

Zusammenfassung

Summary

English Summary

During development and in plasticity as well as regeneration in the adult central nervous system (CNS), neural cell recognition molecules are expressed in order to mediate cell-cell contacts or the contact between cells and the extracellular matrix (ECM). The tenascins are a substantial family of proteins belonging to the neural recognition molecules. One member with special impact in the CNS is the tenascin-R (TN-R). It contributes to processes of neurite outgrowth and pathfinding. TN-R properties depend on the cell type and the way it is offered as a substrate to the cells. It can be promoting or decreasing neurite outgrowth and in a border-like situation serve as a repellent guiding cue. Furthermore, the interaction with voltage dependent sodium channels at the node of Ranvier, its location around synapses and in perineuronal nets indicate the important role in generation, function and maintenance of the CNS. The unexpected mild phenotype of the mouse deficient for TN-R led to the assumption of compensating effects. Therefore, this work analyzes the altered gene expression in TN-R knock out animals first to detect molecules involved in this balancing process. Dysregulation is detected for several molecules by the microarray technique. The integrin cytoplasmic associated molecule-1 α (ICAP-1 α , bodenin or Itgb1bp1) was investigated more in detail to unravel its role in the compensating mechanism. Its dysregulation is verified by three further methods. A hot spot of ICAP upregulation is the cerebellum as identified through Northern blot analysis and *in situ* hybridization. The cerebellum is a center for controlling, correcting, fine-tuning and learning of movements. Its "output neurons" are the Purkinje cells with dendrites in the molecular layer containing densely packed parallel fibers, the axons of granule cells. Interestingly, these two cell types are strongly positive for ICAP in *in situ* experiments. For Purkinje cells the

upregulation is clearly visible. The ICAP dysregulation is detected at a time point of Purkinje cell arborization, a process where the correct orientation of the dendritic tree is a matter of cell-cell interaction between parallel fibers and the dendrite and an interaction between cells and the altered ECM. The compensation for the missing TN-R is displayed by this ICAP upregulation and its modification of neurite outgrowth, shown in *in vitro* experiments. In these, ICAP deficient embryonic stem (ES) cells are differentiated into neurons. In neurite outgrowth experiments with the ES derived neurons it is shown that TN-R is an outgrowth decreasing molecule for wildtype cells. ICAP deficiency inverses this effect to promoted outgrowth on TN-R. $\beta 1$ integrin is co-expressed in areas of ICAP presence by Northern blot analysis and *in situ* hybridization. Taken together, the findings indicate that neurite outgrowth is integrin mediated and that the integrin binding protein ICAP participates in it. The detected upregulation of this molecule in reaction to the altered ECM of TN-R deficient animals points to compensation effects that participate in maintaining the observed grossly normal histoarchitecture in the CNS of these animals.

Zusammenfassung

Neurale Zellerkennungsmoleküle spielen in der Entwicklung, der Plastizität und in regenerativen Prozessen des zentralen Nervensystems (ZNS) eine wichtige Rolle. Ihre Expression im ZNS dient der Vermittlung von Kontakten zwischen Zellen und von solchen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM). Die Familie der Tenascin Glycoproteine ist eine elementare Gruppe dieser Molekülklasse. Dem Tenascin-R (TN-R) kommt eine besondere Rolle im ZNS zu. Es ist dort an Prozessen beteiligt die das Neuritenwachstum und deren Wegfindung beeinflussen. Die Art der Beeinflussung durch TN-R hängt davon ab in welcher Form es von den Neuriten angetroffen wird. Wenn TN-R als Substratgrenze angetroffen wird, wirkt es abstoßend auf den Neuriten und verhindert somit das Einwachsen. Eine solche Grenze von TN-R dient auch als Leitstruktur, an der Neuriten auf ihrem Weg zum Projektionsziel entlang wachsen. Als Substrat kann TN-R in Abhängigkeit vom Zelltypus eine Neuritenwachstum fördernde oder inhibierende Wirkung entfalten. Diese Beobachtungen und die bekannte Wechselwirkung von TN-R mit spannungsabhängigen Natriumkanälen am Ranvier'schen Schnürring, seine Expression in perineuralen Netzen und um Synapsen unterstreicht die elementare Rolle dieses Moleküls. Es ist dadurch in die Prozesse der Entstehung, der Funktionalität und der Aufrechterhaltung des ZNS involviert. Die Charakterisierung der TN-R defizienten Maus ergab einen unerwartet schwachen Phänotyp, der nur durch Redundanz und Kompensationsprozesse zu erklären ist. Zur Aufklärung welche Moleküle an diesem Prozess beteiligt sein könnten, wird in dieser Arbeit das Expressionsmuster der TN-R defizienten Mausmutante untersucht. Die Erstellung des genetischen Profils dieser Mäuse

erfolgt durch einen sogenannten "microarray". Die beobachtete Dysregulation mehrerer Transkripte wird mit anderen Methoden reproduziert und charakterisiert. Das dysregulierte Transkript des $\beta 1$ Integrin cytoplasmatisch assoziierten Proteins (ICAP-1 α , bodenin oder Itgb1bp1) wird zur Aufklärung seiner Rolle im Kompensationsprozess näher untersucht. Die erhöhte Expression des ICAP Transkripts kann durch drei weitere Methoden bestätigt werden. Durch diese weitergehenden Untersuchungen kann das Kleinhirn als eine Region mit besonderer Auffälligkeit identifiziert werden. Das Kleinhirn ist ein Zentrum der motorischen Kontrolle, Korrektur und Feinabstimmung. Es ist auch in das Erlernen von Bewegungen involviert. Der Ausgang der Informationen erfolgt über die Purkinjezellen des Kleinhirns. Diese Zellen bilden ihre Dendriten in der Molekularschicht aus. In dieser Schicht befinden sich die Axone der Körnerzellen, die hier die Parallelfasern bilden. Im rechten Winkel zu diesen Axonbündeln richtet sich der dendritische Baum der Purkinjezellen aus. Die Ausbildung des Dendriten erfolgt zu dem Zeitpunkt wo die Dysregulation des ICAP Moleküls gefunden wird (P14). Die in der *in situ* Hybridisierung zu beobachtende starke Anfärbung der Purkinjezellen und der Körnerzellschicht weist darauf hin, daß diese Zellen in Reaktion auf die TN-R Defizienz ICAP verstärkt exprimieren. Diese Expression verändert die Eigenschaften des Neuritenwachstums zu diesem kritischen Zeitpunkt, in der in den *in vitro* Experimenten gezeigten Art. Für von embryonalen Stammzellen (ES) abgeleitete Neurone des Wildtyps wirkt TN-R inhibierend auf das Auswachsen der Neuriten. Durch das Unterbinden der ICAP Expression (ICAP knock out Zellen) wird diese Eigenschaft des TN-R's in das Gegenteil umgekehrt - es stimuliert das Neuritenwachstum. Die Arbeit zeigt, daß eine Verbindung zwischen Neuritenwachstum und TN-R besteht. Desweiteren ist auch nachgewiesen, daß das Integrin bindende Protein ICAP nicht nur in Reaktion auf die TN-R Defizienz hochreguliert wird sondern auch einen Einfluß auf das Neuritenwachstum hat. Darüber hinaus kann die räumliche Koexistenz von ICAP und $\beta 1$ Integrin, wie in Northern Blot und *in situ* Hybridisierungen gezeigt, in Kombination mit Erkenntnissen aus den zuvor genannten Experimenten darauf hinweisen, daß das Auswachsen von Neuriten ein Integrin vermittelter Prozess ist. Diese Erkenntnisse geben Einsichten in kompensatorische Prozesse, die zu der kaum veränderten Gewebszusammensetzung in der TN-R defizienten Maus beitragen.