Zellen. Wie zu erwarten sind zum Zeitpunkt E11.5 sehr viele Zellen teilungsaktiv; die Proliferation nimmt zur Geburt (E19) hin ab. Am Tag P7 konnten mit einer Färbung gegen das Ki-67-Antigen (ein etabliertes Markerprotein für proliferierende Zellen) im Cortex keine proliferierenden Zellen mehr nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Wildtyp- und heterozygot L1 defiziente Mäuse unterschieden sich hinsichtlich der Proliferation nicht von einander; damit konnte die Proliferation als Ursache der erhöhten neuronalen Dichte ausgeschlossen werden.

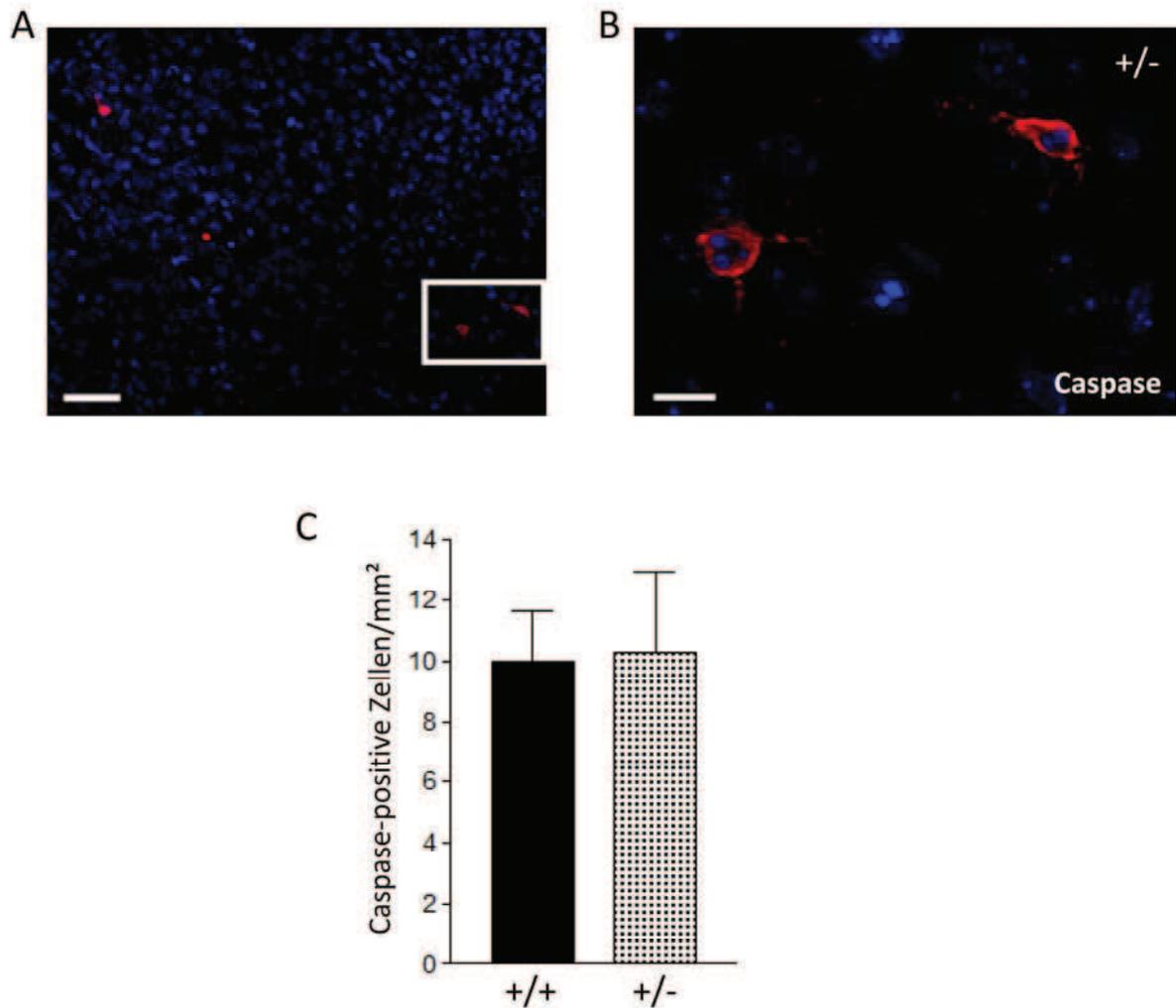


**Abb. 4.16: Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis proliferierender Zellen.** Bromdesoxyuridin (BrdU) wird während der DNA Replikation vor einer Zellteilung an Stelle von Thymidin in den neu synthetisierten Tochterstrang eingebaut. Mit einem spezifischen Antikörper gegen BrdU lassen sich so markierte, teilungsaktive Zellen nachweisen. Schwangeren Mäusen wurde BrdU zwei Stunden vor ihrem Tod injiziert. In Schnitten der entnommenen Embryonen konnten BrdU-positive Zellen immunhistochemisch detektiert werden. Abgebildet sind Schnitte verschiedener embryonaler Entwicklungsstadien zur Zeit der Neurogenese: E11.5, E12.5, E13.5 sowie E15.5. In der oberen Reihe ist jeweils die Färbung mit Antikörpern gegen BrdU dargestellt (rot), darunter derselbe Bereich in einer Kernfärbung (DAPI, blau). Da die Anzahl proliferierender Zellen in heterozygot L1 defizienten Mäusen der in Wildtyp-Mäusen gleicht, sind nur heterozygote Tiere gezeigt. Alle Abbildungen wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen (Größenstandard 50µm).



**Abb. 4.17: Quantifizierung proliferierender Zellen in der embryonalen Ventrikulärzone.** In der Grafik ist der Mittelwert (mit Standardabweichung) des prozentualen Anteils BrdU-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in der Ventrikulärzone zu vier Zeitpunkten während der Neurogenese in der Maus aufgetragen (n = 5). Zwischen den embryonalen Entwicklungstagen E11.5 und E13.5 waren sehr viele teilungsaktive Zellen zu beobachten, danach nahm die Proliferation stark ab. Sieben Tage nach der Geburt konnten mit einer Färbung gegen das Proliferations-assoziierte Ki-67-Antigen im Cortex keine proliferierenden Zellen mehr nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Sowohl die Gesamtzellzahl in der Ventrikulärzone als auch der Anteil BrdU-positiver Zellen unterschieden sich nicht zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen.

Neben einer gesteigerten Proliferation kann auch eine verringerte Apoptose zu einer erhöhten Zellzahl führen. Während der Neurogenese gehen 50% der neugebildeten Zellen durch kontrollierten Zelltod unter. Der Höhepunkt der Apoptose postmitotischer Neurone im Neocortex der Maus tritt um den Tag P7 auf (P0-P10 apoptotische Periode<sup>109</sup>). Mittels Caspase-3-Färbung wurden die apoptotischen Zellen in den Cortices von Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen quantifiziert (**Abb. 4.18**). Die Anzahl Caspase-positiver Zellen in heterozygot L1 defizienten Mäusen glich derjenigen in Wildtyp-Tieren, so daß die Ursache der erhöhten neuronalen Dichte nicht durch eine verringerte Apoptoserate bedingt war.



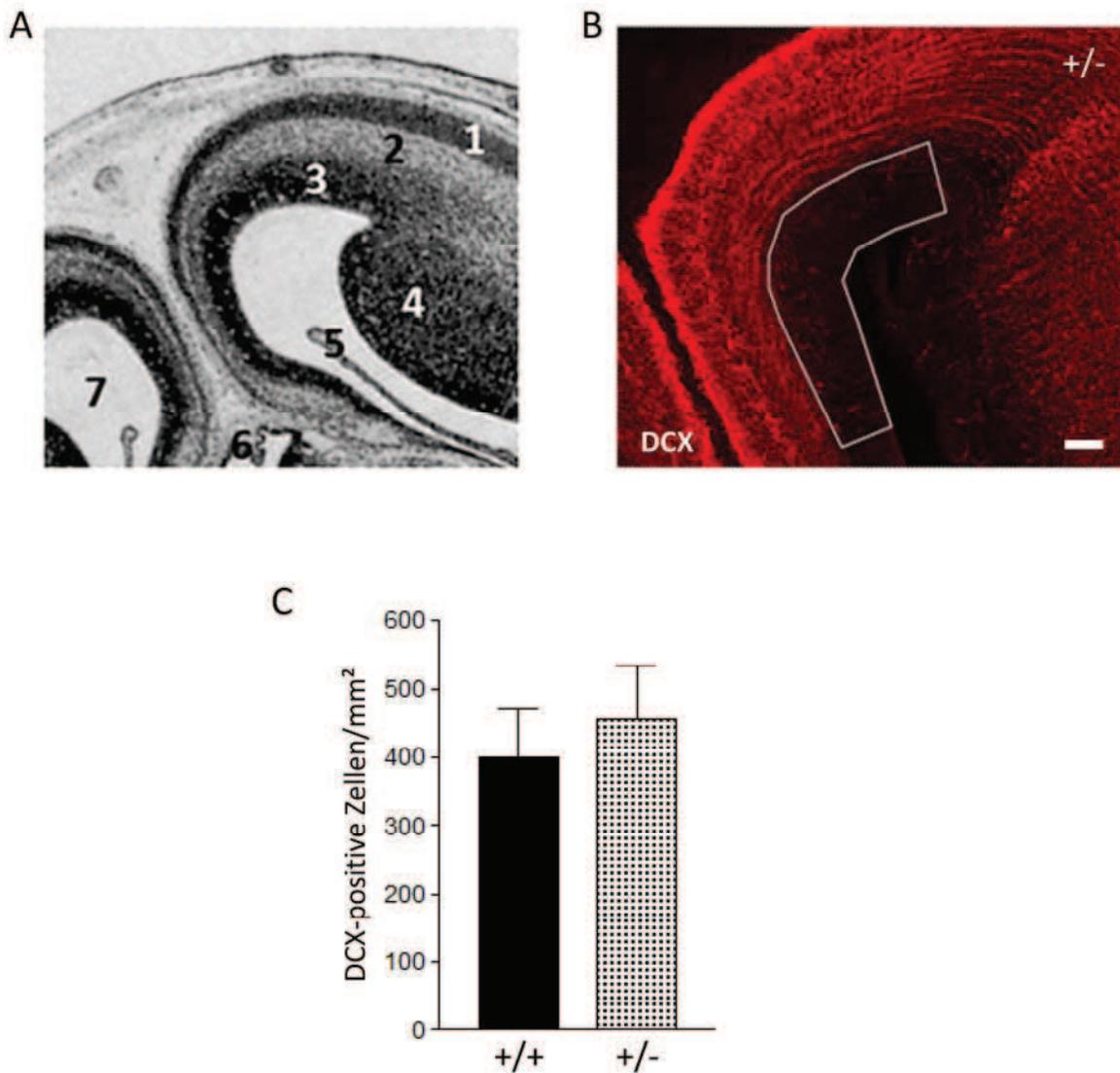
**Abb. 4.18: Immunohistochemische Färbung zur Quantifizierung apoptotischer Zellen.** Zum Höhepunkt der Apoptose im Neocortex der Maus (P7) wurden histologische Schnitte mit Antikörpern gegen Caspase3 (rot) sowie dem Kernfarbstoff DAPI (blau) angefärbt. **Abb. A** zeigt eine Aufnahme des Cortex einer heterozygot L1 defizienten Maus (Maßstab 50µm). **Abb. B** stellt die Vergrößerung des weiß umrandeten Bildausschnitts in **Abb. A** dar (Maßstab 10µm). Caspase, eine Protease, wird im Zytosol detektiert. Zu erkennen sind kleine Vesikel im Inneren der apoptotischen Zelle, die Kernfragmente beinhalten (Chromatinkondensation, nukleäre Fragmentierung). Das **Abb. C** veranschaulicht die Anzahl apoptotischer Zellen pro Fläche im Cortex mit Standardabweichung. Heterozygot L1 defiziente Tiere (+/-) unterscheiden sich nicht von Wildtyp-Tieren (+/+) (n = 5).

Desweiteren wurde untersucht, ob heterozygot L1 defiziente Mäuse sich in der neuronalen Differenzierung von Wildtyp-Mäusen unterscheiden. Die Anzahl neugebildeter, migrierender Neurone läßt sich mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen Doublecortin (DCX) bestimmen. Doublecortin ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, das fast ausschließlich von jungen, bereits postmitotischen Neuronen im sich entwickelnden Nervensystem von Säugetieren exprimiert wird. DCX kann in der Maus ab dem embryonalen

Tag E10/11 nachgewiesen werden. In einer Zelle hält die Expression für ca. zwei Wochen an und nimmt mit dem Auftreten der Marker reifer Neurone (z.B. NeuN,  $\beta$ -Tubulin) ab. Zum Zeitpunkt P0 ist die Expression bereits deutlich reduziert, zwei Wochen nach der Geburt ist DCX auf die auch im Adulten aktiven Neurogenesezonen (Subgranulärzone des Hippocampus und Subventrikulärzone der Wand der lateralen Seitenventrikel) beschränkt und im Cortex der Maus nicht mehr nachweisbar<sup>110</sup>.

Zwischen E14 und E17 ist die Anzahl DCX-positiver Zellen im Neocortex sehr hoch. Um eine stereologische Quantifizierung vornehmen zu können, wurden nur die Zellen in der Ventrikulärzone des Neocortex am Tag E15.5 gezählt (**Abb. 4.19 A und B**). Die Tendenz einer erhöhten neuronalen Differenzierung in heterozygot L1 defizienten Tieren (n=5) war erkennbar, jedoch nicht signifikant. Auch im zeitlichen Verlauf von E15.5 bis P7 konnte keine deutliche Veränderung in der Zahl DCX-positiver Zellen und damit der Dauer der Neurogenese in den beiden Genotypen beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

---



**Abb. 4.19: Immunhistochemische Färbung zur Quantifizierung der neuronalen Differenzierung.** Die schematische Übersicht **Abb. A** zeigt einen koronaren Schnitt durch den Kopf eines Mausembryos im Entwicklungsstadium E15.5 (aus Kaufman<sup>105</sup>). Folgende Strukturen sind dargestellt: 1 Neocortex (Marginalzone und kortikale Platte), 2 Intermediärzone, 3 Ventrikulärzone (VZ), 4 Striatum, 5 Plexus choroideus, 6 Dritter Ventrikel, 7 Seitenventrikel. **Abb. B** veranschaulicht die Immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Doublecortin (DCX) im sich entwickelnden Gehirn eines heterozygot L1 defizienten Embryos (E15.5, rot). DCX ist ein Marker für die Neurogenese. In der Ventrikulärzone (weiß umrandeter Bereich) wurde die Anzahl DCX-positiver Zellen pro Fläche bestimmt (Größenstandard 100µm). Das Balkendiagramm **Abb. C** gibt die Mittelwerte (und Standardabweichungen) der DCX-positiven Zellen (junge Neurone) in der Ventrikulärzone pro Fläche wieder (n = 5). Heterozygote Mäuse zeigen eine geringfügige Tendenz zu einer gesteigerten neuronalen Differenzierung, der Unterschied zu Wildtyp-Tieren ist jedoch nicht signifikant.

### 4.2.3 Differentielle Genexpression

*Microarrays* dienen der Transkriptionsanalyse von Genen in großem Maßstab, so daß Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen zwei Genotypen nachgewiesen werden können.

Zur Charakterisierung des veränderten Expressionsprofils im Gehirn der heterozygot L1 defizienten Mäuse wurden kommerziell erhältliche Chips der Firma Agilent mit der Bezeichnung „Whole Mouse Genome Oligo Microarray 4x44K“ eingesetzt. Diese können Transkripte von über 41000 Genen der Maus detektieren. Es wurden je vier weibliche Wildtyp- und heterozygot L1 defiziente Mäuse zum Zeitpunkt P0 untersucht. Durch Kombination der Probensets ergaben sich 16 Vergleiche zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen.

Die aufwendige statistische Auswertung wurde in Kooperation mit Prof. Ron Hart (W.M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, Rutgers, USA) durchgeführt. Die Analyse ergab 92 differentiell exprimierte Gene. Nach Quantil-Normalisierung, Benjamini-Hochberg Korrektur für Mehrfachtests zum Ausschluß falschpositiver Resultate und Student's t-Test verblieben jedoch lediglich drei potentiell zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen dysregulierte Gene: Wachstumshormon,  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoproteinhormone und Proopiomelanocortin (**Tab. 4.3**). Interessanterweise wird jedes dieser drei Gene, die in heterozygot L1 defizienten Mäusen eine deutlich erhöhte Expression zeigen, in der Hypophyse exprimiert. Das Wachstumshormon sowie das Proopiomelanocortin wurden bereits in früheren Microarray-Experimenten unserer Gruppe als dysreguliert im Gehirn von L1 Knockout-Mäusen (E19 und adult) identifiziert (Gerrit Wolters, Dr. Ingo Meier). Dort zeigten beide Gene ebenfalls eine deutlich erhöhte Expression.

---

Tab. 4.3: Per Microarray-Analyse zum Entwicklungsstadium P0 identifizierte Gene

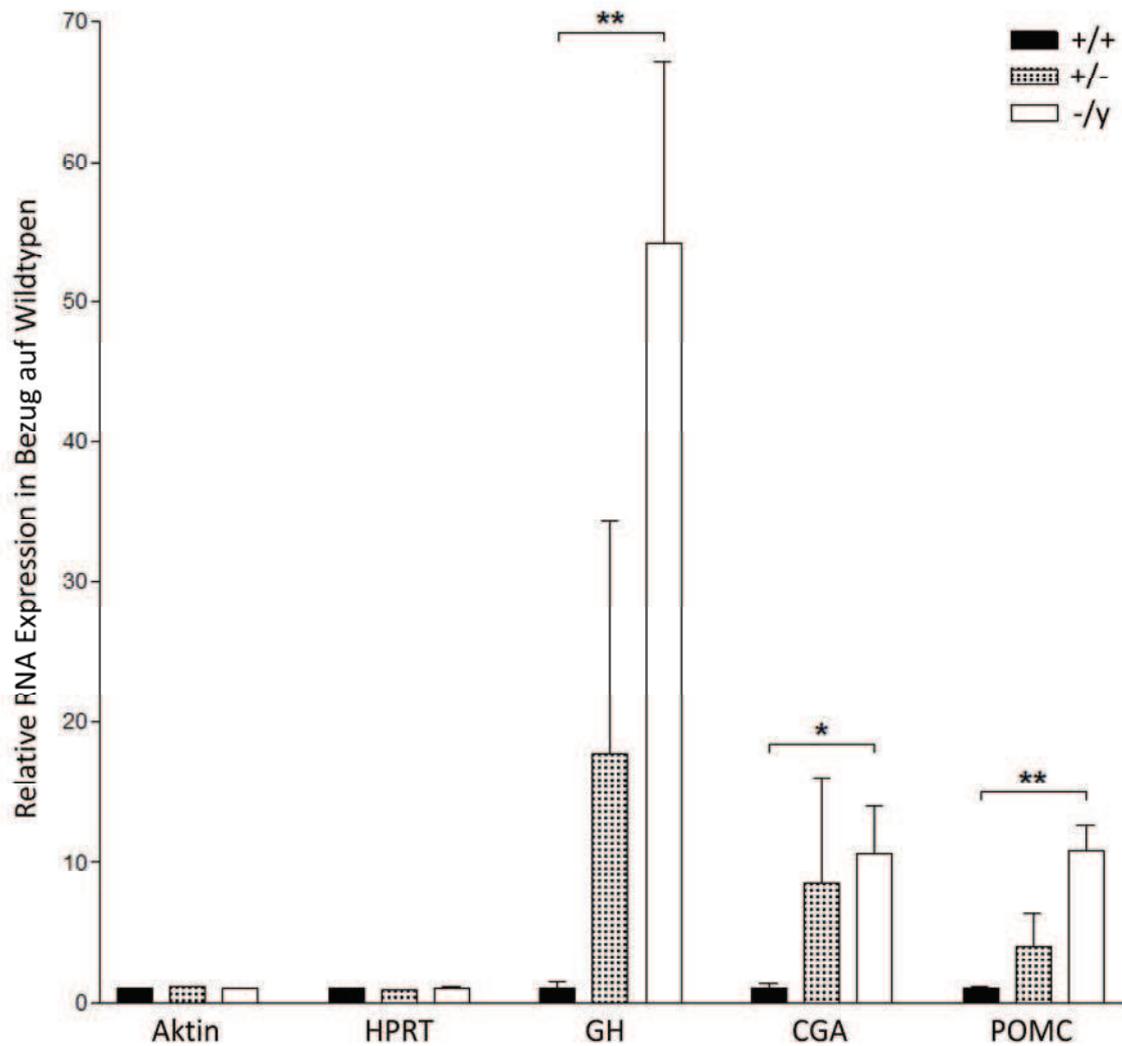
p-Wert	Dysregulation	Gen
0,0004	ca. 81-fach	Wachstumshormon (GH)
0,0061	ca. 24-fach	$\alpha$ -Untereinheit der Glykoproteinhormone Choriogonadotropin, Lutropin , Follitropin und Thyrotropin (CGA)
0,0032	ca. 9-fach	Proopiomelanocortin (Hormonvorläuferprotein, POMC)

Zur Verifizierung der Microarray-Analyse wurde eine quantitative *Realtime*-PCR (qPCR) mit biologischen Replikaten durchgeführt. Es wurde RNA aus Gesamthirnhomogenat von jeweils vier Tieren (P0) verwendet. Knockout-Mäuse wurden, gleichsam als interne Kontrolle, eingeschlossen. Für dieses Experiment wurde dieselbe RNA eingesetzt wie für die Northern Blot Hybridisierungen (siehe 4.1.1). Aktin und HPRT dienten als Haushaltsgene zur Normalisierung.

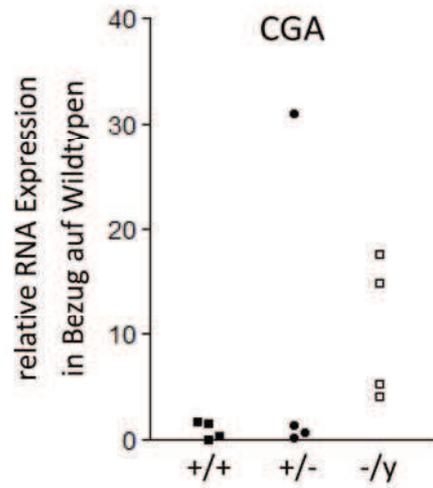
Eine Verunreinigung der Proben durch genomische DNA konnte ausgeschlossen werden.

Die Auswertung zeigt eine deutliche Hochregulation (um das ca. 54- bzw. elffache) der drei untersuchten Gene in L1 Knockout-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Tieren. (**Abb. 4.20**). Die erhöhte Expression der  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoproteinhormone (CGA) in L1 Knockout-Mäusen war bisher noch nicht bekannt, die beiden anderen Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Resultaten unserer Arbeitsgruppe.

Die heterozygot L1 defizienten Mäuse unterscheiden sich, aufgrund der hohen Standardabweichung, weder von den Wildtyp- noch den Knockout-Mäusen. Bei genauerer Betrachtung fällt nicht nur auf, daß die Streuung bei den heterozygoten Mutanten besonders hoch ist, sondern daß immer dasselbe Tier „ausreißt“. **Abb. 4.21** zeigt dies beispielhaft für die  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoproteinhormone. Die Aktin- bzw. HPRT-Werte für diese Maus stimmen jedoch mit den übrigen überein.



**Abb. 4.20: Quantitative *Realtime*-PCR (qPCR).** Untersucht wurde mRNA aus Gesamthirnhomogenat von jeweils vier Wildtyp- (+/+), heterozygot L1 defizienten (+/-) und L1 Knockout-Mäusen (-/-) zum Zeitpunkt P0. Aktin und HPRT dienten als Haushaltsgene. Das Balkendiagramm veranschaulicht die mittels quantitativer *Realtime*-PCR ermittelte Dysregulation (mit Standardabweichung) der für Hypophysenhormone kodierenden Gene, die bei der Microarray Analyse aufgefallen waren. Die Expression der mRNA für das Wachstumshormon (GH), die  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoproteinhormone (CGA) sowie für Proopiomelanocortin (POMC) ist in L1 Knockout-Mäusen signifikant erhöht gegenüber Wildtyp-Mäusen (Mann-Whitney-U-Test; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). Die Werte für heterozygot L1 defiziente Tiere liegen zwischen denen der beiden anderen Genotypen. Aufgrund der hohen Standardabweichung unterscheiden sie sich weder von Wildtyp- noch von L1 Knockout-Mäusen signifikant.



**Abb. 4.21: Relative Expression der mRNA für die  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoprotein hormone (CGA).** Das Streudiagramm veranschaulicht den „Ausreißer“ in der Gruppe der heterozygot L1 defizienten Tiere. Unklar ist, ob diese Maus eine Ausnahme darstellt oder ob bei einer größeren Anzahl an Tieren mehrere Mäuse innerhalb der Gruppe der +/- -Tiere solch abweichende Ergebnisse zeigen würden.

## DISKUSSION

## 5. Diskussion

Das L1-Syndrom ist eine seltene X-chromosomal gekoppelte Erkrankung mit einem breiten Spektrum schwerwiegender neurologischer Störungen. Hauptcharakteristika sind eine Hypoplasie des Corpus callosum, geistige Retardierung, angewinkelte Daumen, eine spastische Lähmung der Beine sowie ein Hydrozephalus. Es existieren zwei unabhängig voneinander hergestellte Knockout-Mauslinien<sup>82, 83</sup>, die als etablierte Modelle für das L1-Syndrom gelten. 2001 generierte Dr. Kutsche in unserem Labor eine dritte Mausmutante. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser bislang kaum beschriebene mutante Mausstamm (L1ki129) charakterisiert. Bei meinen Untersuchungen fiel darüber hinaus auf, daß heterozygote Tiere dieser Linie einen Phänotyp zeigen, der sich interessanterweise sowohl von Wildtyp- als auch von homozygot L1 defizienten Mäusen unterscheidet. Nur heterozygote Tiere zeichnen sich durch eine signifikant erhöhte Dichte an Neuronen im Cortex aus. Das Phänomen ist sowohl in jungen (P7) als auch in adulten Mäusen erkennbar. Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Wichtigkeit, bei der Analyse transgener Mauslinien die Untersuchung der heterozygoten Tiere nicht zu vernachlässigen.

### 5.1 Die RNA-Expression ist in mutanten Tieren nicht aufgehoben, in homozygot L1 defizienten Mäusen jedoch reduziert.

Die in unserem Labor generierte Mausmutante zeichnet sich durch die Insertion einer tTA-Neomycin-Kassette direkt an den Translationsstart des *L1* Gens aus, da diese Maus ursprünglich mit dem Tet-System versehen werden sollte, um in L1 defizienten Mäusen die L1 Expression induzierbar zu regulieren. Das eingefügte, ca. 2,6kb große DNA-Fragment ersetzt den codierenden Teil des Exons 2 sowie 50bp des Introns 2. Die regulatorischen Elemente des Introns sowie die Intron-Exon-Struktur bleiben erhalten (M. Kutsche, unveröffentlichte Daten).

Der Tetracyclin-abhängige Transaktivator tTA ist eines der beiden Gene, die zusammen das Tet-System bilden. Das Tet-System wird zur induzierbaren Regulation der Genexpression in

---

Eukaryonten eingesetzt und findet aufgrund seiner verlässlichen Eigenschaften weit verbreitete Verwendung<sup>111, 112</sup>. Dieses Tetracyclin-abhängige Regulationssystem ist enterobakteriellen Ursprungs, so daß der tTA nicht an regulatorische Sequenzen endogener Gene des Zielorganismus bindet. Durch tTA bedingte unspezifische Auswirkungen sind somit sehr unwahrscheinlich<sup>113, 114</sup>.

Northern Blot Analysen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten transgenen Mäuse zeigten, daß durch die Insertion der für den tTA kodierenden cDNA in frame die Transkription des mutierten Allels nicht beeinflußt wird. In heterozygot L1 defizienten Tieren war ebenso viel RNA nachweisbar wie in Wildtyp-Tieren, in L1 Knockout-Tieren (homozygot L1 defizient) wurde etwa 25% weniger L1 RNA detektiert als in Wildtyp-Tieren. Die Ursache für die verminderte Menge an RNA in den L1 defizienten Mäusen könnte in einer Destabilisierung der RNA durch im Rahmen der Insertion zerstörte regulatorische oder RNA-stabilisierende Elemente liegen. Aufgrund der geringen Reduktion der RNA-Konzentration in den homozygot L1 defizienten Mäusen wäre eine solche Wirkung der Mutation in den heterozygot L1 defizienten Mäusen, bei denen der Effekt dann nur 12,5% ausmachen dürfte, im Northern Blot nicht detektierbar und wurde, wie oben beschrieben, im Rahmen dieser Arbeit auch nicht nachgewiesen. Das Konstrukt ist jedoch derart aufgebaut, daß, selbst bei einem exon skipping zwischen Exon 1 und 3, kein Signalpeptid oder Startcodon in frame vorhanden ist und somit kein funktionelles L1 Protein translatiert werden kann. Weber *et al.* (1999) beschrieben ein ähnliches Phänomen bei der Konstruktion der Tenascin-R (TNR) Knockout-Maus. Auch hier konnte TNR mRNA in allen drei Genotypen nachgewiesen werden, Western Blot Analysen bestätigten allerdings, daß die funktionslose mRNA nicht translatiert wurde<sup>115</sup>.

Um die Expression des mutierten L1 zu untersuchen, wurde ein Northern Blot mit einer gegen die RNA von Neomycin gerichteten Sonde durchgeführt; die für Neomycin kodierende cDNA war zusammen mit der für den tTA kodierenden cDNA zur Herstellung des L1 Knockouts inseriert worden. Spiegelbildlich ließ sich Neomycin-RNA in Knockout-Mäusen nachweisen und als schwache Bande auch in heterozygoten Mutanten. Wildtyp-Tiere zeigten erwartungsgemäß kein Signal bei der Hybridisierung mit der Sonde gegen Neomycin.

Eine in situ-Hybridisierung wurde durchgeführt, um ein eventuell makroskopisch verändertes L1 Expressionsmuster im Gehirn der heterozygoten Mutanten aufzudecken und um das durch die X-Inaktivierung entstehende Mosaik mikroskopisch zu untersuchen. Es wurden

---

sowohl Digoxigenin- als auch radioaktiv-markierte Sonden verwendet, wobei letztere stärkere Signale lieferten. Dennoch waren die Signale insgesamt zu schwach und unspezifisch, um eine quantitative Aussage über Unterschiede zwischen Wildtyp-, heterozygot und homozygot L1 defizienten Tieren treffen zu können. Ursachen hierfür könnten eine für diese Nachweismethode relativ geringe Neomycin RNA-Konzentration sein, bedingt durch die rückläufige Aktivität des L1-Promoters im Cortex zum Zeitpunkt der Geburt (P0) verglichen mit anderen Strukturen, wie etwa dem<sup>116-118</sup>. Darüber hinaus könnte die Hybridisierung durch Sekundär- oder Tertiärstrukturen sowohl der mutierten tTA-Neomycin-L1 RNA als auch der eingesetzten Neomycin-Sonde eingeschränkt sein. Im Northern Blot war der Nachweis der Neomycin-RNA in Knockout-Mäusen eindeutig, in heterozygot L1 defizienten Mäusen allerdings auch schwieriger.

## **5.2 L1 Knockout-Mäuse der Linie L1ki129 zeigen einen kompletten Verlust der Proteinexpression im Gehirn (Nullmutation), bei heterozygot L1 defizienten Tieren ist diese um 50% reduziert.**

Die im Western Blot dargestellte und densitometrisch quantifizierte Proteinexpression der drei Genotypen entspricht exakt den Erwartungen. Normiert man den Wildtyp auf 100%, beträgt die detektierte Proteinmenge in heterozygoten Tieren ca. 50%, in Knockout-Tieren kann kein Restprotein nachgewiesen werden. Eine halbierte Proteinmenge ist auch für andere heterozygote Mutanten, wie beispielsweise Rax +/- Mäuse, beschrieben. Das RNA-bindende Protein Rax ist während der Entwicklung des Nervensystems in der Maus erforderlich<sup>119</sup>. Die Lokalisation von *L1* auf dem X-Chromosom stellt allerdings eine Besonderheit dar. Die in der Einleitung beschriebene Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen führt bei den Weibchen in jeder Zelle zu einer selektiven Inaktivierung der Allele auf einem der beiden X-Chromosomen<sup>70</sup>. In der Folge bleibt diese Inaktivierung in allen Tochterzellen erhalten, so daß das Inaktivierungsmuster des X-Chromosoms klonal weitergegeben wird und in weiblichen Säugetieren Mosaik auftritt, da sie aus einer Mischung von Zelllinien bestehen, in denen entweder das von der Mutter oder das vom Vater erhaltene X-Chromosom abgeschaltet ist. Geht man von einer zufälligen X-Inaktivierung aus, würde es in heterozygoten Mäusen zu einem Verhältnis von 50:50 zwischen Zellen, die das Wildtyp-Allel exprimieren, und Zellen, in denen die L1 Expression durch die Mutation verhindert wird, kommen, so daß die L1 Expression in heterozygoten

---

Tieren ebenfalls um die Hälfte reduziert sein sollte<sup>69</sup>. Tatsächlich treten in der gesunden weiblichen Bevölkerung in einer Gauß'schen Normalverteilung alle Verhältnisse zwischen 100:0 und 0:100 bezüglich der Inaktivierung des väterlichen bzw. mütterlichen X-Chromosoms auf, eine sehr starke Präferenz (>80:20 oder <20:80) ist jedoch sehr selten<sup>120</sup>. Eine Verschiebung des Verhältnisses während der Entwicklung, also nach der Inaktivierung, durch eine sekundäre Zellselektion ist möglich<sup>121, 122</sup> und wird mit zunehmendem Alter der Konduktorinnen häufiger manifest<sup>123-125</sup>. Im Zusammenhang mit X-chromosomal gekoppelten Erkrankungen kann eine präferentielle Inaktivierung des mutierten X-Chromosoms in Trägerinnen auftreten, wie z.B. bei einigen Syndromen der Gruppe der sogenannten X-linked Mental Retardation Disorders<sup>122</sup>. Eine präferentielle X-Inaktivierung ist allerdings eher die Ausnahme und spezifisch auf einige Erkrankungen beschränkt. Die zufällige Inaktivierung eines X-Chromosoms wurde für viele Konduktorinnen nachgewiesen, so z.B. für die Duchenn'sche Muskeldystrophie<sup>126</sup>.

Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Paraffinschnitten durchgeführten Immunfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen L1 zeigen auf zellulärer Ebene eine zufällige Inaktivierung des X-Chromosoms. Während in Wildtyp-Tieren L1 auf der Oberfläche aller Zellen im Cortex detektiert werden konnte, lagen in heterozygot L1 defizienten Tieren L1-positive neben L1-negativen Zellen vor. Die Verteilung war gleichmäßig, nicht in Clustern. In L1 Knockout-Mäusen war erwartungsgemäß keine Färbung nachzuweisen.

Zusammen sprechen diese Ergebnisse gegen eine präferentielle X-Inaktivierung für das L1-Syndrom. Es ist nicht sicher auszuschließen, jedoch statistisch sehr unwahrscheinlich, daß es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tieren um eine Stichprobe handelt, deren mittlere L1-Expression weit vom Mittelwert einer Grundgesamtheit mit präferentieller X-Inaktivierung abweicht. Für das L1-Syndrom ist daher eine zufällige Inaktivierung des X-Chromosoms anzunehmen.

### **5.3 Tiere der Linie L1ki129 stellen ein gutes Mausmodell für das L1-Syndrom dar.**

Wie auch bei der Dahme-Maus ist in Knockout-Tieren der L1ki129-Linie noch L1 RNA nachweisbar, sogar in relativ großer Menge. Cohen *et al.* beschreiben die Abwesenheit sowohl von RNA als auch Protein in Ihrer Mutante, zeigen jedoch in ihrer Veröffentlichung keine Abbildung eines Western Blot mit maximaler Exposition<sup>83</sup>. Bei Dahme wird eine

---

minimale Proteinmenge detektiert<sup>82</sup>. Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Mausstamm L1ki129 besitzt kein Restprotein und darf somit als komplette Nullmutation bezeichnet werden. Die Lebensfähigkeit hemizygoter Knockout-Tiere ist in allen drei Mutanten verringert, ihr Gewicht um 60-80% reduziert. Im Erwachsenenalter wird der Gewichtsrückstand ausgeglichen<sup>83</sup>, die Reproduktionsfähigkeit der männlichen L1 defizienten Tiere ist jedoch stark eingeschränkt. Die Ursache hierfür ist noch unbekannt. Bei männlichen Knockout-Tieren der L1ki129-Linie war ab einem Alter von 28 Wochen ein Penisprolaps zu beobachten, der z.B. durch Innervationsstörungen bedingt sein könnte. L1 wird auch im männlichen Urogenitaltrakt der Maus exprimiert<sup>39</sup>. Die Ursache dieses Befundes wird in Kooperation mit dem Institut für Männergesundheit des Universitätsklinikums Eppendorf sowie der Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln untersucht, Ergebnisse liegen allerdings noch nicht vor. Die Augen der L1 Knockout-Tiere sind eingesunken und tränen. Ein weiteres gemeinsames Charakteristikum sind schwache Hinterbeine und eine verminderte generelle Aktivität. Auch eine reduzierte Sensitivität für Berührung und Schmerz<sup>82</sup>, fehlendes Erkundungsverhalten<sup>67</sup> sowie eine reduzierte Pre-pulse Inhibition<sup>84</sup> wurden beschrieben. Das Auftreten eines Hydrozephalus ist stark vom genetischen Hintergrund abhängig: heterozygot L1 defiziente C57BL/6J Mäuse zeigen in der Regel einen Hydrozephalus, in Mäusen mit 129-Hintergrund scheinen modifizierende Gene diesen Effekt abzuschwächen, so daß nur wenige Knockout-Tiere der Linie L1ki129 einen Hydrozephalus aufweisen. Bei einem ausgeprägten Hydrozephalus ist der Durchmesser der Hirnrinde reduziert. Demyanenko *et al.* beschreiben darüber hinaus eine abnorme Morphologie der Dendriten der Pyramidenzellen sowie eine Verkleinerung des Corpus callosum<sup>86</sup>. Die Seitenventrikel sind in allen drei Mutanten vergrößert. Auch eine Hypoplasie des Corticospinaltrakts und bedeutende Störungen der axonalen Wegfindung werden beobachtet<sup>127</sup>.

Da Tiere der L1ki129 Linie in den wichtigsten Charakteristika sowohl mit den beiden früher publizierten Mutanten übereinstimmen als auch dem humanen Syndrom ähneln und in Bezug auf das vollständige Fehlen der L1 Expression die beiden anderen Linien noch übertreffen, stellen sie ein weiteres, gutes Mausmodell für das humane L1-Syndrom dar.

---

#### **5.4 In L1 Knockout Mäusen ist das Volumen der Seitenventrikel vergrößert, in heterozygot L1 defizienten Mäusen dagegen verringert.**

In Bezug auf das Gesamtvolumen des Gehirns wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Tieren festgestellt. Das Volumen der Seitenventrikel war jedoch signifikant verringert. In homozygot L1 defizienten Tieren der L1ki129-Linie wurden dagegen vergrößerte Seitenventrikel beschrieben<sup>85</sup>. Eine Dilatation der Ventrikel ist für einige neurologische Erkrankungen wie Hydrozephalus, Schizophrenie oder Chorea Huntington bekannt<sup>47, 128-130</sup>. Heterozygote Tiere zeigten in diesen Studien jedoch dieselbe Tendenz wie Knockout Tiere, wenngleich in geringerem Ausmaß. Ein reduziertes Volumen der Seitenventrikel wurde in LXR $\alpha$  und - $\beta$  Knockout Mäusen beschrieben<sup>131</sup>. In diesen Tieren fehlt die Expression der Gene für die Leber X Rezeptoren, die auch im Gehirn exprimiert werden und vor allem der Lipidhomöostase dienen. Dies führt neben vergrößerten Blutgefäßen im Gehirn, übermäßiger Fetteinlagerung und Dysmyelinisierung zu einer Proliferation von Astrozyten sowie einem Verlust von Neuronen. Im Gegensatz hierzu geht das verringerte Volumen der Seitenventrikel in heterozygot L1 defizienten Mäusen mit einer vermehrten Neuronendichte einher.

#### **5.5 Der heterozygote Status L1 defizienter Tiere geht mit einer erhöhten Proteinsynthese sowie einer Azidose im Gehirn einher.**

In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln wurden funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Dabei fiel eine signifikant erhöhte Proteinsynthese sowie eine deutliche Azidose in der Hirnrinde von heterozygot L1 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. Die fraktionelle Aminosäure-Inkorporation als Indikator der Proteinsynthese war bei der L1 +/- Mutante um 57% erhöht, die Neuronendichte in der untersuchten Region um fast 30%. Es ist also naheliegend, daß die erhöhte Aminosäure-Inkorporation nicht nur durch die Zunahme der Neuronendichte, sondern zusätzlich noch durch eine erhöhte Proteinsyntheserate in der einzelnen Zelle bedingt ist. Obwohl unter vergleichbaren Bedingungen die Proteinsyntheserate mit der fraktionellen Aminosäure-Inkorporation linear korreliert, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen Unterschiede in der Proteindegradation und den verschiedenen Transport- und Äquilibrierungskonstanten

---

bestehen, die in die Berechnung der Proteinsyntheserate eingehen. Außerdem ist denkbar, daß sich die Proteinsyntheserate der Glia ändert<sup>132</sup>.

Die in dieser Arbeit angegebenen pH-Werte wurden mit der Umbelliferone-Methode an Hirnschnitten gemessen und geben damit das gewichtete Mittel der intrazellulären und interstitiellen pH-Werte wieder. Bei einem Verhältnis von extra- zu intrazellulärem Volumen von 30% zu 70% und einem interstitiellen pH von etwa 7.3, liegt der intrazelluläre pH-Wert des Wildtyps bei 7.01 und der der Mutante bei 6.68. Der für Wildtyp-Tiere bestimmte Wert entspricht den Literaturangaben<sup>133</sup>, dagegen ist der pH-Wert in den heterozygot L1 defizienten Tieren deutlich niedriger. Eine respiratorische Azidose kann als Ursache ausgeschlossen werden, da der arterielle pCO<sub>2</sub> der Mutante niedriger und damit der Einfluß auf das Gewebe alkalischer ist als bei Wildtyp-Mäusen. Eine hypoxisch-ischämische Ursache ist ebenfalls unwahrscheinlich, da die Blutflusswerte beider Stämme im Normbereich liegen. Funktionell kann eine Azidose durch Erhöhung der Frequenz der Aktionspotentiale, durch Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren, die Passage einer sog. *spreading depression* und durch Auslösung epileptischer Krämpfe (z.B. durch Bicuculin oder Strychnin) ausgelöst werden. Derartige Azidosen sind jedoch transient und gehen in der Regel in eine relative Alkalose über, so daß ein Zusammenhang ebenfalls eher unwahrscheinlich ist. Eine metabolische Azidose ist die Folge mitochondrialer Störungen (z.B. analog der metabolischen Azidose nach Thiaminmangel) und damit eine mögliche Erklärung<sup>134</sup>. Denkbar ist auch, daß Störungen der intrazellulären pH-Regulation in heterozygoten Mäuse zu dem deutlich reduzierten pH-Wert führen. Die Regulation erfolgt durch Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub> Austausch und den Na<sup>+</sup>-abhängigen HCO<sub>3</sub>-Transport. Um hier Gewissheit zu erlangen, sind weitere Versuche durchzuführen.

Zusammenfassend ist die erhöhte Proteinbiosynthese am ehesten auf die erhöhte neuronale Dichte zurückzuführen, während die Ursache des reduzierten pH-Wertes ungeklärt ist, da in heterozygot L1 defizienten Mäusen auch kein vermehrter Zelltod auftritt, der erniedrigte pH-Werte erklären könnte.

## **5.6 Die neuronale Dichte ist in jungen und adulten heterozygot L1 defizienten Mäusen im sensomotorischen Cortex erhöht.**

NeuN (**N**eural **N**uclear Antigen) ist ein anerkanntes neuronenspezifisches Markerprotein, das in postmitotischen, reifen Nervenzellen im zentralen und peripheren Nervensystem

---

sowohl in Embryonen als auch adulten Vertebraten nachgewiesen werden kann<sup>135</sup>. In jungen (P7) und erwachsenen heterozygot L1 defizienten Mäusen wurde eine signifikant erhöhte Dichte an Neuronen im sensorischen und motorischen (sensomotorischen) Cortex festgestellt. Wildtyp- und L1 Knockout-Tiere unterschieden sich nicht, heterozygot L1 defiziente Mäuse zeigten jedoch im Vergleich mit beiden Genotypen eine um ca. 6% in Jungtieren und um ca. 29% in adulten Tieren gesteigerte Neuronendichte. Die Tendenz zu einer erhöhten neuronalen Dichte war schon zum frühembryonalen Zeitpunkt E11.5 erkennbar, jedoch nicht signifikant. Diese Unterschiede in der Dichte spiegeln Unterschiede in der absoluten Zellzahl einer kortikalen Säule wider, d.h. in dem Volumen des quantifizierten kortikalen Segments, da sich der Durchmesser des Cortex sowie das Gesamtvolumen des Gehirns in heterozygot L1 defizienten Mäusen nicht von dem in Wildtyp-Mäusen unterschied. Auch die Dichte und die räumliche Verteilung GABAerger Interneurone (Parvalbumin<sup>136</sup>), die ca. 30% aller kortikalen Neurone ausmachen sowie der Gliazellen (S-100<sup>137</sup>) war unverändert in den beiden Genotypen. Somit läßt sich eine spezifische Zunahme v.a. der glutamatergen Pyramidenzellen in heterozygot L1 defizienten Tieren schlußfolgern. Pyramidenzellen sind die wichtigsten exzitatorischen Projektionsneurone im Cortex und stammen aus der Ventrikulärzone des dorsalen Telenzephalon<sup>138</sup>. Dort entstehen sie größtenteils aus radialen Gliazellen<sup>139-142</sup>. Interneurone (kleinere Sternzellen), die hauptsächlich inhibitorisch wirken, nehmen dagegen ihren Ursprung in der medialen ganglionischen Eminenz (MGE) des ventralen Telenzephalon. Direkt vergleichbare Beobachtungen sind bisher nicht beschrieben. Es gibt zwei klassische Mißbildungen des Cortex, die auf Mutationen in zwei Genen zurückzuführen sind. Die Lissenzephalie wird durch Deletionen sowie Mikroduplikationen im LIS1 Gen verursacht (beim Menschen 17p13.3) und ist charakterisiert durch fehlende Windungen (Gyri) der Hirnrinde. Der sogenannte „doppelte Cortex“ entsteht bei heterozygoten Trägerinnen einer Mutation im X-chromosomalen Gen DCX (Doublecortin; Xq22.3). Neurone, bei denen das X-Chromosom mit dem mutierten Allel inaktiviert ist, sind in der Lage, ihre Wanderung regelrecht zu vollziehen und sorgen so für eine gefurchte und gelappte Oberfläche der Großhirnrinde. Die übrigen Neuronen können durch das Fehlen des funktionellen DCX-Proteins nicht bis zur Oberfläche des Gehirns vordringen und bilden so eine weiter innen liegende, zweite Schicht mit Zellkörpern, einen zweiten Cortex<sup>143, 144</sup>. Beide Erkrankungen

---

sind auf Fehler in der Migration der Neuronen zurückzuführen, zeichnen sich jedoch nicht durch eine gesteigerte Neuronenzahl aus.

Ein Beispiel für eine Erkrankung mit einer erhöhten Zahl und Dichte an Neuronen ist das Tourette-Syndrom. Allerdings zeigen Kalanithi *et al.* hier einen Anstieg an Parvalbumin-positiven Neuronen im Globus pallidus der Basalganglien<sup>145</sup>. Im Fall der heterozygot L1 defizienten Mäuse ist die Anzahl und Verteilung Parvalbumin-positiver Neurone unverändert, Parvalbumin-negative Neurone werden vermehrt detektiert.

### **5.7 Sowohl die Proliferation als auch die Apoptose sind unverändert in heterozygot L1 defizienten Tieren.**

Die Gesamtzahl der Nervenzellen im Gehirn wird durch die Proliferation sowie die Eliminierung von Zellen durch programmierten Zelltod (Apoptose) reguliert<sup>146</sup>. Da die Anzahl der Neurone in heterozygot L1 defizienten Mäusen bereits früh postnatal erhöht war, ist die Ursache hierfür in der Embryonalentwicklung zu suchen. Ein Großteil der Neurone wird während der Neurogenese zwischen dem Embryonaltag E10 und E17 gebildet. Um die Proliferation der neuralen Vorläuferzellen zu untersuchen, wurde schwangeren Mäusen BrdU (Bromodeoxyuridin) injiziert, zwei Stunden später wurden die Mäuse getötet und die Embryonen entnommen. Im gesamten Zeitraum von E11.5 bis E15.5 war kein Unterschied zwischen heterozygot L1 defizienten und Wildtyp-Tieren zu detektieren.

Auch eine reduzierte Apoptose kann zu einer erhöhten Zellzahl führen. Während der Neurogenese werden 50% der neugebildeten Zellen durch kontrollierten Zelltod wieder abgebaut. Der Höhepunkt der Apoptose postmitotischer Neurone im Neocortex der Maus liegt um den Tag P7<sup>109</sup>. Caspase-3, eine sogenannte Effektor-Caspase, spielt eine Schlüsselrolle in der Apoptosekaskade. Sie spaltet nach ihrer Aktivierung zelleigene Proteine und aktiviert wiederum ihrerseits eine Nuklease für den Abbau von DNA. Mittels Caspase-3-Färbung wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die apoptotischen Zellen zum Zeitpunkt P7 im Cortex von Wildtyp und heterozygoter Mutante quantifiziert. Die Anzahl Caspase-positiver Zellen in heterozygot L1 defizienten Mäusen glich der in Wildtyp-Mäusen.

Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Demyanenko *et al.*, die eine veränderte Neuronenzahl im Hippocampus von L1 Knockout-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Tieren beschreiben und zum Zeitpunkt P0 sowie P10 ebenfalls keine Veränderung in der Apoptose beobachten konnten<sup>86</sup>. Daraus läßt sich schlußfolgern, daß der Verlust bzw. die Reduktion

---

von L1 nicht zu einer reduzierten Apoptoserate gegen Ende der Neurogenese führt, so daß die erhöhte neuronale Dichte wahrscheinlich nicht durch einen Einfluß der verringerten L1 Expression auf die Apoptose bedingt ist. Auch *in vitro* Daten sprechen dafür, daß L1 keinen Einfluß auf den programmierten Zelltod hat. TUNEL-Färbungen zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Apoptose neuraler Stammzellen auf L1-, Laminin- oder PLL-Kontrollsubstrat, weder während der Proliferation noch während der Differenzierung<sup>147</sup>.

Die Reifung des Nervensystems setzt sich allerdings bis ins junge Erwachsenenalter hinein (acht Wochen bei der Maus) fort. Auch im Rahmen der Knüpfung synaptischer Kontakte und der Etablierung neuronaler Netzwerke kommt es im Verlauf der postnatalen Entwicklung zu weiteren apoptotischen Zellverlusten<sup>148</sup>. Es wäre daher möglich, daß der prozentuale Unterschied der neuronalen Dichte, der mit dem Alter der heterozygoten Tiere von 6% auf 29% im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ansteigt, auf eine verringerte „juvenile“ Apoptoserate oder deren frühzeitigeres Ende zurückzuführen ist. Allerdings ist die im Verlauf der späteren Entwicklung nur geringe Apoptoserate experimentellen Messungen nur schwer zugänglich, da z.B. im Cortex junger adulter Mäuse nur sehr wenige Caspase-3<sup>+</sup> apoptotische Zellen nachweisbar sind.

Aufgrund der X-Inaktivierung sind heterozygote Tiere „funktionelle Mosaik“. Wie unter 5.2 beschrieben, ist die X-Inaktivierung zufällig und folgt einer Gauß'schen Normalverteilung. Daher unterscheiden sich heterozygote Individuen untereinander stärker als Individuen innerhalb einer Gruppe von Wildtypen. So sind die meist höheren Standardabweichungen in der Gruppe der heterozygot L1 defizienten Mäuse zu erklären. Theoretisch könnten diese bei einer relativ kleinen Meßwertreihe ( $n = 5$ ) einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen maskieren.

### **5.8 Die neuronale Differenzierung unterscheidet sich nicht zwischen heterozygot L1 defizienten und Wildtyp-Tieren.**

Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Neuronendichte in heterozygot L1 defizienten Mäusen könnte auch in einer vermehrten neuronalen Differenzierung liegen, also nicht in einer Zunahme des Stammzellpools, sondern der neuronalen Vorläuferzellen und damit der „neugeborenen“ Neuronen. Um dies zu prüfen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen Doublecortin (DCX) durchgeführt. DCX markiert spezifisch junge, migrierende Neurone. Eine Schwierigkeit lag in der Quantifizierung dieser Färbung. Zum

---

Zeitpunkt E15.5 zeigen sehr viele Zellen im Cortex eine Immunreaktivität mit DCX-Antikörpern. Da Doublecortin sowohl im perinukleären Zytoplasma als auch in den Zellfortsätzen lokalisiert ist, können einzelne Zellen in Arealen hoher Dichte oft nur schlecht voneinander abgegrenzt werden. Daher wurden nur die Neurone gezählt, die sich in der Ventrikulärzone befanden. Dort konnte im Entwicklungsstadium E15.5 kein Unterschied in der Anzahl junger Neurone zwischen heterozygot L1 defizienten und Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Auch im zeitlichen Verlauf von E15.5 bis P7 konnte keine Veränderung in der Zahl DCX-positiver Zellen und damit der Dauer der Neurogenese in den beiden Genotypen beobachtet werden.

Die Verschiebung eines Zeitfensters nachzuweisen ist ebenso schwierig wie der Vergleich zweier Genotypen zu einem definierten Zeitpunkt während der Embryonalentwicklung. Die Embryonalentwicklung, vor allem die Entwicklung des Gehirns des einzelnen Tieres ist in hohem Maße von der Wurfgröße und damit der damit zusammenhängenden Nährstoffversorgung abhängig. Die Neurogenese z.B. vollzieht sich innerhalb von nur 8 Tagen in der Maus. Dies verdeutlicht welcher Entwicklungsunterschied bei einem Altersunterschied von nur einem Tag vorliegen kann. Die Wurfgrößen variieren zwischen fünf und zehn Jungen. Diese Abweichung kann die Genauigkeit der Analysen der zu vergleichenden Gruppen beeinträchtigen.

### **5.9 In heterozygot L1 defizienten Mäusen konnten keine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen dysregulierten Gene nachgewiesen werden.**

Um in großem Maßstab das Expressionsprofil der Gene im Gehirn heterozygot L1 defizienter Mäuse zu untersuchen, wurde eine Microarray-Analyse der mRNA aus dem Gehirn von vier heterozygoten Mutanten und vier Wildtyp-Tieren durchgeführt. Der verwendete Microarray-Chip erlaubte die Analyse von über 41000 murinen Genen und Transkripten. Nur drei potentiell hochregulierte Gene konnten identifiziert werden: das Wachstumshormon, die  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoprotein hormone sowie das Hormonvorläuferprotein Proopiomelanocortin. Diese Gene kodieren Hypophysenhormone oder Vorläufer von Hypophysenhormonen und werden in der Hirnanhangsdrüse exprimiert. Zur Verifizierung wurden jeweils vier biologische Replikate durch quantitative *Realtime*-PCR (qPCR) untersucht. Homozygot L1 defiziente Mäuse wurden als Kontrolle eingeschlossen. Die Ergebnisse des Microarrays für heterozygot L1 defiziente Mäuse ließen sich nicht bestätigen.

---

Eine Tendenz war erkennbar, die Dysregulationen waren jedoch nicht signifikant. Die Knockout-Tiere zeigten dagegen eine signifikant erhöhte Expression aller drei Gene (um das elf- bis 54-fache). Für die  $\alpha$ -Untereinheit der Glykoprotein hormone ist dies ein neuer Befund, die Dysregulation der beiden anderen Hormone in L1 defizienten Mäusen wurde bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt (G. Wolters, Dr. I. Meier).

Trotz der Kritik an Microarrays hinsichtlich deren Verlässlichkeit und Sensitivität, eignen sie sich für screening-Analysen. Es ist nicht auszuschließen, daß ein Microarray falschpositive und auch falschnegative Resultate liefert, in Kombination mit der zur Verifizierung eingesetzten qPCR ergeben sich jedoch sichere Daten.

Der Literatur zufolge, fördert das Wachstumshormon (GH) die Proliferation neuraler Vorläuferzellen sowie die Neurogenese und Gliogenese im Cortex fötaler Ratten während der Gehirnentwicklung<sup>149</sup>. In Bezug auf heterozygot L1 defiziente Mäuse ist allerdings anzumerken, daß die erhöhte Anzahl an Neuronen im Cortex wahrscheinlich nicht hormonell bedingt ist, da lediglich homozygot L1 defiziente Tiere eine signifikant erhöhte Expression der untersuchten Hypophysenhormone zeigen, während sich in heterozygot L1 defizienten Mäusen lediglich eine Tendenz zu erhöhter Expression nachweisen ließ, aber ausschließlich heterozygote Mutanten eine größere Neuronendichte aufwiesen.

Eine weitere interessante Studie listet 1122 an der Gehirnentwicklung der Maus beteiligte Gene auf, deren Expressionsprofile zu vier verschiedenen Zeitpunkten (E12 – P0) per Microarray-Analyse untersucht wurden<sup>150</sup>. 14 dieser differentiell exprimierten Gene sind auf dem X-Chromosom lokalisiert (s. Anhang Tab. 8.3). Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Agilent „Whole Mouse Genome OligoMicroarray“ beinhaltet diese 14 Gene. Eine Dysregulation konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Damit ist es unwahrscheinlich, daß die genetische Manipulation zur Generierung der L1 defizienten Mäuse mit Insertion einer tTA-Neomycin Kasette, durch eine Beeinflussung benachbarter, in die Neurogenese involvierter Gene auf dem X-Chromosom, zur erhöhten neuronalen Dichte in heterozygot L1 defizienten Mäusen beitrug. Potentielle Effekte auf Gene im Abstand von mehr als 100kb um die Insertionsstelle, die sich auf den Phänotyp transgener Tiere auswirken können, sind z.B. für das Neomycin-Resistenzgen beschrieben<sup>151-153</sup>.

---

## 5.10 Mögliche funktionelle Ursachen

Es ist nicht verwunderlich, daß heterozygote Mäuse einen Phänotyp zeigen. Dobyns *et al.* postulieren, daß generell nicht von gonosomal rezessiven und dominanten Erkrankungen gesprochen werden sollte, sondern von X-chromosomal gekoppelten mit einer unterschiedlichen Penetranz und einem variierenden Schweregrad der Symptome<sup>76</sup>. Tatsächlich kann, bei exakter Untersuchung, für viele X-chromosomal gekoppelte humane Erkrankungen ein Phänotyp in heterozygoten Trägerinnen festgestellt werden. Beispielsweise zeigen Konduktorinnen des Lowe-Syndroms, einer schweren erblichen Stoffwechselanomalie mit körperlicher sowie geistiger Retardierung, die mit einer angeborenen Katarakt einhergeht, in 95% der Fälle eine milde Trübung der Augenlinse. Diese stellt für sie keinerlei Beeinträchtigung dar und kann nur mit einer speziellen Untersuchung nachgewiesen werden. Dennoch liefert dieser Befund einen starken Hinweis auf einen Konduktorinnenstatus<sup>154</sup>. Für das L1-Syndrom liegt die Penetranz bei Trägerinnen bei ca. 10% mit einer minimalen Symptomatik<sup>76</sup>.

Die Tendenz zu einer erhöhten Anzahl an Neuronen im Cortex heterozygot L1 defizienter Tiere ist schon früh (E11.5) erkennbar, wenn auch noch nicht signifikant. Gering ausgeprägte Unterschiede, z.B. in der Proliferation oder der Differenzierung, die eventuell durch eine größere Variabilität in der Gruppe der heterozygoten Mutanten nicht nachweisbar waren, summieren sich möglicherweise über den Verlauf der Embryonalentwicklung.

Vermutlich liegt der Dosisunterschied der L1 Expression zwischen den drei Genotypen dem beobachteten Phänomen zugrunde und könnte sich auf verschiedenste Weise auswirken. Die Gruppe um Prof. Gerardy-Schahn, die sich mit den Funktionen des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM und seinem polymeren Carbohydrat polySia beschäftigt, generierte mehrere Knockout Mäuse, die Defizienzen für verschiedene Kombination der Gene NCAM, St8sia-II und St8sia-IV tragen<sup>155</sup>. Die unterschiedlichen Kombinationen, homozygoter oder heterozygoten Status der drei Allele, resultierten in jeweils verschiedenen Proteindosen und zeigten verschiedene Phänotypen. Der Effekt der Gendosis konnte durch Feineinstellungen der Gesamtmenge an polySia bzw. polysialiertem NCAM zwischen 0 und 100% nachgewiesen werden<sup>156</sup>. Dies könnte auch für L1 gelten.

Normalerweise teilen sich Vorläuferzellen in der Ventrikulärzone in einer frühen Phase (E8.5 bis E10.5) symmetrisch, d.h. aus einer neuralen Stammzelle gehen zwei Tochterstammzellen hervor (Proliferation). In einer späteren Phase (E12.5 bis E17.5) verlaufen die Zellteilungen

---

hauptsächlich asymmetrisch und erzeugen somit eine Stammzelle und eine postmitotische Nervenzelle (Differenzierung). Zusätzlich können sich sogenannte „basale Vorläuferzellen“ in zwei Neurone teilen<sup>157</sup>. Die Proliferation der neuralen Vorläuferzellen ist während der Entwicklung des Gehirns streng kontrolliert, um das Organ in festgelegter Größe zu generieren. Zelladhäsionsmoleküle sind an dieser Kontrolle beteiligt, da sie der Zelle Informationen über die Dichte ihrer Zellumgebung vermitteln können. Gering ausgeprägte Veränderungen in der Zellteilung, d.h. sowohl in dem Zeitpunkt des Umschaltens von symmetrischer zu asymmetrischer Teilung als auch in der Entscheidung der Zellen zu proliferieren oder zu differenzieren, können zu einer Vergrößerung des Pools an Vorläuferzellen führen und damit exponentiell zu einer ausgeprägten Veränderung in der Zelldichte. Der Übergang von neuralen Vorläuferzellen zu Neuronen oder Gliazellen wird über intrinsische sowie extrinsische Signale reguliert, die auf Zielgene wirken, die dann ihrerseits die Differenzierung der Stammzelle fördern oder hemmen<sup>158</sup>. Es ist bekannt, daß z.B. Numb sowie  $\beta$ -Catenin derartige Mediatoren sind. Sowohl für Numb als auch für  $\beta$ -Catenin sind Interaktionen mit L1 publiziert<sup>44, 159, 160</sup>. L1 wird in der Maus ab dem Tag 10 der Embryonalentwicklung exprimiert. Numb beeinflusst die Differenzierung einer neuralen Stammzelle; die Tochterzelle, die im Rahmen der Zellteilung das aktivierte Numb „erbt“ bleibt undifferenziert. Wird Numb in Mäusen mutiert, führt dies zu einem Verlust an neuralen Stammzellen und gleichzeitig zu einer frühzeitigen neuronalen Differenzierung<sup>161</sup>. Darüber hinaus ist Numb im Wachstumskegel von Neuronen mit L1 assoziiert und sorgt dort für die Endozytose und das Recycling von L1 und damit für das Auswachsen des Axons. Es wäre vorstellbar, daß Numb und L1 zusammen auch über andere, noch unbekannte Mechanismen wirken und die neuronale Differenzierung beeinflussen.

Für  $\beta$ -Catenin konnte gezeigt werden, daß es nach Aktivierung in den Zellkern transloziert und dort die Expression verschiedener Gene moduliert, wodurch die Entscheidung, ob sich eine neurale Vorläuferzelle teilt oder differenziert, beeinflusst und die Größe des Zellpools reguliert wird. Eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin führt dazu, daß Zellen nach einer Teilung wieder in den Zellzyklus eintreten, also proliferieren statt zu differenzieren<sup>26</sup>. Im Zusammenhang mit Darmkrebs konnte festgestellt werden, daß  $\beta$ -Catenin das L1 Gen aktiviert und eine Inhibition von  $\beta$ -Catenin die L1 Expression reduziert<sup>160</sup>. Auch der Kehrschluß konnte gezeigt werden: Die Überexpression von L1 in Brustkrebszellen führt zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität von  $\beta$ -Catenin<sup>44</sup>. Für die heterozygot L1

---

defizienten Mäuse könnte dies bedeuten, daß eine geringere Dosis an L1 zu einer geringeren Aktivität von  $\beta$ -Catenin führen könnte, wodurch die Zellen eher differenzieren. Allerdings wäre dieser Effekt auf eine bestimmte Gendosis, nämlich ca. 50%, beschränkt, da die L1 Knockout-Mäuse keine vermehrte neuronale Differenzierung aufweisen.

Für das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM konnte gezeigt werden, daß es die Proliferation neuraler Vorläuferzellen des Hippocampus reduziert und deren neuronale Differenzierung fördert<sup>162</sup>. Die Studie von Dihné *et al.*<sup>147</sup> belegt, daß L1 die Proliferation und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen über heterophile Mechanismen modifiziert. *In vitro* inhibiert L1 als Substrat dosisabhängig die Proliferation neuraler Vorläuferzellen L1 defizienter Mäuse (L1ki129). Außerdem fördert L1 die neuronale Differenzierung und reduziert die Differenzierung neuraler Stammzellen in Astrozyten. Zu diskutieren ist nun warum heterozygot L1 defiziente Mäuse mehr Neuronen aufweisen bzw. warum Wildtyp-Mäuse weniger Neurone im Cortex besitzen als heterozygote Mäuse. Eine mögliche Erklärung ist eine gesteigerte heterophile Interaktion von L1 in heterozygot defizienten Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen. Expressieren alle Neurone L1, was in Wildtyp-Tieren der Fall ist, ist eine homophile Interaktion häufiger möglich als in heterozygot L1 defizienten Tieren. Die homophile Bindung zweier L1-Moleküle führt zum Auswachsen von Neuriten sowie zur Faszikulierung von Axonen und begünstigt das Überleben von Neuronen<sup>163, 164</sup>. In heterozygot L1 defizienten Mäusen, die durchschnittlich nur auf jedem zweiten Neuron L1 exprimieren, könnte eine heterophile Interaktion mit anderen Bindungspartnern verstärkt möglich sein. Dementsprechend könnten Mechanismen, die durch eine heterophile Interaktion ausgelöst werden, wie z.B. die Migration und die Differenzierung, vermehrt stattfinden und ausschlaggebend für den veränderten Phänotyp heterozygot L1 defizienter Mäuse sein. So wäre es möglich, daß L1 auf Neuronen heterozygot L1 defizienter Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen vermehrt heterophil an neurale Vorläufer und seltener homophil an andere Neurone bindet und so die neuronale Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen fördert. *In vitro* läßt sich dies nicht überprüfen, da undifferenzierte, neurale Vorläuferzellen kein L1 exprimieren und zur Überprüfung notwendige Cokulturen mit Neuronen aus Wildtyp- bzw. heterozygot L1 defizienten Tieren die Situation *in vivo* nur unzureichend abbilden würden. Auch eine vermehrte heterophile Interaktion zwischen reifen Neuronen wäre vorstellbar, die zu vermehrtem Überleben von Neuronen in der späteren Entwicklung führt. Es ist auch bekannt, daß die heterophile Bindung von L1 v.a. den

---

Wachstumskegel kontrolliert und sich damit auf die Migration und die axonale Wegfindung auswirkt.

Es muß jedoch betont werden, daß all dies Spekulationen sind. L1 besitzt die Fähigkeit über verschiedene Interaktionspartner und Signaltransduktionswege zu wirken. Darüber hinaus beeinflussen eine Vielzahl anderer Faktoren diese Prozesse ebenfalls. Allein die Fähigkeit zu einer neuronalen Differenzierung von Vorläuferzellen *in vitro* auf dem Kontrollsubstrat Laminin<sup>147</sup> sowie die unveränderte Anzahl an Neuronen in jungen und adulten L1 Knockout-Mäusen, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, verdeutlichen dies. Eine Ursache der erhöhten Neuronendichte in heterozygot L1 defizienten Mäusen zu finden, ist aufgrund der Komplexität der Vorgänge und der weitreichenden Wechselwirkungen nicht einfach.

Die wesentliche Erkenntnis dieser Studie ist, daß heterozygot L1 defiziente Mäuse eine Sonderstellung einnehmen und ihr Phänotyp weder zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren einzuordnen ist, noch dem Phänotyp eines der beiden anderen Genotypen gleicht. Die Ursache hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, wurde zeitlich jedoch auf die Embryonalentwicklung eingegrenzt. Die Arbeit hebt hervor, daß heterozygote Mäuse in Mutationsanalysen unbedingt untersucht werden sollten.

Weiterführende Experimente könnten Verhaltensversuche sein, um die Folgen der erhöhten Neuronenzahl zu analysieren. Transgene Mäuse, denen das anti-apoptotische Gen Bcl-2 fehlt, zeigen beispielsweise eine erhöhte Neuronenzahl und eine größere Lernfähigkeit<sup>165</sup>. Heterozygot L1 defiziente Mäuse könnten im Morris-Watermaze getestet werden.

Eine andere Möglichkeit wäre Mäuse der L1ki129-Linie mit Tis21-GFP Knock-In Tieren<sup>166</sup> zu kreuzen. In diesen Tieren wurde der Proteincodierende Bereich des Exons 1 des Tis21 Gens durch das green fluorescent protein (GFP) mit einem Kerntransportsignal ersetzt. Neurone exprimieren das antiproliferative Tis21 nicht, dagegen sind nahezu alle neuronalen Vorläuferzellen des Neuralrohrs der Tis21-GFP Knock-In Embryonen grün markiert. Damit können Vorläuferzellen, die nach ihrer nächsten Teilung postmitotische Neurone hervorbringen, *in vivo* detektiert und das Umschalten der Zellen von symmetrischer zu asymmetrischer Teilung sichtbar gemacht werden. In heterozygot L1 defizienten-Tis21-GFP Mäusen könnte verfolgt werden, ob die erhöhte Anzahl an Neuronen aus einer vermehrten neuronalen Differenzierung resultiert und welche Zellpopulation beeinflusst wird.

Im Rahmen von geplanten Studien an humanen Trägerinnen kann außerdem eine mögliche Relevanz der vorliegenden Ergebnisse auch für den Menschen geprüft werden.

---

## ZUSAMMENFASSUNG

---

## 6. Zusammenfassung

Zelladhäsionsmoleküle sind sowohl an der Entwicklung als auch an der Regeneration des zentralen und peripheren Nervensystems maßgeblich beteiligt. Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1, ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie der Zelladhäsionsmoleküle, beeinflusst Migration, Neuritenwachstum, axonale Wegfindung, Faszikulierung und Myelinisierung während der Entwicklung, spielt aber auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle. Mutationen im *L1* Gen, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, führen zu schwerwiegenden neurologischen Krankheitsbildern, die unter der Bezeichnung L1-Syndrom (früher CRASH-Syndrom als Akronym für Hypoplasie des Corpus callosum, geistige Retardierung, angewinkelte Daumen, spastische Paraparese, Hydrozephalus) zusammengefaßt werden. Das L1-Syndrom ist eine gonosomal-rezessive Erkrankung mit einer Prävalenz von ca. 1:30000. Über heterozygote Trägerinnen wurde in der Literatur bisher wenig berichtet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung heterozygot L1 defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen als Modell für heterozygote Trägerinnen des L1-Syndroms.

Zu diesem Zweck wurde eine in unserem Labor generierte L1 Knockout-Mausmutante charakterisiert, die sich, neben zwei bereits bekannten, als ein drittes Mausmodell für das humane L1-Syndrom erwies. Meine Untersuchungen zeigten, daß heterozygote Tiere dieses Stammes im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine um 50% reduzierte Proteinexpression aufweisen. Immunhistochemische Untersuchungen veranschaulichten auch auf zellulärer Ebene eine gleichmäßige Verteilung L1-positiver sowie L1-negativer Neurone im Cortex heterozygot L1 defizienter Mäuse. Es liegt also keine präferentielle Inaktivierung des mutierten X-Chromosoms vor. Der auffälligste Unterschied zwischen Wildtyp- und heterozygot L1 defizienten Mäusen ist eine signifikant erhöhte Dichte an Neuronen im Cortex junger (P7) sowie adulter heterozygoter Tiere bei einer unveränderten Anzahl an Gliazellen, wobei die neuronale Dichte im Cortex L1 defizienter Mäuse keinen Unterschied zu derjenigen in Wildtyp-Mäusen aufweist. Eine derartige Tendenz war bereits zum Zeitpunkt

---

E11.5 erkennbar. Proliferationsstudien in embryonalen bis früh postnatalen Entwicklungsstadien (E11.5 bis P7) sowie die Quantifizierung apoptotischer Zellen im Cortex (P7) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen heterozygot L1 defizienten und Wildtyp-Mäusen. Auch die neuronale Differenzierung zum Zeitpunkt E15.5, gemessen anhand der Anzahl Doublecortin-positiver Zellen im Cortex, war unverändert. Eine Microarray-Analyse heterozygot L1 defizienter Mäuse zum Entwicklungsstadium P0 identifizierte eine Dysregulation von drei für Hypophysenhormone kodierenden Genen. In der quantitativen *Realtime*-PCR ließ sich dies jedoch nicht verifizieren. Die erhöhte Neuronendichte ist somit auch nicht hormonell bedingt. In Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln wurden funktionelle Daten erhoben. Dabei fielen eine deutliche Azidose sowie eine signifikant erhöhte Proteinsynthese in der Hirnrinde von heterozygot L1 defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf. Diese Befunde korrelieren mit der dort erhöhten Anzahl an Neuronen.

Abschließend konnte die Ursache der ausschließlich in heterozygoten Mäusen erhöhten Dichte an Neuronen nicht geklärt werden. Da dieser Unterschied allerdings schon in frühen Entwicklungsstadien nachweisbar war, sind die zugrundeliegenden Prozesse eher während der Entwicklung als im adulten Tier zu suchen.

Zusammenfassend zeigen heterozygot L1 defizienten Mäuse einen sowohl von Wildtyp- als auch von homozygot L1 defizienten Mäusen unterschiedlichen Phänotyp. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit, auch heterozygote Tiere bei der Analyse transgener Mauslinien intensiv zu untersuchen.

---

## 7. Abstract

Cell recognition molecules play an important role during development, function and regeneration of the central and peripheral nervous system. The neural cell adhesion molecule L1, a member of the immunoglobulin superfamily of neural cell adhesion molecules, influences migration, neurite outgrowth, axonal pathfinding, fasciculation and myelination in the developing brain. Moreover, it has a major impact on the adult nervous system. Mutations in the *L1* gene, which is located on the X-chromosome, lead to severe neurological diseases which are summarised as L1-Syndrom (formerly known as CRASH-Syndrom, the acronym for hypoplasia of the corpus callosum, mental retardation, adducted thumbs, spastic paraparesia, hydrocephalus). The L1-Syndrom is a rare gonosomal disease with varying penetrance and a prevalence of approximately 1:30000. To date, only few studies investigate female heterozygous conductors.

The aim of the present study was the analysis of heterozygous L1 deficient mice, a paradigm of female heterozygous conductors of the L1-Syndrom, in comparison to wildtype and L1 knockout mice.

To this end, a L1 knockout mouse strain generated in our laboratory was characterised. Morphological and biochemical analysis confirmed that this mouse strain represents a new valid mouse model for the human L1-Syndrom besides the two established ones. Heterozygous mice of this line showed a reduced expression of the protein by 50% compared to wild type mice. Immunohistochemical analysis demonstrated a random distribution of L1-positive and L1-negative neurons on the cellular level in the cortex of heterozygous L1 deficient mice. Thus, preferential X-inactivation could be excluded. The most striking difference between wild type and heterozygous L1 deficient mice was the significantly enhanced density of neurons in the cortex of juvenile (P7) as well as adult heterozygous animals while the number of glial cells was not altered. A tendency towards enhanced neuronal density was observed as early as day 11.5 during mouse embryonic development. In contrast, the neuronal density in the cortex of L1 knockout and wild type

---

mice was similar. Proliferation studies at embryonic to early post natal stages of development (E11.5 to P7) as well as the quantification of apoptotic cells in the cortex (P7) displayed no significant differences between heterozygous and wild type mice. Neuronal differentiation estimated by immunohistochemical analysis of Doublecortin positive cells in the cortex at the time point E15.5 was unchanged. Microarray analysis of total brain mRNA of heterozygous L1 deficient mice at P0 identified a dysregulation of three genes encoding for pituitary hormones. This result could not be verified by quantitative Realtime PCR. Hence, the enhanced neuronal density was not due to hormonal alterations. In cooperation with the Max-Planck-Institute for Neurological Research in Cologne functional data was collected revealing a marked acidosis and a significantly enhanced protein synthesis in the cortex of heterozygous L1 deficient mice compared to wild type mice. These findings correlate well with the enhanced number of neurons in this brain region.

The reason for the enhanced density of neurons exclusively in heterozygous mice could not be finally clarified. Since this difference was detectable already at early stages of development the underlying mechanisms can be attributed to events during early development rather than in the adult animal.

In summary, the heterozygous L1 deficient mice exhibit a phenotype different from wild type as well as L1 knockout mice. The findings of this study emphasise the need to analyse heterozygous animals along with knockout animals of transgenic mouse lines.

---

## 8. Literaturverzeichnis

1. Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. Essentials of neural science and behavior, XXI, 743 s. (Prentice-Hall, London, 1995).
  2. Kemler, R. & Ozawa, M. Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion molecule. *Bioessays* 11, 88-91 (1989).
  3. Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451-5 (1991).
  4. Reichardt, L.F. & Tomaselli, K.J. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14, 531-70 (1991).
  5. Hynes, R.O. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr Opin Genet Dev* 2, 621-4 (1992).
  6. McEver, R.P., Moore, K.L. & Cummings, R.D. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 270, 11025-8 (1995).
  7. Kansas, G.S. & Pavalko, F.M. The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion. *J Immunol* 157, 321-5 (1996).
  8. Sanes, D.H. & Poo, M.M. In vitro analysis of position- and lineage-dependent selectivity in the formation of neuromuscular synapses. *Neuron* 2, 1237-44 (1989).
  9. Williams, A.F. & Barclay, A.N. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6, 381-405 (1988).
  10. Brummendorf, T. & Rathjen, F.G. Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* 61, 1207-19 (1993).
  11. Rathjen, F.G. & Schachner, M. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *Embo J* 3, 1-10 (1984).
  12. Sadoul, K., Sadoul, R., Faissner, A. & Schachner, M. Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 50, 510-21 (1988).
  13. Hortsch, M. The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17, 587-93 (1996).
  14. Crossin, K.L. & Krushel, L.A. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 218, 260-79 (2000).
  15. Moos, M. et al. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334, 701-3 (1988).
  16. Hlavin, M.L. & Lemmon, V. Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison. *Genomics* 11, 416-23 (1991).
  17. Hortsch, M. Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 15, 1-10 (2000).
-

18. McGuire, J.C., Greene, L.A. & Furano, A.V. NGF stimulates incorporation of fucose or glucosamine into an external glycoprotein in cultured rat PC12 pheochromocytoma cells. *Cell* 15, 357-65 (1978).
  19. Salton, S.R., Shelanski, M.L. & Greene, L.A. Biochemical properties of the nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein. *J Neurosci* 3, 2420-30 (1983).
  20. Grumet, M., Hoffman, S., Chuong, C.M. & Edelman, G.M. Polypeptide components and binding functions of neuron-glia cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7989-93 (1984).
  21. Lemmon, V. Localization of a filamin-like protein in glia of the chick central nervous system. *J Neurosci* 6, 43-51 (1986).
  22. Rathjen, F.G., Wolff, J.M., Frank, R., Bonhoeffer, F. & Rutishauser, U. Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation. *J Cell Biol* 104, 343-53 (1987).
  23. Tongiorgi, E., Bernhardt, R.R. & Schachner, M. Zebrafish neurons express two L1-related molecules during early axonogenesis. *J Neurosci Res* 42, 547-61 (1995).
  24. Huang, Y., Jellies, J., Johansen, K.M. & Johansen, J. Differential glycosylation of tractin and LeechCAM, two novel Ig superfamily members, regulates neurite extension and fascicle formation. *J Cell Biol* 138, 143-57 (1997).
  25. Bieber, A.J. et al. Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* 59, 447-60 (1989).
  26. Chenn, A. & Walsh, C.A. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365-9 (2002).
  27. Djabali, M. et al. The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics* 7, 587-93 (1990).
  28. Reid, R.A. & Hemperly, J.J. Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J Mol Neurosci* 3, 127-35 (1992).
  29. Miura, M., Asou, H., Kobayashi, M. & Uyemura, K. Functional expression of a full-length cDNA coding for rat neural cell adhesion molecule L1 mediates homophilic intercellular adhesion and migration of cerebellar neurons. *J Biol Chem* 267, 10752-8 (1992).
  30. Jouet, M., Rosenthal, A. & Kenwrick, S. Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain Res Mol Brain Res* 30, 378-80 (1995).
  31. Takeda, Y. et al. A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem* 66, 2338-49 (1996).
  32. Martini, R. & Schachner, M. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106, 1735-46 (1988).
  33. Bixby, J.L., Lilien, J. & Reichardt, L.F. Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol* 107, 353-61 (1988).
  34. Moscoso, L.M. & Sanes, J.R. Expression of four immunoglobulin superfamily adhesion molecules (L1, Nr-CAM/Bravo, neurofascin/ABGP, and N-CAM) in the developing mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 352, 321-34 (1995).
  35. Seilheimer, B. & Schachner, M. Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J Cell Biol* 107, 341-51 (1988).
-

36. Thor, G., Probstmeier, R. & Schachner, M. Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. *Embo J* 6, 2581-6 (1987).
  37. Kowitz, A. et al. Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol* 22, 1199-205 (1992).
  38. Hubbe, M., Kowitz, A., Schirmmacher, V., Schachner, M. & Altevogt, P. L1 adhesion molecule on mouse leukocytes: regulation and involvement in endothelial cell binding. *Eur J Immunol* 23, 2927-31 (1993).
  39. Kujat, R., Miragall, F., Krause, D., Dermietzel, R. & Wrobel, K.H. Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in non-proliferating epithelial cells of the male urogenital tract. *Histochem Cell Biol* 103, 311-21 (1995).
  40. Debiec, H., Christensen, E.I. & Ronco, P.M. The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J Cell Biol* 143, 2067-79 (1998).
  41. Nolte, C., Moos, M. & Schachner, M. Immunolocalization of the neural cell adhesion molecule L1 in epithelia of rodents. *Cell Tissue Res* 298, 261-73 (1999).
  42. Issa, Y. et al. Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med* 87, 99-112 (2009).
  43. Daponte, A. et al. L1 (CAM) (CD171) in ovarian serous neoplasms. *Eur J Gynaecol Oncol* 29, 26-30 (2008).
  44. Shtutman, M., Levina, E., Ohouo, P., Baig, M. & Roninson, I.B. Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res* 66, 11370-80 (2006).
  45. Boo, Y.J. et al. L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 14, 1703-11 (2007).
  46. Raveh, S., Gavert, N. & Ben-Ze'ev, A. L1 cell adhesion molecule (L1CAM) in invasive tumors. *Cancer Lett* (2009).
  47. Wachowiak, R. et al. L1 is associated with favorable outcome in neuroblastomas in contrast to adult tumors. *Ann Surg Oncol* 14, 3575-80 (2007).
  48. Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P. & Schachner, M. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 110, 193-208 (1990).
  49. Dickson, T.C., Mintz, C.D., Benson, D.L. & Salton, S.R. Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol* 157, 1105-12 (2002).
  50. Bennett, V. & Chen, L. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 13, 61-7 (2001).
  51. Faissner, A., Kruse, J., Nieke, J. & Schachner, M. Expression of neural cell adhesion molecule L1 during development, in neurological mutants and in the peripheral nervous system. *Brain Res* 317, 69-82 (1984).
  52. Wood, P.M., Schachner, M. & Bunge, R.P. Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci* 10, 3635-45 (1990).
  53. Itoh, K. et al. Disrupted Schwann cell-axon interactions in peripheral nerves of mice with altered L1-integrin interactions. *Mol Cell Neurosci* 30, 131-6 (2005).
  54. Maness, P.F. & Schachner, M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10, 19-26 (2007).
-

55. Bernreuther, C. et al. Neural cell adhesion molecule L1-transfected embryonic stem cells promote functional recovery after excitotoxic lesion of the mouse striatum. *J Neurosci* 26, 11532-9 (2006).
  56. Bickers, D.S. & Adams, R.D. Hereditary stenosis of the aqueduct of Sylvius as a cause of congenital hydrocephalus. *Brain* 72, 246-62 (1949).
  57. Edwards, J.H. The syndrome of sex-linked hydrocephalus. *Arch Dis Child* 36, 486-93 (1961).
  58. Rosenthal, A., Jouet, M. & Kenwrick, S. Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet* 2, 107-12 (1992).
  59. Wong, E.V., Kenwrick, S., Willems, P. & Lemmon, V. Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *Trends Neurosci* 18, 168-72 (1995).
  60. Fransen, E. et al. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet* 3, 273-84 (1995).
  61. Finckh, U., Schroder, J., Ressler, B., Veske, A. & Gal, A. Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease. *Am J Med Genet* 92, 40-6 (2000).
  62. Halliday, J., Chow, C.W., Wallace, D. & Danks, D.M. X linked hydrocephalus: a survey of a 20 year period in Victoria, Australia. *J Med Genet* 23, 23-31 (1986).
  63. Holtzman, R.N., Garcia, L. & Koenigsberger, R. Hydrocephalus and congenital clasped thumbs: a case report with electromyographic evaluation. *Dev Med Child Neurol* 18, 521-4 (1976).
  64. Van Camp, G., Fransen, E., Vits, L., Raes, G. & Willems, P.J. A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion molecule L1CAM (Xq28). *Hum Mutat* 8, 391 (1996).
  65. Kamiguchi, H., Hlavin, M.L., Yamasaki, M. & Lemmon, V. Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci* 21, 97-125 (1998).
  66. Weller, S. & Gartner, J. Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* 18, 1-12 (2001).
  67. Fransen, E. et al. L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet* 7, 999-1009 (1998).
  68. Yamasaki, M., Thompson, P. & Lemmon, V. CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 28, 175-8 (1997).
  69. Lyon, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372-3 (1961).
  70. Migeon, B.R., Luo, S., Jani, M. & Jeppesen, P. The severe phenotype of females with tiny ring X chromosomes is associated with inability of these chromosomes to undergo X inactivation. *Am J Hum Genet* 55, 497-504 (1994).
  71. Strachan, T. & Read, A.P. Human molecular genetics, XXV, 674 s. (Garland Science, London, 2004).
  72. McMahan, A., Fosten, M. & Monk, M. X-chromosome inactivation mosaicism in the three germ layers and the germ line of the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol* 74, 207-20 (1983).
  73. Chadwick, L.H., Pertz, L.M., Broman, K.W., Bartolomei, M.S. & Willard, H.F. Genetic control of X chromosome inactivation in mice: definition of the Xce candidate interval. *Genetics* 173, 2103-10 (2006).
-

74. Brown, C.J. & Willard, H.F. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature* 368, 154-6 (1994).
  75. Knippers, R. *Molekulare Genetik*, xv, 303 p. (Thieme, Stuttgart, 1974).
  76. Dobyns, W.B. et al. Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet A* 129A, 136-43 (2004).
  77. Kaepernick, L., Legius, E., Higgins, J. & Kapur, S. Clinical aspects of the MASA syndrome in a large family, including expressing females. *Clin Genet* 45, 181-5 (1994).
  78. Dobson, C.B. et al. Abnormal corticospinal function but normal axonal guidance in human L1CAM mutations. *Brain* 124, 2393-406 (2001).
  79. Bianchine, J.W. & Lewis, R.C., Jr. The MASA syndrome: a new heritable mental retardation syndrome. *Clin Genet* 5, 298-306 (1974).
  80. Macias, V.R., Day, D.W., King, T.E. & Wilson, G.N. Clasped-thumb mental retardation (MASA) syndrome: confirmation of linkage to Xq28. *Am J Med Genet* 43, 408-14 (1992).
  81. Tacke, R. et al. Identification of cDNA clones of the mouse neural cell adhesion molecule L1. *Neurosci Lett* 82, 89-94 (1987).
  82. Dahme, M. et al. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet* 17, 346-9 (1997).
  83. Cohen, N.R. et al. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 8, 26-33 (1998).
  84. Irintchev, A., Koch, M., Needham, L.K., Maness, P. & Schachner, M. Impairment of sensorimotor gating in mice deficient in the cell adhesion molecule L1 or its close homologue, CHL1. *Brain Res* 1029, 131-4 (2004).
  85. Rolf, B., Kutsche, M. & Bartsch, U. Severe hydrocephalus in L1-deficient mice. *Brain Res* 891, 247-52 (2001).
  86. Demyanenko, G.P., Tsai, A.Y. & Maness, P.F. Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci* 19, 4907-20 (1999).
  87. Stanfield, B.B. The development of the corticospinal projection. *Prog Neurobiol* 38, 169-202 (1992).
  88. Saghatelian, A.K. et al. 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 (2004).
  89. Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-8 (1990).
  90. Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E.F. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3 b. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).
  91. Saiki, R.K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4 (1985).
  92. Ausubel, F.M. *Current protocols in molecular biology*, 5 v. (Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience: J. Wiley, New York, 1988).
  93. Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13 (1983).
  94. Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26, 509-15 (2004).
-

95. Smith, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85 (1985).
  96. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5 (1970).
  97. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4 (1979).
  98. Ausubel, L.J., Kwan, C.K., Sette, A., Kuchroo, V. & Hafler, D.A. Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15317-22 (1996).
  99. Jiao, Y. et al. Identification of the anterior nucleus of the ansa lenticularis in birds as the homolog of the mammalian subthalamic nucleus. *J Neurosci* 20, 6998-7010 (2000).
  100. Sofroniew, M.V., Isacson, O. & O'Brien, T.S. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 476, 358-62 (1989).
  101. Irintchev, A., Rosenblatt, J.D., Cullen, M.J., Zwyer, M. & Wernig, A. Ectopic skeletal muscles derived from myoblasts implanted under the skin. *J Cell Sci* 111 (Pt 22), 3287-97 (1998).
  102. Abercrombie, M. & Johnson, M.L. Quantitative histology of Wallerian degeneration: I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. *J Anat* 80, 37-50 (1946).
  103. Mayhew, T.M. Stereological approach to the study of synapse morphometry with particular regard to estimating number in a volume and on a surface. *J Neurocytol* 8, 121-38 (1979).
  104. Rodriguez Criado, G. et al. X-linked hydrocephalus: another two families with an L1 mutation. *Genet Couns* 14, 57-65 (2003).
  105. Kaufman, M.H. *The atlas of mouse development*, xvi, 512 s. (Academic Press, London, 1992).
  106. Paxinos, G. *Atlas of the developing mouse brain at E17.5, P0, and P6*, XXIII, 176 pl. (Academic Press, London, 2007).
  107. Sidman, R.L., Angevine, J.B. & Pierce, E.T. *Atlas of the mouse brain and spinal cord*: Richard L. Sidman, Jay B. Angevine, Jr. [and] Elizabeth Taber Pierce, XI, 261 s. (Harvard Univ. Press, Cambridge, 1971).
  108. Irintchev, A., Rollenhagen, A., Troncoso, E., Kiss, J.Z. & Schachner, M. Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex* 15, 950-62 (2005).
  109. Min, S.H. et al. Differential expression of proteins of caspases and Bcl-2 families in the brain of mice. *Int J Mol Med* 12, 181-3 (2003).
  110. Gleeson, J.G., Lin, P.T., Flanagan, L.A. & Walsh, C.A. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. in *Neuron*, Vol. 23 257-71 (1999).
  111. Gossen, M. et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-9 (1995).
  112. Gossen, M. & Bujard, H. Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* 36, 153-73 (2002).
  113. Lewandoski, M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2, 743-55 (2001).
-

114. Yamamoto, K. et al. Identification of the tetracycline resistance gene, tet(M), in *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 48, 293-301 (2001).
  115. Weber, P. et al. Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J Neurosci* 19, 4245-62 (1999).
  116. Hillenbrand, R., Molthagen, M., Montag, D. & Schachner, M. The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. *Eur J Neurosci* 11, 813-26 (1999).
  117. Munakata, H. et al. Distribution and densitometry mapping of L1-CAM immunoreactivity in the adult mouse brain—light microscopic observation. *BMC Neurosci* 4, 7 (2003).
  118. Horinouchi, K., Nakamura, Y., Yamanaka, H., Watabe, T. & Shiosaka, S. Distribution of L1cam mRNA in the adult mouse brain: In situ hybridization and Northern blot analyses. *J Comp Neurol* 482, 386-404 (2005).
  119. Bennett, R.L. et al. RAX is required for fly neuronal development and mouse embryogenesis. *Mech Dev* 125, 777-85 (2008).
  120. Amos-Landgraf, J.M. et al. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 79, 493-9 (2006).
  121. Nyhan, W.L., Bakay, B., Connor, J.D., Marks, J.F. & Keele, D.K. Hemizygous expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes of heterozygotes for the Lesch-Nyhan syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65, 214-8 (1970).
  122. Plenge, R.M., Stevenson, R.A., Lubs, H.A., Schwartz, C.E. & Willard, H.F. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet* 71, 168-73 (2002).
  123. Busque, L. et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood* 88, 59-65 (1996).
  124. Hatakeyama, C. et al. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clin Genet* 66, 327-32 (2004).
  125. Sandovici, I., Naumova, A.K., Leppert, M., Linares, Y. & Sapienza, C. A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. *Hum Genet* 115, 387-92 (2004).
  126. Willard in Scriver, C.R. *The Metabolic & molecular bases of inherited disease*, 4 b. (McGraw-Hill, New York, 2001).
  127. Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C. & Rougon, G. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27, 237-49 (2000).
  128. Ma, X., Bao, J. & Adelstein, R.S. Loss of cell adhesion causes hydrocephalus in nonmuscle myosin II-B-ablated and mutated mice. *Mol Biol Cell* 18, 2305-12 (2007).
  129. Petrasch-Parwez, E. et al. Cellular and subcellular localization of Huntingtin [corrected] aggregates in the brain of a rat transgenic for Huntington disease. *J Comp Neurol* 501, 716-30 (2007).
  130. Shen, S. et al. Schizophrenia-related neural and behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Disc1. *J Neurosci* 28, 10893-904 (2008).
  131. Wang, L. et al. Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13878-83 (2002).
  132. Magistretti, P.J. & Pellerin, L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 1155-63 (1999).
-

133. Putnam, R.W., Filosa, J.A. & Ritucci, N.A. Cellular mechanisms involved in CO<sub>2</sub> and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1493-526 (2004).
  134. Hakim, A.M. The induction and reversibility of cerebral acidosis in thiamine deficiency. *Ann Neurol* 16, 673-9 (1984).
  135. Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-11 (1992).
  136. Heinzmann, C. et al. RFLP for the human lipoprotein lipase (LPL) gene: HindIII. *Nucleic Acids Res* 15, 6763 (1987).
  137. Ghandour, M.S., Langley, O.K., Labourdette, G., Vincendon, G. & Gombos, G. Specific and artefactual cellular localizations of S 100 protein: an astrocyte marker in rat cerebellum. *Dev Neurosci* 4, 66-78 (1981).
  138. Parnavelas, J.G. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci* 23, 126-31 (2000).
  139. Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S. & Kriegstein, A.R. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-20 (2001).
  140. Noctor, S.C. et al. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22, 3161-73 (2002).
  141. Tamamaki, N., Nakamura, K., Okamoto, K. & Kaneko, T. Radial glia is a progenitor of neocortical neurons in the developing cerebral cortex. *Neurosci Res* 41, 51-60 (2001).
  142. Malatesta, P., Hartfuss, E. & Gotz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127, 5253-63 (2000).
  143. Leventer, R.J., Mills, P.L. & Dobyns, W.B. X-linked malformations of cortical development. *Am J Med Genet* 97, 213-20 (2000).
  144. Pilz, D.T. et al. LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* 7, 2029-37 (1998).
  145. Kalanithi, P.S. et al. Altered parvalbumin-positive neuron distribution in basal ganglia of individuals with Tourette syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13307-12 (2005).
  146. Sanes, D.H., Reh, T.A. & Harris, W.A. *Development of the nervous system, XIII*, 373 s. (Elsevier AP, Amsterdam, 2005).
  147. Dihne, M., Bernreuther, C., Sibbe, M., Paulus, W. & Schachner, M. A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J Neurosci* 23, 6638-50 (2003).
  148. Naruse, I. & Keino, H. Apoptosis in the developing CNS. *Prog Neurobiol* 47, 135-55 (1995).
  149. Ajo, R., Cacicedo, L., Navarro, C. & Sanchez-Franco, F. Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology* 144, 1086-97 (2003).
  150. Matsuki, T., Hori, G. & Furuichi, T. Gene expression profiling during the embryonic development of mouse brain using an oligonucleotide-based microarray system. *Brain Res Mol Brain Res* 136, 231-54 (2005).
  151. Pham, C.T., MacIvor, D.M., Hug, B.A., Heusel, J.W. & Ley, T.J. Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13090-5 (1996).
-

152. Ren, S.Y., Angrand, P.O. & Rijli, F.M. Targeted insertion results in a rhombomere 2-specific *Hoxa2* knockdown and ectopic activation of *Hoxa1* expression. *Dev Dyn* 225, 305-15 (2002).
  153. Revell, P.A. et al. Granzyme B and the downstream granzymes C and/or F are important for cytotoxic lymphocyte functions. *J Immunol* 174, 2124-31 (2005).
  154. Loi, M. Lowe syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 1, 16 (2006).
  155. Weinhold, B. et al. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 280, 42971-7 (2005).
  156. Galuska, S.P. et al. Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV. *J Biol Chem* 281, 31605-15 (2006).
  157. Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. & Huttner, W.B. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3196-201 (2004).
  158. Kintner, C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells. *J Neurosci* 22, 639-43 (2002).
  159. Nishimura, K. et al. L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol* 163, 1077-88 (2003).
  160. Gavert, N. et al. L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 168, 633-42 (2005).
  161. Petersen, P.H., Zou, K., Hwang, J.K., Jan, Y.N. & Zhong, W. Progenitor cell maintenance requires *numb* and *numbl* during mouse neurogenesis. *Nature* 419, 929-34 (2002).
  162. Amoureux, M.C., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. & Crossin, K.L. N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci* 20, 3631-40 (2000).
  163. Kenwrick, S., Watkins, A. & De Angelis, E. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9, 879-86 (2000).
  164. Schmid, R.S., Pruitt, W.M. & Maness, P.F. A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J Neurosci* 20, 4177-88 (2000).
  165. Coleman, G.J., Bernard, C.C. & Bernard, O. Bcl-2 transgenic mice with increased number of neurons have a greater learning capacity. *Brain Res* 832, 188-94 (1999).
  166. Iacopetti, P. et al. Expression of the antiproliferative gene *TIS21* at the onset of neurogenesis identifies single neuroepithelial cells that switch from proliferative to neuron-generating division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4639-44 (1999).
-

## 9. Anhang

### 9.1 Zusätzliche Tabellen

Tab. 9.1: Cerebrale Proteinsynthese (CPS) – einzelne Regionen

Struktur	Region	+/+	+/-	Signifikanz
		(fraktionelle Leucin Inkorporation)	(fraktionelle Leucin Inkorporation)	
Telencephalon	Cingulum	0,17 ± 0,03	0,29 ± 0,10	*
	Motorischer Cortex	0,16 ± 0,04	0,28 ± 0,08	*
	Sensorischer Cortex	0,16 ± 0,04	0,28 ± 0,08	*
	Limbischer Cortex	0,17 ± 0,04	0,26 ± 0,07	
	Inselrinde	0,15 ± 0,04	0,25 ± 0,08	*
	Orbitaler Cortex	0,15 ± 0,04	0,29 ± 0,13	
	Piriformer Cortex	0,15 ± 0,03	0,24 ± 0,08	*
	Olfaktorischer Cortex	0,12 ± 0,04	0,19 ± 0,06	*
	Retrosplenial	0,17 ± 0,04	0,27 ± 0,08	*
	Parietaler Cortex	0,16 ± 0,04	0,28 ± 0,08	*
	Visueller Cortex	0,16 ± 0,04	0,26 ± 0,08	*
	Auditorischer Cortex	0,16 ± 0,04	0,26 ± 0,09	*
	Temporaler Cortex	0,15 ± 0,03	0,24 ± 0,09	
	Ectorhinaler Cortex	0,14 ± 0,03	0,23 ± 0,07	*
	Perirhinaler Cortex	0,14 ± 0,03	0,22 ± 0,07	*
	Lateraler endopiriformer Cortex	0,14 ± 0,03	0,22 ± 0,09	
	Nucleus endopiriformis dorsalis	0,15 ± 0,03	0,23 ± 0,06	*
	Nucleus accumbens	0,13 ± 0,03	0,19 ± 0,06	
	Dorsales Putamen, Nucleus caudatus	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,05	
	Mediales Putamen, Nucleus caudatus	0,12 ± 0,03	0,17 ± 0,06	
	Laterales Septum	0,15 ± 0,03	0,23 ± 0,09	
	Nucleus ruber, Stria terminalis	0,13 ± 0,02	0,20 ± 0,06	*
	Ventrales Pallidum	0,13 ± 0,03	0,19 ± 0,06	*
	Amygdala	0,15 ± 0,04	0,23 ± 0,08	

Struktur	Region	+/+	+/-	Signifikanz
		(fraktionelle Leucin- Inkorporation)	(fractionelle Leucin- Inkorporation)	
Diencephalon	Globus pallidus	0,11 ± 0,03	0,13 ± 0,03	
	Hippocampus	0,13 ± 0,03	0,23 ± 0,07	*
	Gyrus dentatus	0,11 ± 0,04	0,18 ± 0,02	
	Hypothalamus	0,15 ± 0,03	0,22 ± 0,07	
	Anteriore Gruppe des dorsalen Thalamus	0,14 ± 0,04	0,27 ± 0,08	*
	Mediane Gruppe des dorsalen Thalamus	0,17 ± 0,03	0,27 ± 0,09	*
	Mediale Gruppe des dorsalen Thalamus	0,17 ± 0,04	0,29 ± 0,10	*
	Ventraler Thalamus	0,14 ± 0,03	0,18 ± 0,06	
	Ventrale Gruppe des dorsalen Thalamus	0,15 ± 0,03	0,23 ± 0,07	*
	Laterale Gruppe des dorsalen Thalamus	0,15 ± 0,04	0,22 ± 0,05	*
	Nucleus habenularis medialis	0,19 ± 0,04	0,38 ± 0,17	*
	Nucleus habenularis lateralis	0,16 ± 0,03	0,24 ± 0,10	
	Nucleus geniculatus lateralis	0,16 ± 0,03	0,21 ± 0,06	
	Nucleus geniculatus medialis	0,15 ± 0,03	0,24 ± 0,08	*
	Corpora mammillaria	0,16 ± 0,03	0,22 ± 0,07	
Mesencephalon	Nucleus subthalamicus	0,09 ± 0,05	0,13 ± 0,14	
	Nucleus praetectalis	0,16 ± 0,04	0,22 ± 0,07	
	Substantia nigra, pars compacta	0,13 ± 0,03	0,17 ± 0,07	
	Substantia nigra, pars reticulata	0,09 ± 0,04	0,13 ± 0,06	
	Nucleus colliculus superior	0,15 ± 0,03	0,24 ± 0,09	
White matter	Corpus callosum	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,03	
	Capsula interna	0,08 ± 0,06	0,07 ± 0,02	
	Clastrum	0,16 ± 0,06	0,26 ± 0,08	*
	Commissura anterior	0,07 ± 0,05	0,09 ± 0,03	
	Dorsales Tectum	0,13 ± 0,06	0,25 ± 0,15	

Angegeben sind die Mittelwerte der fraktionellen Leucin-Inkorporation mit Standardabweichung (\* p < 0,05).

Tab. 9.2: Cerebrale Durchblutung (CBF) – einzelne Regionen

Gehirnregion	+/+ (ml/g/min)	+/- (ml/g/min)	Signifikanz
Cingulum	1,39 ± 0,3	1,46 ± 0,4	
Motorischer Cortex	0,91 ± 0,2	1,08 ± 0,4	
Sensorischer Cortex	1,27 ± 0,3	1,33 ± 0,4	
Inselrinde	1,41 ± 0,5	1,31 ± 0,3	
Ectorhinaler Cortex	0,91 ± 0,3	1,24 ± 0,2	
Perirhinaler Cortex	1,10 ± 0,4	1,20 ± 0,3	
Visueller Cortex	1,01 ± 0,3	1,12 ± 0,3	*
Nucleus endopiriformis dorsalis	1,16 ± 0,4	1,31 ± 0,5	
Globus pallidus	1,38 ± 0,5	1,55 ± 0,7	
Hippocampus	1,41 ± 0,4	1,49 ± 0,4	
Nucleus habenularis medialis	1,42 ± 0,5	1,51 ± 0,8	
Substantia nigra, pars compacta	1,44 ± 0,3	1,34 ± 0,4	
Corpus callosum	0,68 ± 0,2	0,84 ± 0,2	
Capsula interna	0,77 ± 0,2	1,12 ± 0,6	
Clastrum	1,20 ± 0,4	1,30 ± 0,4	

Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung in ml/g/min (\* p < 0,05).

Tab. 9.3: Gehirnentwicklung der Maus – X-chromosomal gekoppelte Gene

X-gekoppelte Gene, die während der Embryonalentwicklung der Maus im sich entwickelnden Gehirn exprimiert werden (nach Matsuki *et al.*, 2005)

Gen	Abkürzung	Locus	Funktion	Höhepunkt der Expression
Monoaminoxidase A	Maoa	X A2	Bildung und Funktion von Synapsen	E18
Mitglied der Kinesin-Familie 4	Kif4	X C3	Neuritenwachstum und axonale Wegfindung	E12
<b>Zelladhäsionsmolekül L1</b>	<b>L1cam</b>	<b>X A6 – B</b>	<b>Neuritenwachstum und axonale Wegfindung</b>	<b>E18</b>
Ephrin B1	Efnb1	X D	Polarität und Regionalisierung	E12
Doublecortin	Dcx	XF2	Polarität und Regionalisierung	E15
Zinkfingerprotein des Cerebellums 3	Zic3	X A6	Polarität und Regionalisierung	E12
POU-Domäne, Klasse 3, Transkriptionsfaktor 4	Pou3f4	X E1	Determination und Differenzierung	E12
SRY-box containing gene 3	Sox3	X A7.3 – B	Determination und Differenzierung	E12
<i>Nucleosome assembly protein 1-like 2</i>	Nap1l2	X D	Determination und Differenzierung	P0
<i>PCTAIRE-motif protein kinase 1</i>	Pctk1	X A1.3	Determination und Differenzierung	P0
Tetraspanin 7	Tspan7	X A1.3 – A2	Determination und Differenzierung	P0
Melanomantigen der Familie D, 2	Maged2	X F2	Wachstum und Überleben	E18
Pyruvatedehydrogenase E1 alpha 1	Pdha1	X F3 – F4	Wachstum und Überleben	P0
<i>Pregnancy upregulated non-ubiquitously expressed CaM kinase</i>	Pnck	X A7.3	andere	E18

Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte *Mouse Whole Genome Microarray (G4122F)* der Firma Agilent beinhaltet alle aufgelisteten Gene.

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1.....	4
Abb. 1.2: Organisation des X-Chromosoms bei Mensch und Maus.....	5
Abb. 1.3: Schematische Übersicht der extrazellulären Bindungspartner und –domänen von L1 .....	7
Abb. 1.4: „Eingeschlagener“ Daumen. ....	9
Abb. 1.5: Korrelation der Klasse der <i>L1</i> Mutation mit klinischen Befunden.....	12
Abb. 3.1: Schematischer Aufbau eines Northern Blots.....	46
Abb. 4.1: Strategie zur Generierung der <i>L1/tTA</i> Knockout-Maus. ....	65
Abb. 4.2: Northern Blot. ....	66
Abb. 4.3: Quantitative Analyse der <i>L1</i> mRNA Expression .....	67
Abb. 4.4: Immunhistochemische Färbung von <i>L1</i> in Paraffinschnitten. ....	68
Abb. 4.5: Western Blot. ....	70
Abb. 4.6: Western Blot. ....	70
Abb. 4.7: Quantitative Auswertung der Proteinmengen .....	71
Abb. 4.8: Volumen des Gehirns und der Seitenventrikel.....	72
Abb. 4.9: Autoradiographische Analyse hämodynamischer und metabolischer Parameter...	75
Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Schichtung des Cortex.....	76
Abb. 4.11: Immunhistochemische Färbungen .....	77
Abb. 4.12: Quantifizierung der Immunfärbungen.....	78
Abb. 4.13: Immunhistochemische Färbung von Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung.....	79
Abb. 4.14: Neuronale Dichte im sensomotorischen Cortex im zeitlichen Verlauf.....	80
Abb. 4.15: Kortikale Dicke. ....	81
Abb. 4.16: Immunhistochemische Färbungen zum Nachweis proliferierender Zellen.....	82
Abb. 4.17: Quantifizierung proliferierender Zellen in der embryonalen Ventrikulärzone. ....	83

---

Abb. 4.18: Immunhistochemische Färbung zur Quantifizierung apoptotischer Zellen. ....	84
Abb. 4.19: Immunhistochemische Färbung zur Quantifizierung der neuronalen Differenzierung. ....	86
Abb. 4.20: Quantitative <i>Realtime</i> -PCR (qPCR).....	89
Abb. 4.21: Relative Expression der mRNA für die $\alpha$ -Untereinheit der Glykoprotein hormone (CGA). ....	90

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Mit <i>L1</i> Mutationen assoziierte Anomalitäten des Nervensystems .....	11
Tab. 1.2: Vergleich der drei etablierten <i>L1</i> Knockout-Mäuse .....	17
Tab. 3.1: Übersicht der verwendeten Kalibrierungsformeln, Steigungen und Effizienzen der mittels qPCR untersuchten Gene.....	57
Tab. 4.1: Physiologische Parameter .....	74
Tab. 4.2: Blutfluß (CBF), Proteinsynthese (CPS) und pH-Wert des cerebralen Gewebes .....	74
Tab. 4.3: Per Microarray-Analyse zum Entwicklungsstadium P0 identifizierte Gene .....	88
Tab. 9.1: Cerebrale Proteinsynthese (CPS) – einzelne Regionen .....	122
Tab. 9.2: Cerebrale Durchblutung (CBF) – einzelne Regionen .....	124
Tab. 9.3: Gehirnentwicklung der Maus – X-chromosomal gekoppelte Gene .....	125

---

---

## 9.4 Abkürzungen und Einheiten

---

μ	Mikro
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
amp <sub>r</sub>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c.a.	zirka
CAM	Zelladhäsionsmolekül, <i>cell adhesion molecule</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
D	Deutschland
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure (DNS)
<i>E. coli</i>	Escherischia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
ED	Extrazelluläre Domäne, Ektodomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidium Bromid
EtOH	Ethanol

---

---

EZM	extrazelluläre Matrix
FGF	fibroblast growth factor
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
HPR	horseradish-peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICD	Intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LSM	Laser Scanning Mikroskop
M	molar, mol/l
mA	Milliampere
MetOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter

---

---

NB	Northern Blot
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PLL	Poly-L-Lysin
PNS	Peripheres Nervensystem
POMC	Pro-Opiomelanocortin
Prof	Professor
PSA	polysialic acid, Polysialinsäure
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TBS	Tris balanced salt solution/Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>unit</i> , Einheit

---

---

u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
x g	x 9,81 m/s <sup>2</sup>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem, Zentralnervensystem

---

---

## Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	Janinne Sylvie Schmid geboren am 26. Juli 1979 in Nürnberg ledig, keine Kinder
<b>Studium und Schulbildung</b>	
Sept. 1989 – Juli 1998	Willstätter Gymnasium Nürnberg, Abitur
Okt. 1998 – Mai 2004	Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fachrichtung: Biologie, Diplom Hauptfach Humangenetik, Nebenfächer Immunologie, Virologie und Pharmakologie Diplomarbeit am Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen, Abteilung Molekulare Genetik Titel: „Überexpression immunrelevanter Gene im Gastrointestinaltrakt der Tff2 <sup>-/-</sup> -Maus“
<b>Promotion (Dr.rer.nat.)</b>	
Okt. 2004 – März 2009	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen Titel: „Morphologische und funktionelle Analyse heterozygot L1 defizienter Mäuse ( <i>Mus musculus</i> , Linné 1758)“
<b>Auslandsaufenthalte</b>	
Okt. 2002 – März 2003	University of Sussex, Brighton/UK (Socrates/Erasmus)
Feb. – April 1995	Walford Anglican School for Girls, Adelaide/South Australia
<b>Veröffentlichungen</b>	Hargus G, Cui Y, <b>Schmid JS</b> , Xu J, Glatzel M, Schachner M, Bernreuther C. Tenascin-R Promotes Neuronal Differentiation of Embryonic Stem Cells and Recruitment of Host-derived Neural Precursor Cells after Excitotoxic Lesion of the Mouse Striatum. Stem Cells. 2008 May 22. Bernreuther C, Dihné M, Johann V, Schiefer J, Cui Y, Hargus G, <b>Schmid JS</b> , Xu J, Kosinski CM, Schachner M. Neural cell adhesion molecule L1 – transfected embryonic stem cells promote functional recovery after excitotoxic lesion of the mouse striatum. J Neurosci. 2006 Nov 8;26(45):11532-9. Baus-Loncar M, <b>Schmid JS</b> , Lalani el-N, Rosewell I, Goodlad RA, Stamp GW, Blin N, Kayademir T. Trefoil factor 2 (TFF2) deficiency in murine digestive tract influences the immune system. Cell Physiol Biochem. 2005;16(1-3):31-42.
<b>Tagungsbeiträge</b>	17th NECTAR Meeting, Freiburg (2006) TFF Meeting, Strasbourg (2004) Europäische Humangenetik Tagung, München (2004)

---

## Danksagung

Frau Professor Dr. Melitta Schachner danke ich für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die interessante Themenstellung meiner Doktorarbeit sowie Ihr Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. Konrad Wiese danke ich herzlich für die Möglichkeit zu dieser externen Promotion, seine freundliche und unkomplizierte Betreuung.

Darüberhinaus bedanke ich mich bei Dr. Alexander Nikonenko, Professor Dr. Konstantin Hossmann und Professor Dr. Ron Hart für Ihre Beiträge zu dieser Arbeit.

## Außerdem 1000 Dank

Im Labor...

Andrey, Nuray (tercümanlık ettiğin için), Peggy, Emanuela, Iris, Udo, Bettina, Susanne, Fabio, Ellen, Michaela, Karin, Kathrin, Ralf, Dirk, Irm, Thomas Streichert, Dr. Michael Kutsche, allen Tierhaltungen, den Sequenzier-Ladies, Torsten, Fritz, der EDV-Abteilung, Jakob und Professor Markus Glatzel

Ums Labor...

meinem Meister KRIDDE, Gunnar, Quyen, Dänsel, Carinsche, Käptn Gerrit, Miguele, Mounsen, Alex, Jenso, Sandra, Claas, Astrid, Ingo, Nina, Aparni, Elisa, Nils, Isa und Anna

Und ums Labor herum...

Nina, Komal, Michelle, Bini, Jo, Jojo, Tunc, Christl, Verena, Dani, meinem Schwesterherz, ganz besonders meinem Liebsten Christian, Mama und Paps !!!

FÜR HILFSBEREITSCHAFT,  
GEDULD UND EINSATZ,  
FREUNDSCHAFT  
LIEBE

Ohne Euch wäre der steinige Weg um vieles steiniger gewesen!

---