

**Die Familie der neuronalen
Zelladhäsionsmoleküle im Zebrafisch:
Expressionsmuster, Funktion und Glykosylierung**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplombiologe Michael Dietzsch

aus Jena

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Koreferent: Prof. Dr. Uwe Strähle

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02. bis 08.02.2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Bastmeyer, der mir die Möglichkeit gab, dieses interessante Thema im Rahmen einer Dissertation in seinem Labor anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Uwe Strähle danke ich für die Übernahme des Ko-Referates.

Meinen Co-Doktoranden in Freud und Leid Franziska Klein, Roberto Lattanzio und Zhongxiang Jiang möchte ich an dieser Stelle für die angenehme und belebende Atmosphäre im Büro danken. Zusammen haben wir manches Mal gelacht, wenn es auch mal nicht so lief, wie geplant.

In diesem Zusammenhang seien auch Verena Orth, Bernd Schlupeck, sowie Jubin Kashef und Sabrina König aus der institutsübergreifenden Mensarunde erwähnt.

Insbesondere schulde ich André Güllmar einen riesigen Dank für seine unbezahlbare Hilfe aus dem fernen Jena nach dem Absturz meines Rechners und die Wiederherstellung meiner Dissertationsdaten.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung ich meine Promotion nicht in dieser Form hätte durchführen können.

Anne und Lucas Kujat seien an dieser Stelle für ihre Motivation und Ablenkung vor allem in der Phase des Zusammenschreibens erwähnt.

Diese Arbeit widme ich meinem Papa, der den Abschluss meines Studiums und meiner Doktorarbeit leider nicht mehr miterleben konnte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

Abbildungsverzeichnis 4

Tabellenverzeichnis 6

I. Zusammenfassung 7

II. Einleitung 9

 1. Der Zebrafisch als Modellsystem in der Vertebratenforschung 9

 2. Die NCAM-Familie und PSA in der Embryonalentwicklung des Zebrafischs 9

 2.1 Das neuronale Zelladhäsionsmolekül - NCAM 9

 2.2. Das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül - zOCAM 11

 2.3 zPCAM - ein drittes Mitglied der NCAM-Familie 12

 2.4 Die Polysialinsäure - PSA 13

 3. Die Glykosyltransferasen 15

 4. Das Cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE) 16

 4.1 Die STX-mRNA enthält ein CPE 18

 5. PSA-NCAM im sich entwickelnden Nervensystem 19

 6. Propagiertes Modell zum mRNA-Transport in auswachsenden Motoneuronen 22

III. Material und Methoden 24

 1. Material 24

 1.1 Geräte 24

 1.2 Verbrauchsmaterialien 24

 1.3 Chemikalien und Reagenzien 25

 1.4 Enzyme 27

 1.5 Medien, Puffer und sonstige Lösungen 28

 1.6 Primer 33

 1.6.5 Klonierungsprimer 34

 1.7 Morpholinos 34

 1.8 Antikörper 36

 1.9 Fusionsprotein 38

1.10 Versuchstiere.....	38
2. Methoden	38
2.1 Haltung der Versuchstiere	38
2.2 Gewinnung von Embryonen	39
2.3 Aufzucht der Embryonen	39
2.4 Amplifizierung und Klonierung der CAMs	40
2.5 Klonierung der CAM-Fragmente.....	42
2.6 Expressionsanalyse mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung (ISH).....	44
2.7 Morpholino-Injektion	47
2.8 <i>whole mount</i> -Immunfärbung.....	48
2.9 Datenanalyse und Bildbearbeitung.....	52
IV. Ergebnisse.....	53
1. Klonierung der 3'UTRs der CAMs	53
1.1. zNCAM 3'UTR.....	53
1.2 zPCAM 3'UTR	54
1.3 zOCAM 3'UTR.....	54
1.4 zNCAM enthält ein alternatives Exon	55
2. Expressionsanalyse der CAMs mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	57
2.1 Expression von zNCAM und zPCAM.....	57
2.2 Expression von zOCAM	59
2.3 Expression des alternativen zNCAM-Exons	61
3. Analyse der PSA-Expression nach zNCAM-Knockdown	63
4. Überprüfung des zNCAM-Knockdowns auf seine Wirkung	66
4.1 zNCAM/ zPCAM-D3-Kontrolle	66
4.2 zNCAM-Knockdown mit einer Morpholino-Konzentration von 1,25 ng/ nl	67
4.3 zNCAM-Knockdown mit einer Morpholino-Konzentration von 2 ng/ nl	69
5. Weitere Analyse des zNCAM- und zPCAM-Knockdowns.....	71
6. Analyse der PSA-Expression nach zPCAM-Knockdown	73
6.1 Entwicklungsfähigkeit und Überlebensraten der Embryonen	73
6.2 PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen.....	74

7. Doppelknockdown von zNCAM und zPCAM	77
7.1. Überlebensraten	77
7.2 PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen	77
8. Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des CPE-MO-Gemischs	79
9. Fehlerverteilung der Motoraxone nach Morpholino-Injektion	80
9.1 Auswuchsverhalten nach zNCAM-Morpholino-Injektion	81
9.2 Auswuchsverhalten nach zPCAM-MO-Injektion	82
9.3 Auswuchsverhalten nach MO-Gemisch-Injektion	82
10. Gegenüberstellung der PSA-Mengen nach 5'UTR-Morpholino-Injektion.....	83
10.1 Quantifizierung der PSA-Menge mittels Endo:GFP-Fusionsprotein	84
11. Weitere Analyse PSA-exprimierender Strukturen.....	86
11.1 PSA-Expression im otischen Vesikel nach zNCAM-MO-Injektion	86
11.2 PSA-Expression im otischen Vesikel nach zPCAM-MO-Injektion.....	87
11.3 PSA-Expression im otischen Vesikel nach MO-Gemisch-Injektion.....	89
V. Diskussion	91
1. Klonierung der 3'UTRs der drei Zebrafisch-CAMs.....	91
2. Analyse der CAM-Expressionsmuster mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	93
3. PSA-Expression im Rückenmark und den Motoneuronen nach MO-Injektion.....	96
4. PSA-Expression im otischen Vesikel nach MO-Injektion	102
5. Auswirkungen der MO-Injektionen auf die Motoraxone	103
6. Betrachtung evolutionärer Aspekte von zNCAM und zPCAM	104
7. Quantifizierung der PSA-Menge mittels Endo:GFP-Fusionsprotein	105
8. Die mögliche Rolle der CPEBs im Zebrafisch	106
VI. Literaturverzeichnis	110
VII. Anhang.....	116
Abkürzungsverzeichnis.....	116
zNCAM-mRNA-Sequenz	117
zPCAM-mRNA-Sequenz	119
zOCAM-mRNA-Sequenz.....	120
codierende Sequenz von zNCAM mit dem alternativen Exon	122

Vergleich der Proteinsequenzen von zNCAM und zPCAM	123
Lebenslauf.....	129

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bau und Isoformen von NCAM.....	10
Abb. 2: Struktur der drei Zebrafisch-CAMs.....	13
Abb. 3: Modulation der NCAM-Bindungen durch PSA nach Bruses und Rutishauser, 2001	14
Abb. 4: Mechanismus der NCAM-Glykosylierung im Golgi-Apparat nach Angata et al., 2003	15
Abb. 5: CPEB-vermittelte Translationskontrolle nach Mendez und Richter (2001).....	16
Abb. 6: PSA-Expression nach STX-Morpholino-Injektion	19
Abb. 7: Schematische Darstellung der PSA-Expression im Rückenmark.....	20
Abb. 8: klassisches Modell zur PSA-NCAM-Sortierung im ZNS	20
Abb. 9: Modell 1 zur PSA-NCAM Sortierung in den Motoneuronen.....	21
Abb. 10: Modell 2 zur PSA-NCAM Sortierung in den Motoneuronen.....	21
Abb. 11: Modell 3 zur PSA-NCAM Sortierung in den Motoneuronen.....	22
Abb. 12: Hypothetisches Modell zum mRNA-Transport	23
Abb. 13: Lokalisation der zNCAM-Primer	33
Abb. 14: Lokalisation der zPCAM-Primer	34
Abb. 15: Lokalisation der zOCAM-Primer	34
Abb. 16: Morpholinostruktur nach Summerton und Weller (1997).....	35
Abb. 17: Lokalisation der zNCAM-Morpholinos	36
Abb. 18: Lokalisation der zPCAM-Morpholinos	36
Abb. 19: Schematische Darstellung der 3'RACE nach GibcoBRL.....	41
Abb. 20: Schematische Darstellung der zNCAM-mRNA mit ihren 3'UTR-Motiven	53
Abb. 21: Sequenz der zNCAM 3'UTR	53
Abb. 22: Schematische Darstellung der zPCAM-mRNA mit ihrem 3'UTR-Motiv	54
Abb. 23: Sequenz der zPCAM-mRNA mit 3'UTR	54
Abb. 24: Schematische Darstellung der zOCAM-mRNA mit ihren 3'UTR-Motiven.....	54
Abb. 25: Sequenz der zOCAM 3'UTR	55

Abb. 26: Doppelbanden bei der Klonierung der zNCAM 3'UTR	55
Abb. 27: Schematische Darstellung der Insertionsstelle des alternativen zNCAM-Exons	56
Abb. 28: codierende Sequenz von zNCAM mit alternativem Exon	56
Abb. 29: Expression von zNCAM und zPCAM	59
Abb. 30: Expression von zOCAM	61
Abb. 31: Expression des alternativen zNCAM-Exons	62
Abb. 32: Phänotyp nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl) im Alter von 36 hpf.....	63
Abb. 33: Überlebensraten nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)	64
Abb. 34: PSA-Verteilung im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion.....	65
Abb. 35: Statistische Darstellung der PSA-Expression im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)	66
Abb. 36: zNCAM/ zPCAM-D3-Kontrolle.....	67
Abb. 37: D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl).....	68
Abb. 38: Statistische Darstellung der D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)	69
Abb. 39: Phänotyp nach zNCAM-MO-Injektion (2 ng/ nl) im Alter von 36 hpf.....	70
Abb. 40: D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (2 ng/ nl).....	70
Abb. 41: Statistische Darstellung der D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (2 ng/ nl)	71
Abb. 42: Expression von zNCAM und zPCAM im peripheren Nervensystem.....	72
Abb. 43: Phänotyp nach zPCAM-MO-Injektion im Alter von 36 hpf.....	73
Abb. 44: Überlebensraten nach zPCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)	74
Abb. 45: PSA-Verteilung im Schwanz nach zPCAM-MO-Injektion	75
Abb. 46: Statistische Darstellung der PSA-Expression im Schwanz nach zPCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)	76
Abb. 47: Überlebensraten nach Morpholinogemisch-Injektion (je 1,25 ng/ nl).....	77
Abb. 48: Statistische Darstellung der PSA-Expression im Schwanz nach MO-Gemisch-Injektion (je 1,25 ng/ nl)	78
Abb. 49. Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des CPE-MO-Gemischs	80
Abb. 50: Auswuchsverhalten der Motoraxone	81
Abb. 51: Fehlerverteilung der Motoraxone nach zNCAM-MO-Injektion.....	81

Abb. 52: Fehlerverteilung der Motoraxone nach zPCAM-MO-Injektion	82
Abb. 53: Fehlerverteilung der Motoraxone nach Morpholinogemisch-Injektion	83
Abb. 54: Gegenüberstellung der PSA-Mengen nach 5'UTR-MO-Injektion	84
Abb. 55: Quantifizierung der PSA-Menge mittels Endo:GFP-Fusionsprotein	85
Abb. 56: PSA-Expression im otischen Vesikel nach zNCAM-MO-Injektion	86
Abb. 57: Statistische Darstellung der PSA-Expression im otischen Vesikel nach zNCAM-MO-Injektion	87
Abb. 58: PSA-Expression im otischen Vesikel nach zPCAM-MO-Injektion	88
Abb. 59: Statistische Darstellung der PSA-Expression im otischen Vesikel nach zPCAM-MO-Injektion	89
Abb. 60: Statistische Darstellung der PSA-Expression im otischen Vesikel nach MO-Gemisch-Injektion	90
Abb. 61: CPEB2-Expression im Alter von 15 hpf (Huppert, 2006)	107
Abb. 62: CPEB2-Expression im Alter von 36 hpf (Huppert, 2006)	107
Abb. 63: Sequenz der zNCAM-mRNA mit 3'UTR	119
Abb. 64: Sequenz der zPCAM-mRNA mit 3'UTR	120
Abb. 65: Sequenz der zOCAM-mRNA mit 3'UTR	122
Abb. 66: codierende Sequenz von zNCAM mit alternativem Exon	123
Abb. 67: Vergleich der Proteinsequenzen von zNCAM und zPCAM	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendeter ISH-Antikörper	36
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper	37
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper	37
Tabelle 4: Verwendetes Fusionsprotein	38
Tabelle 5: Färbeprotokoll der Immunfärbung	50
Tabelle 6: Permeabilisierungszeiten in Aceton	50
Tabelle 7: Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten nach MO-Injektion	85

I. Zusammenfassung

Neurone und Axone im Zentralnervensystem (ZNS) höherer Vertebraten exprimieren auf ihrer Oberfläche das Kohlenhydratepitop Polysialinsäure (PSA), das Zelladhäsion und Axonfaszikulierung modulieren kann. Im Verlauf der Entwicklung des Zebrafischs findet man unterschiedliche PSA-Expressionsmuster. Während die meisten Neurone des ZNS PSA nur auf ihren Zellkörpern exprimieren, tragen Motoneurone aus dem Rückenmark zusätzlich Polysialinsäure auf ihren Axonen.

Die Polysialinsäure wird im Golgi-Apparat der Neurone von der Glykosyltransferase STX (dreSt8Siall) an ihren bisher einzigen bekannten Akzeptor, das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) geknüpft. Untersuchungen zur STX haben gezeigt, dass deren mRNA in ihrer 3' untranslatierten Region (UTR) ein cytoplasmatisches Polyadenylierungselement (CPE) enthält. Dabei handelt es sich um ein mRNA-Motiv, das unter anderem an der Regulation von mRNA-Transport und lokaler Translation in neuronalen Wachstumskegeln beteiligt ist. Wird dieses CPE durch ein spezifisches Morpholino-antisense-Oligonukleotid (MO) blockiert, lässt sich PSA nur noch auf den Zellkörpern der Motoneurone nachweisen, aber nicht mehr auf ihren Axonen. Dieser Befund weist auf eine subzelluläre Sortierung und Translation der STX-mRNA in den Motoneuronen des Zebrafischs hin. Ob dieser CPE-Mechanismus auch an der Regulation des PSA-Akzeptors NCAM beteiligt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Im Zebrafisch umfasst die NCAM-Familie insgesamt drei Mitglieder: zNCAM, zOCAM und zPCAM. Ihre Expressionsmuster wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung untersucht. zNCAM und zPCAM werden im Gehirn und Rückenmark co-exprimiert, während zOCAM in frühen Stadien der Entwicklung lediglich in der olfaktorischen Plakode nachweisbar ist. Die Klonierung und Sequenzierung der 3'UTRs aller drei CAMs offenbarte jeweils ein CPE in der 3'UTR der zNCAM- und zPCAM-mRNA, aber keines in der von zOCAM.

Mit Kenntnis der Gensequenz und der Sequenz der 3'UTRs von zNCAM und zPCAM wurden spezifische Morpholinos entworfen, die einerseits die Translation der CAM-mRNAs vollständig inhibieren (5'UTR-MOs), sowie den möglichen mRNA-Transport (CPE-MOs) blockieren sollten. Der getrennte Knockdown von zNCAM oder zPCAM führte zu keinen Veränderungen im Phänotyp der Embryonen und auch nur zu einer Reduktion, aber nicht zu einem vollständigen Verlust der PSA-Expression. Offenbar konnte das unverändert exprimierte CAM den Verlust des jeweils anderen kompensieren. Die nach dem einzelnen Knockdown von zNCAM und zPCAM auftretende ungleiche Verringerung der PSA-Menge wurde zusätzlich zur Immunfärbung mit einer Affinitätssonde, einem GFP-markierten, inaktiven PSA-spaltenden Enzym (Endosialidase) quantifiziert. Demnach wird die PSA-Menge nach zNCAM-Inhibition um ca. 60 % und nach Blockade der zPCAM-Translation um ca. 30 % reduziert. Ein Doppelknockdown beider CAMs sollte beide potentiellen PSA-Akzeptoren im Zebrafisch inhibieren, führte aber zum Absterben der Embryonen im Verlauf der Neurulation. Beide Zelladhäsionsmoleküle zusammen sind offensichtlich für die Neuralentwicklung essentiell.

Die Inhibition des vermuteten axonalen Transports der zNCAM- und zPCAM-mRNA durch einen CPE-bindenden Morpholino führte dagegen zu keinen Veränderungen im Phänotyp der Embryonen und der immunhistochemisch nachweisbaren Expression von zNCAM und PSA auf den Motoraxonen. Nachdem der zPCAM CPE-MO einzeln, sowie beide CPE-MOs als Gemisch injiziert wurden, verringerten sich die Überlebensraten der Embryonen deutlich. Dieses Resultat war auf unspezifische Bindungen des zPCAM-CPE-MOs zurückzuführen, da das zPCAM-CPE in einem AT-reichen und damit hochrepetitiven Bereich der mRNA lokalisiert ist und der MO deshalb offenbar zusätzliche AT-haltige mRNA-Sequenzen unspezifisch binden konnte.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde mit zPCAM erstmals ein zweiter Akzeptor für PSA identifiziert. Die Glykosylierung beider CAMs mit PSA, ihre durch *in situ*-Hybridisierung gezeigte Co-Expression im ZNS, sowie ihre Sequenzhomologie von ca. 65 % lassen auf die Duplikation und Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufergen und somit auf funktionelle Gemeinsamkeiten während der Neuralentwicklung des Zebrafischs schließen.

II. Einleitung

1. Der Zebrafisch als Modellsystem in der Vertebratenforschung

Beim Zebrafisch, *Danio rerio* handelt es sich um einen ca. 6 cm langen Zierfisch aus der Familie der Karpfenfische, *Cyprinidae*. Zu Beginn der 1980er Jahre wurde er von George Streisinger als Versuchstier in die Forschung eingeführt und etablierte sich schnell als Modellsystem für die Untersuchung der Entwicklung von Vertebraten. Im Jahr 1996 erzeugte eine Arbeitsgruppe um Christiane Nüsslein-Volhard in Tübingen zahlreiche Mutanten, um diese auf Defekte in ihrer Entwicklung zu untersuchen. Dabei wurden umfangreiche Erkenntnisse zu Ontogenese, Organogenese und Neurogenese gewonnen (Development, Volume 123, 1996). Gerade in der Erforschung unterschiedlichster Aspekte der neurobiologischen Entwicklung von Vertebraten hat der Zebrafisch neben der Maus und *Xenopus laevis* eine führende Rolle eingenommen, weil er sich durch einfache und kostengünstige Haltungsbedingungen und kurze Generationszeiten auszeichnet. Seine Embryonen eignen sich auf Grund ihrer Transparenz bestens für die Erforschung der Nervensystementwicklung.

2. Die NCAM-Familie und PSA in der Embryonalentwicklung des Zebrafischs

2.1 Das neuronale Zelladhäsionsmolekül - NCAM

Im Nervensystem sich entwickelnder Zebrafischembryonen wird unter anderem das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM exprimiert. Hierbei handelt es sich um ein während der Evolution hoch konserviertes zellmembrangebundenes Glykoprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-SF), das in Invertebraten z.B. *Aplysia* (ApCAM) und *Drosophila* (Fasciclin II) und Vertebraten z.B. Zebrafisch, Huhn, Maus, Mensch vorkommt.

Das Huhn und die Maus waren bei den Studien zu NCAM die führenden Modellorganismen, was dazu geführt hat, dass NCAM eines der am besten untersuchten Moleküle des Nervensystems ist. Es ist bekannt, dass es während der Neurogenese exprimiert wird und seine Expression bis ins Erwachsenenalter anhält. Dabei kommt es neben Neuronen auch auf Gliazellen (NgCAM, Edelman, 1986) vor. In der Maus und dem Huhn entstehen durch alternatives Spleißen eines einzelnen Gens drei Isoformen von NCAM (Murray et al., 1986). Entsprechend ihrem Molekulargewicht wurden sie als NCAM180, NCAM140 und NCAM120 benannt. Diese drei Isoformen werden zelltypspezifisch und zeitlich verschieden voneinander exprimiert. Alle drei weisen aber den gleichen Aufbau ihrer extrazellulären Domäne auf, die aus fünf Ig- und zwei Fibronectin III- Domänen besteht. NCAM180 und 140 werden dabei durch eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert und weisen unterschiedlich lange cytoplasmatische Domänen auf, über die sie Signale in die Zelle weiterleiten können. Durch Bindung des FGF-Rezeptors (fibroblast growth factor) an ein NCAM-Dimer wird der Rezeptor phosphoryliert. Im weiteren Verlauf der Signalkaskade wird die Phospholipase C- γ aktiviert, die

ihrerseits wiederum durch Spaltung von Phospholipiden Diacylglycerol (DAG) als second messenger freisetzt (Kiselyov et al., 2005; Maness und Schachner, 2007).

NCAM120 hingegen wird durch einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI) mit der Zellmembran verbunden (Edelman, 1986; Maness und Schachner, 2007).

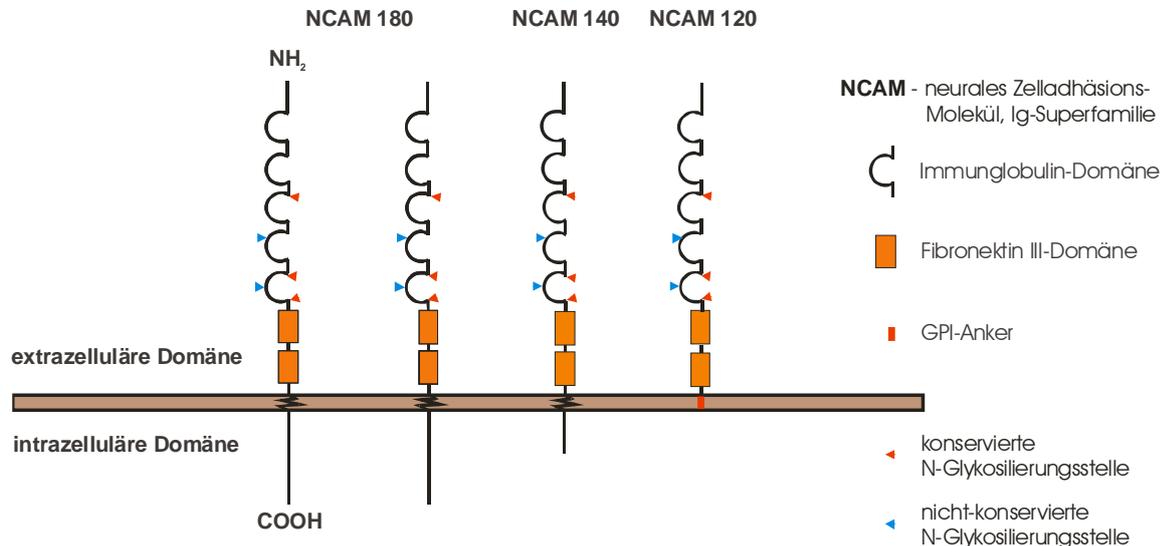


Abb. 1: Bau und Isoformen von NCAM

Durch alternatives Spleißen des NCAM-Gens werden drei verschiedene Isoformen exprimiert: NCAM180, 140 und 120, deren extrazelluläre Domänen den gleichen Bau aufweisen. Sie bestehen je aus 5 Ig- und zwei Fibronectin III- Domänen. NCAM180 und 140 sind über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert und unterscheiden sich in der Länge ihrer cytoplasmatischen Region. NCAM120 wird dagegen durch einen GPI-Anker in der Membran gebunden.

Die Expression von NCAM180 und 140 erfolgt zeitlich und räumlich getrennt. Während NCAM140 in der frühen Neurogenese auf Gliazellen, Wachstumskegeln und Axonschäften auswachsender Neuronen exprimiert wird, erfolgt die Aktivierung von NCAM180 in der späten Entwicklung (Maness und Schachner, 2007). Die Isoform 180 beschränkt sich hier auf postsynaptische Areale reifer Neuronen und Regionen mit Zell-Zell-Kontakten (Persohn et al, 1989). Im Gegensatz dazu kommt NCAM120 vorwiegend auf Gliazellen vor (Maness und Schachner, 2007). NCAM140 ist also offensichtlich während der frühen Neuralentwicklung an Prozessen, wie der Zellmigration und Axonfaszikulation beteiligt, NCAM180 dagegen an später einsetzenden Prozessen, die der Regeneration und Plastizität des Nervensystems dienen, z.B. der Synapsenreifung und -stabilisierung während der „long term potentiation“ im Hippocampus. Generell kann man sagen, dass durch homophile NCAM-Bindungen in der zweiten Ig-Domäne die Adhäsion zwischen Neuronen, das Auswachsen und die Faszikulation von Neuriten im Hippocampus moduliert werden (Rutishauser et al., 1988; Cremer et al, 1997; Bruses und Rutishauser, 2001). Des Weiteren weiß man, dass NCAM nicht nur homophile, sondern auch heterophile Bindungen eingehen kann. So bindet es unter anderem Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) wie Heparan- und Chondroitinsulfatproteoglykane (Cole et al., 1985; Cole und Glaser 1986), Kollagen (Probstmeier et al., 1989) und beeinflusst so die Zellmigration.

Zusätzlich können Wachstumsfaktoren wie BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Vutskis et al., 2001), aber auch der FGF-Rezeptor erkannt und gebunden werden (Williams et al., 1994, Kiselyov et al., 2005).

Auf Grund dieser Bindungseigenschaften von NCAM werden verschiedene Prozesse während der Entwicklung wie Zell- und Axonmigration, Axonwachstum, Bildung von Synapsen und neuronale Plastizität moduliert, indem NCAM Zell-Zell-, Axon-Axon- und Zell-Axon-Kontakte vermittelt. Zeitlebens wird NCAM in Arealen von hoher neuronaler Plastizität wie dem Hippocampus und in Regionen mit neuronaler Regenerationsfähigkeit wie dem olfaktorischen System exprimiert. Hier wandern ein Leben lang neu gebildete Neuronen aus der Subventrikulärzone (SVZ) entlang des „rostral migratory stream“ (RMS) in den *Bulbus olfactorius* ein (Lledo und Lazarini, 2007; Gascon et al., 2007). Mäuse, denen NCAM durch ein Knockout fehlt, haben deutlich verkleinerte Bulbi, was auf eine gestörte Zellmigration schließen lässt (Weinhold et al., 2005).

Die wichtigsten Befunde zu NCAM im Zebrafisch stammen aus der Arbeit von Mizuno et al. (2001). Aus dieser Publikation ist unter anderem die mRNA-Sequenz bekannt, die 16 Exons enthält und für 838 Aminosäuren (AS) codiert. Der Genlocus befindet sich auf Chromosom 21. Durch alternatives Spleißen entstehen auch im Zebrafisch die zwei Isoformen 180 und 140 mit dem typischen Bau der extrazellulären Domäne (Ig- und Fibronectin III-Domänen). Über eine Expression der Isoform 120 im Zebrafisch ist bisher nichts bekannt.

Mizuno et al. haben weiter gezeigt, dass Ig-Domäne 4 durch Expression eines zusätzlichen alternativen VASE-Exons um 10 Aminosäuren verlängert werden kann. Weitere Daten zur Expression von NCAM im Zebrafisch bis ins Alter von 30 hpf stammen ebenfalls aus dieser Publikation. Sie startet im Alter von 11 hpf im Telencephalon, was dem Beginn der Neurulation im Zebrafisch entspricht. Im Verlauf der weiteren Entwicklung nimmt die Expression immer weiter zu, schreitet, ausgehend vom Telencephalon, über das Mes- und Rhombencephalon bis ins Rückenmark fort und erreicht 30 hpf ihren Höhepunkt. In diesem Stadium sind nahezu alle Neuronen des Gehirns und des Rückenmarks NCAM-positiv, was dem bereits bekannten Muster der *Mammalia* ähnelt und die Rolle von NCAM während der Neuralentwicklung unterstreicht.

Neben zNCAM gibt es im Zebrafisch zwei weitere Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie (Mizuno et al., 2001).

2.2. Das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül - zOCAM

Das zweite, relativ umfassend beschriebene Mitglied der NCAM-Familie ist das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül (OCAM) das ebenfalls phylogenetisch stark konserviert ist. Es weist ebenfalls sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeiten mit CAMs der Vertebraten und Invertebraten (apCAM in *Aplysia* und Fasciclin II in *Drosophila*) auf. In der Maus wird es von sensorischen Neuronen in 3 von 4 Zonen (II-IV) des Riechepithels exprimiert und spielt eine wichtige Rolle beim Auswachsen olfaktorischer Projektionen aus dem Riechepithel in das Zielgebiet, den

Bulbus olfactorius (Yoshihara et al., 1997; Hamlin et al. 2004). Durch Ausbildung homophiler Bindungen vermittelt es ebenfalls die Faszikulierung einzelner Neuronen während des Auswachsens und erkennt vermutlich Moleküle des Zielgebietes. Ein Knockout von OCAM stört die Projektion der sensorischen Neurone in die einzelnen Terminationsgebiete des Bulbus, die Glomeruli, aber nicht wesentlich: Hier ist lediglich innerhalb dieser Glomeruli die dendritische und axonale Ordnung gestört, was aber dazu führt, dass eine solche Knockout-Maus besser riechen kann. Vermutlich spielt OCAM hier eine Rolle bei der Organisation und Trennung einzelner axodendritischer und dendrodendratischer Synapsen innerhalb der Glomeruli (Walz et al., 2006).

Aus der Maus ist zusätzlich bekannt, dass zwei verschiedene Verankerungen in der Zellmembran möglich sind. Zum einen kann OCAM über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert sein und zum zweiten über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (Yoshihara et al., 1997; Alenius und Bohm, 2003).

Detailliertere Studien zu OCAM im Zebrafisch stammen ebenfalls von Mizuno et al. (2001). Aus dieser Arbeit stammen beispielsweise die mRNA-Sequenz und das Expressionsmuster. Die Expression von zOCAM setzt im Zebrafisch erst im Alter von 30 hpf und hier auch nur in kleinen Kernen des Riechepithels ein. Wie die Expression im Laufe der Entwicklung weiter voranschreitet ist bisher nicht bekannt.

Auf Basis der mRNA mit ihren, auf Chromosom 9 codierten 18 Exons lässt sich wiederum die Aminosäuresequenz vorhersagen, die 795 AS enthält und zu 41 % der von zNCAM ähnelt. Die Struktur mit fünf Ig- und zwei Fibronektin III-Domänen gleicht ebenfalls der von zNCAM. Die AS-Sequenzen der einzelnen Domänen sind zwischen 33,9 und 48 % zu NCAM homolog.

2.3 zPCAM - ein drittes Mitglied der NCAM-Familie

Aus der Arbeit von Mizuno et al. (2001) stammt das Wissen, dass im Zebrafisch ein weiteres, drittes Mitglied der NCAM-Familie vorkommt. Hierbei handelt es sich um zPCAM. Allerdings sind die Kenntnisse über zPCAM bis zum heutigen Tag noch relativ begrenzt. Bisher sind lediglich seine mRNA-Sequenz und sein Expressionsmuster bis ins Alter von 30 hpf bekannt. So wird es vornehmlich im Gehirn und dem Rückenmark exprimiert und deckt sich dort zu großen Teilen mit der Expression von zNCAM und lässt funktionelle Gemeinsamkeiten vermuten. Wie auch in zNCAM wird durch alternatives Spleißen in der vierten Ig-Domäne das so genannte VASE-Exon exprimiert, das in zPCAM zwei verschiedene Längen aufweisen kann.

Ein Vergleich der mRNA- und Aminosäuresequenzen mit anderen Spezies der Vertebraten (z.B. Mensch, Maus, Huhn usw.) zeigt Homologien zu NCAM. Lediglich im Kugelfisch *Tetraodon nigroviridis* lässt sich ein zu zPCAM homologes, bisher unbenanntes Protein finden, das eine Sequenzhomologie von 62,7 % zu zPCAM aufweist (eigene Untersuchungen). PCAM scheint also während der Evolution der Vertebraten frühzeitig verloren gegangen zu sein und wurde nicht konserviert.

Auf Basis der publizierten mRNA-Sequenz lassen sich weitere Aussagen zu seiner Lokalisation im Genom (Chromosom 15) und seinem Bau treffen, der dem von zNCAM gleicht. Die zPCAM-mRNA enthält 22 Exons und codiert für 1031 Aminosäuren aus denen ebenfalls fünf Ig- und 2 Fibronectin III-Domänen, sowie eine cytoplasmatische Region aufgebaut werden. Über eine Transmembrandomäne ist zPCAM ebenfalls in der Zellmembran verankert.

Nach einem Vergleich der Aminosäuresequenzen lassen sich Aussagen über die Verwandtschaft von zNCAM und zPCAM treffen. So gleichen sich beide in ihrer kompletten AS-Sequenz zu 66 %, die einzelnen Domänen haben jeweils Ähnlichkeiten zwischen 55 und 69 % (Ig1: 63,2 %, Ig2: 69,1 %; Ig3: 62 %; Ig4: 67,9%; Ig5 63 % FNIII 1: 60,6 % und FNIII 2: 55 %).

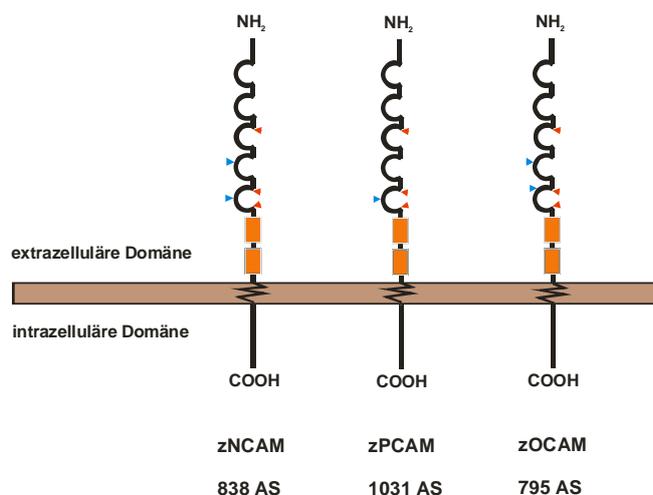


Abb. 2: Struktur der drei Zebrafisch-CAMs

Die drei CAMs aus dem Zebrafisch weisen die gleiche extrazelluläre Struktur auf: Alle bestehen aus fünf Ig- und zwei Fibronectin III-Domänen und exprimieren drei konservierte N-Glykosylierungsstellen. Strukturelle Unterschiede finden sich hauptsächlich in der cytoplasmatischen Domäne, deren Länge sehr verschieden sein kann.

2.4 Die Polysialinsäure - PSA

In Kapitel II.2.1 wurde auf die enorme Bedeutung von NCAM während der embryonalen Neuralentwicklung eingegangen. Doch diese entscheidende Rolle wird nicht alleine von NCAM getragen. Stattdessen kommt einer N-Glykosylierung an zwei Glykosylierungsstellen innerhalb der fünften Ig-Domäne diese zusätzliche Funktion zu (Abb. 2). An diese, innerhalb der Vertebraten hoch konservierten N-Glykosylierungsstellen, wird das lineare Homopolymer Polysialinsäure (PSA) geknüpft, das aus α -2,8 verknüpften N-Acetyl-Neuraminsäureresten besteht. Dieses negativ geladene Kohlenhydratepitop kann Ketten mit Längen von mehr als 100 Monomeren aufweisen (Angata et al., 1997). Katalysiert wird diese NCAM-Modifikation im Golgi-Apparat von den zwei membranständigen Polysialyltransferasen ST8SialI (STX) und ST8SialIV (PST) (vgl. Kapitel II.3; Angata und Fukuda, 2003). Mit PSA glykosyliertes NCAM wird im Folgenden nur noch als PSA-NCAM bezeichnet.

Das beschriebene PSA-Epitop moduliert aufgrund seiner sterischen Eigenschaften homophile, wie auch heterophile Bindungen von NCAM in *cis* und *trans* (Abb. 3) (Rutishauser, 1996). Allein durch seine räumliche Ausdehnung bildet PSA eine Art Hülle um NCAM und verhindert so das Zustandekommen von Bindungen zwischen Zellmembranen zweier Zellen, Bindungen einer Zelle an die extrazelluläre Matrix oder auch Bindungen zwischen NCAM und anderen Faktoren, z.B. FGF-Rezeptoren, innerhalb einer Zellmembran (Bruses und Rutishauser, 2001).

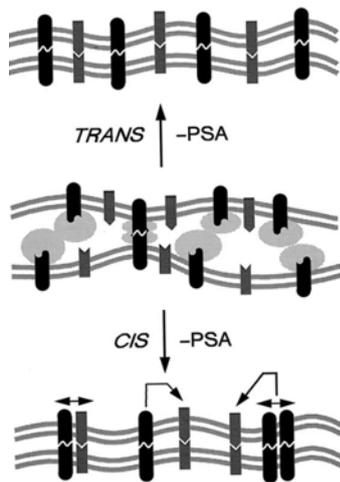


Abb. 3: Modulation der NCAM-Bindungen durch PSA nach Bruses und Rutishauser, 2001

Gezeigt ist ein Modell zur Modulation von NCAM-Bindungen in *cis* und *trans* durch die sterischen Eigenschaften der PSA.

Durch diese Eigenschaft der PSA wird beispielsweise die Faszikulation und Defaszikulation von auswachsenden Axonen moduliert. Ein Prozess der unter anderem bei der Entstehung motoraxonaler Projektionen während der Neurogenese im Huhn (Tang et al., 1992, 1994) und der Maus (Boisseau et al., 1991) essentiell ist.

Es ist denkbar, dass PSA auch im Zebrafisch einen Einfluss auf die Entwicklung motoraxonaler Projektionen hat, da Motoneurone (MN) PSA-NCAM exprimieren (vgl. Kapitel II.5). Die Kenntnisse über die Entwicklung und das Auswachsen von Motoneuronen im Zebrafisch sind sehr umfangreich. So weiß man, dass die Muskeln jedes Somiten durch zwei Gruppen von Motoneuronen innerviert werden: primäre und sekundäre (Myers et al.; Westerfield et al., 1986). Die Gruppe der primären Motoneurone besteht aus drei einzelnen Zellen, die zeitlich voneinander getrennt auswachsen. Das erste Neuron, das im Alter von ca. 17 hpf aus dem Rückenmark auswächst, ist das CaP (caudal primary), gefolgt von den anderen beiden Motoneuronen MiP (middle primary) und RoP (rostral primary) (Myers et al., 1986; Eisen, 1991). Die Axone der CaPs und RoPs wachsen hier in jedem Segment entlang der gleichen, stereotypen Pfade in die ventralen Bereiche der Somiten ein, wohingegen die MiPs nach dorsal projizieren. Fünf bis sechs Stunden später beginnt das Auswachsen der sekundären Motoneurone entlang der Axone der drei zu diesem Zeitpunkt bereits etablierten primären Trajektorien.

Eine mögliche Rolle der PSA bei diesem Prozess wurde aber bisher im Zebrafisch noch nicht untersucht.

3. Die Glykosyltransferasen

Studien zur Verteilung und Funktion der NCAM glykosylierenden Enzyme, den Polysialyltransferasen, in der Maus haben zwei verschiedene, funktionell aktive Transferasen identifiziert. Dabei handelt es sich einerseits um STX (ST8SialI) und andererseits um PST (ST8SialIV) (Angata und Fukuda 2003). Beide kommen im Nervensystem membrangebunden im Golgi-Apparat eines jeden Zellkörpers vor. (Abb. 4).

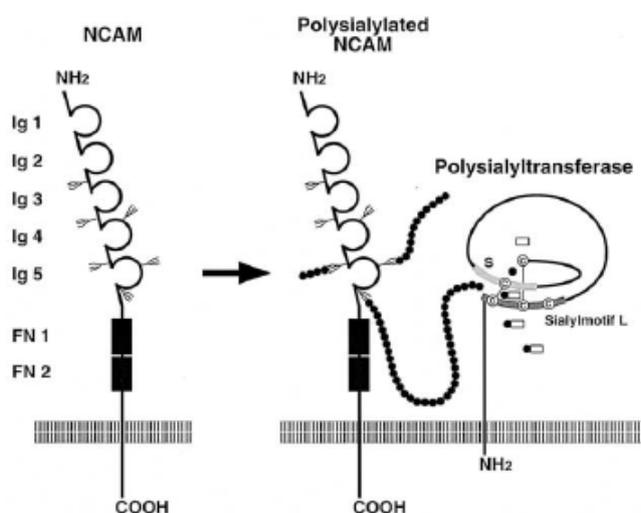


Abb. 4: Mechanismus der NCAM-Glykosylierung im Golgi-Apparat nach Angata et al., 2003

Die membrangebundenen Sialyltransferasen synthetisieren mittels ihres katalytischen Zentrums, bestehend aus Sialylmotiv S und L, unter Verbrauch von CMP die Sialinsäuremonomere (CMP-NeuNAc) an die zwei N-Glykosylierungsstellen der 5. Ig-Domäne und bauen das lineare PSA-Polymer auf. C – C –Disulfidbrücken, ψ – N-Glykosylierungsstellen, ● Sialinsäuremonomere (NeuNAc), ◻ CMP-NeuNAc

Beide Transferasen sind innerhalb der Vertebraten hoch konserviert und werden während der Entwicklung zeitlich dynamisch reguliert. Während STX hauptsächlich in der frühen Neurogenese exprimiert wird, lässt sich PST vorwiegend in späteren Stadien und dem erwachsenen Organismus nachweisen (Becker et al., 1996; Hildebrandt et al., 1998). Im Adulten beschränkt sich das Vorkommen der PST und damit der von ihr synthetisierten PSA auf Regionen des Nervensystems, die einer andauernden Plastizität unterworfen sind. Beispiele hierfür sind der Hippocampus, aber auch das olfaktorische System mit seiner fortlaufenden Regeneration von Neuronen (Rutishauser, 1998; Cremer et al., 2000).

Im Zebrafisch stellt sich die Situation ähnlich dar wie in der Maus. Auch hier kommen die beiden bereits bekannten Glykosyltransferasen STX (dreST8SialI) und PST (dreST8SialIV) vor.

Allerdings unterscheiden sich die transkriptionellen und funktionellen Aspekte beider Proteine von denen der Maus. STX ist im Zebrafisch das einzige Enzym, das während der Embryonalentwicklung und auch im erwachsenen Fisch die Reaktion zwischen PSA und NCAM katalysiert. Seine Expression beginnt bereits früh in der Entwicklung im Blastulastadium und intensiviert sich im Laufe der Entwicklung. Auch wenn sich STX-mRNA durch reverse Transkriptase/ RT-PCR und *in situ*-Hybridisierungen so früh nachweisen lässt, setzt eine PSA-Expression aber erst im Alter von 17 hpf ein. PST dagegen wird während der gesamten Entwicklung nur schwach exprimiert und zeigt auch nur eine niedrige Affinität für NCAM (Marx et al., 2007).

4. Das Cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE)

Bei dem hier vorgestellten cytoplasmatischen Polyadenylierungselement (CPE) handelt es sich um ein Motiv in der 3' untranslatierten Region von mRNAs mit der Consensussequenz UUUUUAU. Dieses Motiv wurde erstmals in *Xenopus* Oocyten entdeckt und seine Funktion bei der Lokalisation und Regulation der Expression maternalen mRNA, z.B. Cyclin B1-mRNA, innerhalb des Eis aufgeklärt. In diesem Fall hat es die Funktion, nicht benötigte mRNAs in einem für die Translation inaktivem Zustand zu halten. Dafür wird das CPE von einem Protein gebunden (CPEB – CPE bindendes Protein; ein Zinkfinger- und „RNA recognition motif“ enthaltendes Protein, Hake et al., 1998), das wiederum mit einem weiteren Protein (Maskin) interagiert. Maskin bindet den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF-4E) in der mit einer Methyl-Kappe versehenen 5' untranslatierten Region der mRNA. Dadurch wird die Initiation der Translation inhibiert, weil der Initiationskomplex durch die Blockade des eIF-4E nicht vervollständigt werden kann (Stebbins-Boaz et al., 1999).

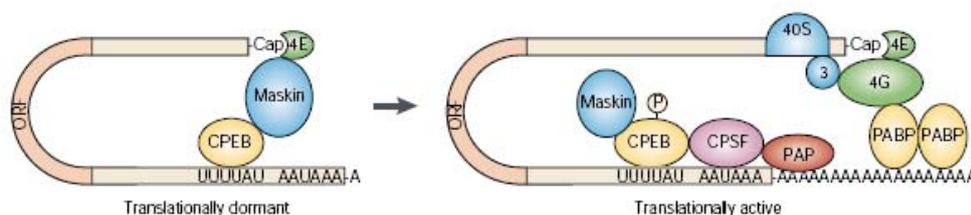


Abb. 5: CPEB-vermittelte Translationskontrolle nach Mendez und Richter (2001)

Im unreifen Ei wird inaktive mRNA vom CPE-bindenden Protein (CPEB) gebunden, das wiederum im Komplex mit Maskin und eIF-4E die mRNA maskiert. Während der Reifung des Eis wird CPEB phosphoryliert, bindet den „cleavage and polyadenylation specificity factor“ (CPSF), der daraufhin die Poly(A)-Polymerase rekrutiert, wodurch der Poly(A)-Schwanz verlängert wird. Gleichzeitig dissoziiert Maskin vom eIF-4E, woraufhin eIF-4G bindet, einen stabilen Komplex mit dem Poly(A)-bindenden Protein bildet und der Initiationskomplex vervollständigt werden kann.

Die Translation der maternalen mRNA in den Oocyten wird durch ein Progesteronsignal angeschaltet. Durch dieses Signal wird die Aurorakinase Eg2, eine Serin/ Threonin-Kinase,

aktiviert, die daraufhin das CPEB phosphoryliert. Anschließend bindet der „Cleavage Polyadenylation Specificity Factor“ (CPSF, ein Komplex aus 4 weiteren Proteinen (Dickson et al., 2001)) das 20-30 Basen downstream vom CPE liegende Hexanukleotid AAUAAA. Danach bindet die Poly(A)-Polymerase an CPSF und verlängert den Poly(A)-Schwanz der mRNA auf ca. 150 Nukleotide (Mendez und Richter, 2001; Dickson et al., 2001; Richter 2001 und 2007). Zeitgleich dazu dissoziiert Maskin vom phosphorylierten CPEB und kann nun nicht mehr an eIF-4E binden (Cao und Richter, 2002). Daraufhin setzt sich der Initiationskomplex aus eIF-4G, eIF-3 und der 40S Ribosomenuntereinheit zusammen. Dieser Komplex wird durch eine zusätzliche Bindung zwischen dem Poly(A)-bindenden Protein (PAP) und eIF-4G stabilisiert und konkurriert wahrscheinlich mit Maskin um die freie Bindungsstelle am eIF-4E. Durch diese beiden Schritte wird die mRNA in einen für die Translation aktiven Zustand versetzt und kann nun translatiert werden. Neuroguidin, ein im Nervensystem der Säuger vorkommendes und dem Maskin ähnliches Protein, wurde von Jung et al. (2006) beschrieben. Es bindet ebenfalls CPEBs und eIF-4E und kann auf diese Weise die Translation von Proteinen inhibieren.

Brittis et al. (2002) haben gezeigt, dass im Huhn ein solches CPE-Motiv in der mRNA des Ephrin A2-Rezeptors (EphA2) vorkommt. Dieser Rezeptor wird in den Zellkörpern von Neuronen des Rückenmarks exprimiert, die auf die kontralaterale Seite des Rückenmarks projizieren. Hat das Axon eines solchen Neurons die Mittellinie erreicht oder sie überquert, wird die Expression des Rezeptors in seinem Wachstumskegeln angeschaltet. Brittis et al. haben gezeigt, dass für den Transport dieser Rezeptor-mRNA aus dem Zellkörper in das Axon das CPE verantwortlich ist. Wurde das CPE durch eine Punktmutation und damit der Transport der mRNA inaktiviert, wurde die mRNA nicht transportiert und EphA2 ließ sich nur noch in den Zellkörpern und nicht mehr in den Wachstumskegeln nachweisen. Wurde die EphA2-mRNA hingegen durch einen zusätzlich angefügten Poly(A)-Schwanz künstlich aktiviert, erfolgte die EphA2-Expression ubiquitär im ganzen Axon.

Weitere Kenntnisse zur CPE-Nutzung in Neuronen stammen von Wells et al. (2001). Hier wurde sein Einfluss auf die Expression der α -Untereinheit der Calcium/ Calmodulinkinase II (Ca/CaMKII) im visuellen Cortex der Ratte in Abhängigkeit vom N-Methyl-D-Aspartat/ NMDA-Rezeptor gezeigt. In Dunkelheit aufgezogene Ratten wurden einem Lichtstimulus ausgesetzt, der zu einer CPE-abhängigen Aktivierung der bereits in den Synapsen des visuellen Cortexes vorhandenen Ca/ CaMKII-mRNA führte. Die Blockade des NMDA-Rezeptors durch einen Antagonisten (APV) resultierte nicht in einer Steigerung der Ca/ CaMKII-Translation und damit der Proteinmenge. Ähnliche Ergebnisse zur CPE-vermittelten Ca/ CaMKII-Expression in Neuronen des Maushippocampus wurden von Huang et al. (2003) publiziert. Aus dem Jahr 2004 stammen Befunde, die eine Ca/ CaMKII-abhängige Phosphorylierung des CPEBs propagieren (Atkins et al., 2004). In diesem Fall wurde gezeigt, dass die notwendige CPEB-Phosphorylierung im Hippocampus während der „long term potentiation“ durch die Ca/ CaMKII erfolgt (vgl. Wells et al., 2000; Mohr und Richter 2000; Richter 2007).

Im Schluss würde das eine Art autoregulatorischen Mechanismus bei der Ca/ CaMKII-Expression vermuten lassen.

Der hier beschriebene Prozess der CPE/ CPEB-abhängigen Translationsinitiation scheint nicht im Cytosol der einzelnen Neurone abzulaufen, sondern erfolgt offenbar membrangebunden. Cao et al. (2005) haben einen membranständigen Komplex aus CPEB, Maskin und CPSF isoliert, der an Amyloidprecursor-like-Protein 1 und 2 (ALP1 und ALP2) und am Amyloidprecursor Protein (APP) gebunden vorliegt. Mitglieder der APP-Familie scheinen also als Membrananker für den Proteinkomplex zu fungieren, der für die lokale mRNA-Polyadenylierung und -translation benötigt wird. Diese hier vorgestellten Daten beschränken sich bisher nur auf Kenntnisse aus *Xenopus*-Oocyten und dem Nervensystem der Maus bzw. Ratte.

Über eine mögliche Funktion des CPE/ CPEB-Komplexes im Zebrafisch ist bisher nur bekannt, dass vier verschiedene, zeitlich unabhängig voneinander exprimierte CPEBs vorkommen, CPEB 1-4 (Huppert, 2006). CPEB1 wird nur maternal exprimiert, CPEB2 hauptsächlich in Teilen des Vorder-, sowie Mittel- und Hinterhirns, CPEB3 maternal und erst in Stadien > 20 hpf in Somiten und Myosepten. Im Gegensatz dazu kommt CPEB4 während der ganzen Embryonalentwicklung vor und konzentriert sich ab 20 hpf im Gehirn sowie den Rohan-Beard-Neuronen im Rückenmark. Auf Grund dieser Befunde lässt sich zumindest in Teilen des Zebrafischnervensystems eine CPE-abhängige Translationskontrolle vermuten.

4.1 Die STX-mRNA enthält ein CPE

Eingehendere Untersuchungen zur Funktionen der STX mit Hilfe der Antisense-Oligonukleotidtechnik haben weitere Erkenntnisse hervorgebracht. Eine Inhibition der STX-Expression durch Injektion eines spezifischen Morpholinos (MO), der an die 5' untranslatierte Region der STX-mRNA bindet, führt zu einem kompletten Verlust der PSA-Expression im Zebrafischembryo (Abb. 6E). Dieser STX-Knockdown resultiert in einer Defaszikulierung von Axonen der posterioren Kommissur bzw. zu einem Stoppen dieser Axone an der Mittellinie (Marx et al., 2007). Ein ähnlicher Effekt lässt sich durch die Injektion von EndoN, einer PSA-spaltenden Endoneuraminidase, induzieren. Auch hier lässt sich anschließend keine PSA mehr im Embryo nachweisen und die posteriore Kommissur zeigt die gleichen Wachstumsdefizite (Marx et al., 2001).

Die Klonierung und Sequenzierung der STX-mRNA hat die Existenz eines cytoplasmatischen Polyadenylierungselementes (CPE) in seiner 3' untranslatierten Region gezeigt. Bei diesem CPE handelt es sich um das bereits beschriebene Sequenzmotiv, das für eine Kontrolle von mRNA-Transport und lokaler Translation verantwortlich gemacht wird (vgl. Kapitel II.4).

Wird dieses CPE und damit der mögliche Transport der STX-mRNA mittels eines CPE-spezifischen Morpholinos blockiert, führt das zu einer fehlenden PSA-Expression auf den Axonen der Motoneurone (Abb. 6F; Marx, unpublizierte Daten). Die PSA-Expression im Rückenmark bleibt davon aber unberührt.

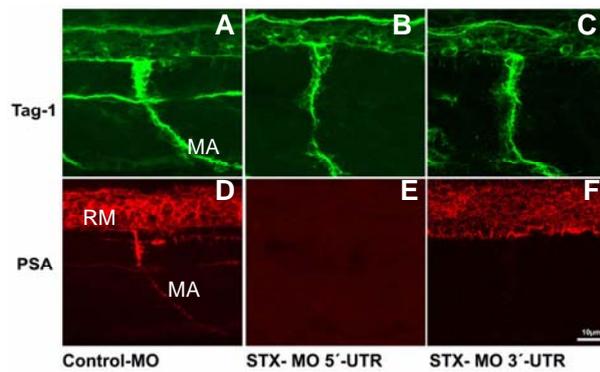


Abb. 6: PSA-Expression nach STX-Morpholino-Injektion

Die Abbildungen A-C zeigen in der Gegenfärbung Tag-1 gefärbte Motoneurone. Abbildung D zeigt die PSA-Expression nach Injektion des Kontroll-MOs im Rückenmark (RM) und auf den Motoraxonen (MA). (E) Nach Inhibition der STX-Expression lässt sich keine PSA mehr nachweisen (F). Blockade des STX-mRNA-Transports durch Injektion des 3'UTR-MOs führt zu einer fehlenden PSA-Expression auf den Motoraxonen.

Dieser hier vorgestellte Befund impliziert ein neues Modell zum mRNA-Transport und zur Prozessierung von Proteinen in Axonen (vgl. Kapitel II.6).

5. PSA-NCAM im sich entwickelnden Nervensystem

Die beiden N-Glykosylierungsstellen, wie sie in der 5. Ig-Domäne von NCAM vorkommen, sind ebenfalls in zOCAM und zPCAM konserviert. Es könnte also auch PSA an zOCAM und zPCAM gebunden vorliegen.

Somit ergibt sich für diese Arbeit ein neuer, zusätzlicher Experimentieransatz, die PSA-Expression im Zebrafisch zu untersuchen (vgl. Kapitel II.6).

Während der Embryonalentwicklung des Zebrafischs treten zwei verschiedene Glykosylierungsmuster im Nervensystem auf: Die meisten Neurone des Zentralnervensystems (ZNS) tragen PSA lediglich auf ihren Zellkörpern. Die einzigen Ausnahmen hiervon sind die Cranialnerven V, VII, IX und X, sowie die posteriore Kommissur im Gehirn, die PSA auch auf ihren Axonen exprimieren (Marx et al., 2001). Ein ähnliches PSA-Muster wie im Gehirn findet sich im Rückenmark. Auch hier sind lediglich die Zellkörper der Interneurone und kommissuralen Neurone PSA-positiv. Einzig die Motoneurone exprimieren PSA sowohl auf ihren Zellkörpern und ihren, in das periphere Nervensystem (PNS) projizierenden Axonen (Abb. 7).

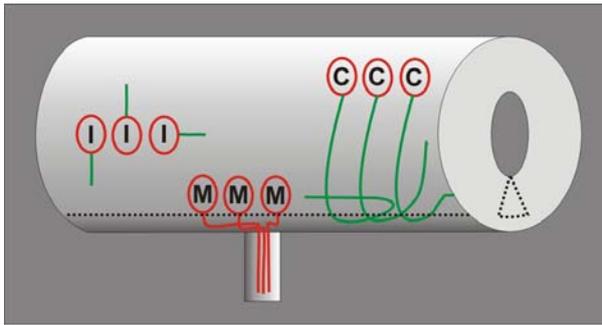


Abb. 7: Schematische Darstellung der PSA-Expression im Rückenmark

Interneurone (I) und commissurale Neurone (C) exprimieren PSA lediglich auf ihren Zellkörpern (rot). Motoneurone (M) hingegen exprimieren PSA auf den Zellkörpern und ihren Axonen.

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Glykosylierungsmuster von Axonen im ZNS und PNS ist die posttranslationelle Sortierung von Proteinen durch den Golgi-Apparat, in diesem Fall von NCAM und PSA-NCAM. Im klassischen Lehrbuchmodell erfolgt die Sortierung von Proteinen nach der Prozessierung im Golgi-Apparat. Dafür trägt jedes Protein eine spezifische „Adresse“ für seine korrekte Positionierung innerhalb der Zelle. Diese Adresse wird von einer speziellen Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins codiert und sorgt so für die Sortierung des Proteins. Im Fall der Neurone des ZNS würde das bedeuten, dass glykosyliertes NCAM ein Signal für seine Positionierung in den Membranen des Somas enthält und unglykosyliertes NCAM für seine Lokalisation in den Axonen der Neurone (Abb. 8).

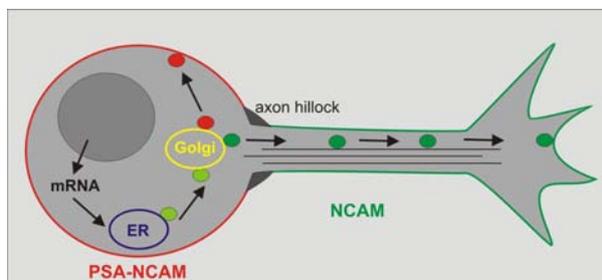


Abb. 8: klassisches Modell zur PSA-NCAM-Sortierung im ZNS

Nach seiner Translation im endoplasmatischen Retikulum und der anschließenden Prozessierung im Golgi-Apparat wird PSA-NCAM durch ein spezielles „Adress-Signal“ in die Membran des Somas eingebaut, während unglykosyliertes NCAM durch ein anderes Signal in den Wachstumskegel transportiert und in die Membran eingebaut wird.

Zusätzlich ist bekannt, dass der Axonhügel als Instanz bei der Verteilung von Proteinen aber auch RNAs aus dem Soma in das Axon eines Neurons dienen kann. So können beispielsweise im Bereich des Axonhügels vorkommende Chaperone andere Proteine binden und ihre Verteilung innerhalb eines Neurons beeinflussen (Monshausen et al., 2001; Hu et al., 2003). Dieses Modell der Proteinsortierung am Axonhügel ist auch für die Verteilung von glykosyliertem und nicht-glykosyliertem NCAM im ZNS des Zebrafischs vorstellbar. PSA-NCAM würde nach seiner Prozessierung im Golgi-Apparat am Axonhügel zurückgehalten und nur im Zellkörper in

die Membran integriert. Unglykosyliertes NCAM kann dagegen den Axonhügel passieren, wird in den Wachstumskegel transportiert und dort in die Membran eingebaut.

Für eine Expression von PSA auf Zellkörpern und Axonen der Motoneurone sind drei verschiedene Erklärungen denkbar.

Modell 1 geht von einer ähnlichen NCAM/ PSA-NCAM-Verteilung wie im ZNS aus: Im Bereich des Zellkörpers wird die glykosylierte zNCAM-Form exprimiert und in die Membranen integriert, im Bereich des Axons lediglich die PSA-freie zNCAM-Variante. Die zweite Annahme dieses Modells ist das Fehlen des Axonhügels in den Motoneuronen, wodurch eine von ihm kontrollierte Sortierung der beiden zNCAM-Formen wie im ZNS nicht mehr möglich wäre. Folglich würde auch glykosyliertes zNCAM in die Axone der Motoneurone transportiert werden und in der Folge wäre ein Gemisch aus zNCAM und PSA-NCAM in den Axonen vorhanden (Abb. 9).

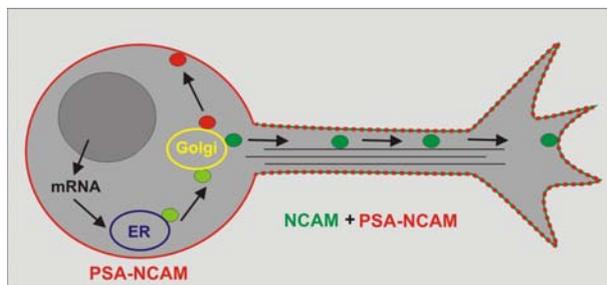


Abb. 9: Modell 1 zur PSA-NCAM Sortierung in den Motoneuronen

Motoneuronen fehlt in diesem Modell der Axonhügel, was zur Folge hat, dass die Sortierung nicht wie im ZNS gewährleistet ist. Neben unglykosyliertem NCAM würde auch die glykosylierte Form ins Axon transportiert und in die Membranen eingebaut werden kann. Folglich käme hier ein Gemisch beider Formen vor.

Modell 2 geht davon aus, dass im kompletten Motoneuron nur glykosyliertes zNCAM exprimiert wird. Nach der Translation von zNCAM im ER und der anschließenden Prozessierung im Golgi-Apparat wird PSA-NCAM durch ein entsprechendes Signal in der Proteinsequenz gleichmäßig auf Soma und Axon mit Wachstumskegel verteilt und in die Membranen integriert (Abb. 10).

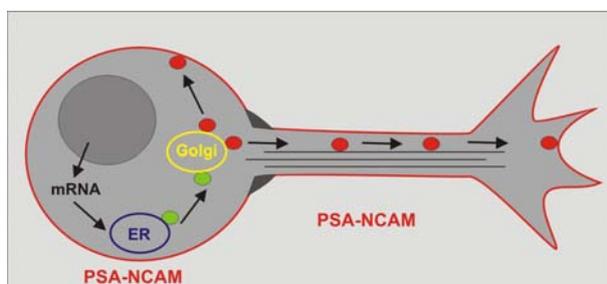


Abb. 10: Modell 2 zur PSA-NCAM Sortierung in den Motoneuronen

Nach seiner Translation wird zNCAM im Golgi-Apparat mit PSA glykosyliert, anschließend durch ein entsprechendes Signal in der Proteinsequenz gleichmäßig auf Zellkörper und Axone verteilt und in die Membranen integriert.

Das dritte Modell propagiert einen Transport der zNCAM-mRNA in das Axon bzw. den Wachstumskegel eines auswachsenden Motoneurons. Demnach erfolgt im Soma die NCAM-Translation sowie seine anschließende Glykosylierung mit PSA auf dem klassischen Weg über ER und Golgi-Apparat. PSA-NCAM enthält in diesem Fall eine Aminosäuresequenz, die es im Soma lokalisiert und wird dementsprechend auch nur in die Membran des Zellkörpers integriert. Im Gegensatz dazu wird die zNCAM-mRNA aus dem Soma in die Wachstumskegel transportiert und erst dort translatiert. Teile der zNCAM-Population könnten anschließend glykosyliert werden, wodurch es theoretisch möglich wäre, dass PSA-NCAM und unglykosyliertes zNCAM nebeneinander in den Membranen des Axons vorkommen.

Wenn diese Vorstellung der PSA-Expression auf den Axonen der Motoneurone korrekt ist, impliziert das die Existenz eines Golgi-Apparates oder zumindest einer Golgi-ähnlichen Struktur im Wachstumskegel (vgl. Kapitel II.6).

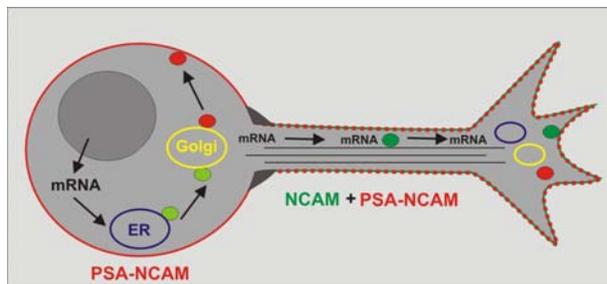


Abb. 11: Modell 3 zur PSA-NCAM Sortierung in den Motoneuronen

Dieses Modell propagiert den Transport der zNCAM-mRNA in die Axone der Motoneurone, die anschließend im Wachstumskegel translatiert wird. Teile der zNCAM-Population würden glykosyliert. PSA-NCAM und zNCAM kämen so nebeneinander in den Axonmembranen vor.

Das hier vorgestellte, dritte Modell beruht auf den Befunden zur Glykosyltransferase STX, deren mRNA in die Wachstumskegel von Motoneuronen transportiert wird (vgl. Kapitel II.4.1).

6. Propagiertes Modell zum mRNA-Transport in auswachsenden Motoneuronen

Die Kombination der oben beschriebenen Vorkenntnisse führte zu der folgenden Arbeitshypothese:

Im Zebrafisch ist es möglich eine PSA-Expression auf den Motoraxonen durch Hemmung des CPE-vermittelten STX-mRNA-Transports mit dem entsprechenden Morpholino zu inhibieren. Die mRNA der Glykosyltransferase STX kann also offenbar in verschiedene Kompartimente einer Zelle transportiert werden und wird erst in ihrem Zielgebiet translatiert.

Auf dieser Kenntnis basierend stellt sich die Frage nach den Akzeptoren der von der STX transferierten PSA, in diesem Fall zNCAM und evtl. auch zOCAM und zPCAM. Wird deren mRNA

auch in das auswachsende Axon transportiert, dort translatiert und die CAMs anschließend von der STX prozessiert?

Da eine Prozessierung von Proteinen, z.B. deren Glykosylierung, nur im Golgi-Apparat erfolgt, impliziert das das Vorhandensein eines Golgi-Apparates oder zumindest einer Golgi-ähnlichen Struktur im Wachstumskegel auswachsender Axone (Abb. 12).

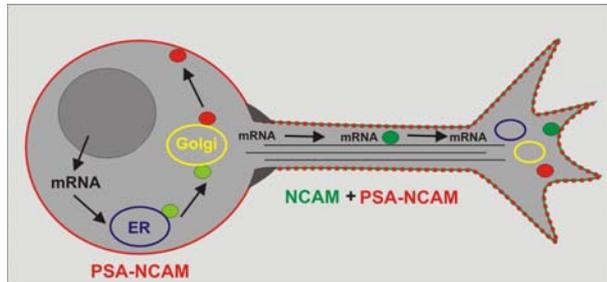


Abb. 12: Hypothetisches Modell zum mRNA-Transport

Das Modell zeigt den hypothetischen mRNA-Transport im Axon auswachsender Neurone mit Translation und Prozessierung der Proteine im Wachstumskegel. Blau = Endoplasmatischen Retikulum, gelb = Golgi-Apparat bzw. Golgi-ähnliche Struktur

Um diese Fragen zu beantworten, sollten in der nachfolgenden Arbeit die potentiellen Substrate der Glykosyltransferase STX (zNCAM, zPCAM und zOCAM) auf ein vielleicht vorhandenes CPE hin untersucht werden. Sofern sich ein CPE nachweisen lässt, sollte sein Einfluss auf den Transport der mRNA des jeweiligen CAMs aufgeklärt werden, um das hier vorgestellte Modell des mRNA-Transports zu bestätigen.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Geräte

- | | |
|--------------------------------|---------------------------|
| • Brutschrank | Memmert |
| • Drehräder | Agar Scientific, H. Saur |
| • Elektrodenpuller Model 700 C | David Kopf Instruments |
| • Feinwaagen | Mettler Toledo, Sartorius |
| • Fluoreszenzbinokular Lumar | ZEISS |
| • Hybridisierungsöfen | Binder |
| • Kaltlichtquelle KL 1500 LCD | ZEISS |
| • Konfokalmikroskop LSM 510 | ZEISS |
| • Kühl- und Gefrierschränke | Liebherr, Privileg |
| • Magnetrührer | IKA Labortechnik |
| • Mikrowelle | Privileg |
| • Schüttler | Heidolph |
| • Stereomikroskop Lumar | ZEISS |
| • Thermocycler | MJ Research |
| • Thermoschüttler | Eppendorf |
| • Transjektor 5246 | Eppendorf |
| • Zentrifuge 5415 C | Heraeus |
| 5810 R | Heraeus |

1.2 Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, stammen alle Verbrauchsmaterialien von der Firma Carl Roth, Karlsruhe.

- | | |
|--|----------------------|
| • Cryoröhrchen | |
| • Deckgläschen, 24 x 60 mm # 1 | |
| • Einwegspritzen, 10 ml | Henke Sass Wolf GmbH |
| • Einwegsterilfilter, 0,22 µm Porengröße | Millipore |

-
- | | |
|--|-----------------------|
| • Eppendorftubes 2 ml | Eppendorf |
| 1,5 ml | Eppendorf |
| 250 µl | PeqLab |
| • Impfösen | Greiner |
| • Glaskapillaren ohne Filament | Science Products GmbH |
| • Pasteurpipetten | Brand |
| • Petrischalen Ø 9 cm | Greiner |
| • Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl | Eppendorf |
| • Röhrchen 15 ml, 50 ml | Greiner, Sarstedt |
| • 96-well-Platten | Biozym |
| • Vivaspin 500-Säulen | Vivascience |

1.3 Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, stammen alle Chemikalien und Reagenzien von der Firma Carl Roth, Karlsruhe.

- Hochreines Wasser, Aqua bidest (TKA-Anlage)

1.3.1 Embryonenaufzucht

- Calciumchlorid, CaCl₂
- Natriumchlorid, NaCl
- Kaliumchlorid, KCl
- Methylenblau

1.3.2 Klonierung der CAMs

- Agarose
- Ampicillin
- Bacto-Trypton
- Chloroform, CHCl₃, ≥ 99,9 % p.a.
- Diethylpyrocarbonat, DEPC
- Dimethylformamid, DMF
- Essigsäure
- Ethanol, 70 %, 100% C₂H₅OH

- Ethidiumbromid
- Ethylendiamintetraacetat, EDTA
- Glycerin
- Salzsäure, HCl
- Hefe-Extrakt
- IPTG
- Isopropanol, C₃H₈O, ≥ 99,5 % p.a.
- Natriumacetat (NaOAc)
- Tris
- Trizol/ Trifast
- X-Gal

1.3.3 *In situ*-Hybridisierung

- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat-4-Toluidin (BCIP/ X-phos) (Roche)
- Blockierreagenz (Boehringer)
- Diethylpyrocarbonat, DEPC
- Ethanol, 70 %, C₂H₅OH
- Formamid, deionisiert, ≥ 99,5 % p.a.
- Methanol, CH₃OH, ≥ 99,5 % p.a.
- 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (Roche)
- PBS-Gemisch, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (Biochrom)
- Paraformaldehyd, PFA (Merck)
- Tween-20
- Zitronensäure, C₆H₈O₇
- Natriumcitrat-Dihydrat, C₆H₅Na₃O₇ x 2 H₂O

1.3.4 Morpholino-Injektion

- Calciumnitrat, Ca(NO₃)₂
- HEPES
- Natriumhydroxid, NaOH
- Phenolrot

- Silikon-Kit Sylgard 184 (Dow Corning)
- Kaliumchlorid, KCl
- Natriumchlorid, NaCl
- Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

1.3.5 Immunfärbung

- Aceton $\geq 99,5\%$ p.a.
- Dimethylsulfoxid, DMSO,
- Glycerin, $\geq 99,5\%$ p.a.
- Natriumborhydrid, NaBH_4
- Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$
- di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$
- Mowiol 4-88 (Calbiochem)
- PBS-Gemisch, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Biochrom)
- Paraformaldehyd, PFA (Merck)
- n-Propylgallat (Sigma)
- PTU, 1-Phenyl-2-Thiourea (Sigma)
- Rinderserumalbumin, BSA, (Sigma)
- Thimerosal, Natriumethylmercuritthiosalicilat

1.4 Enzyme

1.4.1 Klonierung der CAMs

- DNase I (GibcoBRL)
- RedTaq-Polymerase (Sigma)
- Restriktionsenzyme: BamHI, EcoRI, SpeI, oder XhoI (Fermentas)
- Reverse Transkriptase, SuperScript II (GibcoBRL)
- RNA-Polymerase (T7 bzw. SP6) (Roche)
- RNaseH (GibcoBRL)

1.4.2 *In situ*-Hybridisierung

- Proteinase K (Roche)

1.5 Medien, Puffer und sonstige Lösungen

1.5.1 Embryonenaufzucht

- **60x Embryomedium E 3 (nach Haffter et al., 1996)**

17,2 g NaCl

+ 0,76 g KCl

+ 2,9 g CaCl₂ x 2H₂O

+ 4,9 g MgSO₄ x 7H₂O

Ansatz für 1 Liter Stocklösung, aliquotieren und bei -20 °C lagern

nach Verdünnung auf 1x Zugabe von 0,02 % Methylenblau

1.5.2 Klonierung der CAMs

- **LB- Medium (Luria-Bertani Medium) (500 ml)**

450 ml Aqua bidest

+ 5 g Bacto-Trypton

+ 2,5 g Hefe-Extrakt

+ 5 g NaCl

unter Schütteln auflösen und pH 7,0 einstellen (5 N NaOH)

auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen und autoklavieren

- **LB-Agar**

LB-Medium nach vorstehendem Rezept herstellen

Vor dem Autoklavieren Bacto-Agar zufügen:

15 g Bacto-Agar/ Liter LB- Medium

- **AXI-Platten**

LB-Agar

+ 50 µg/ ml X-Gal (in DMF gelöst)

+ 125 µmol/ l IPTG

+ 100 µg/ ml Ampicillin

- **S.O.C.-Medium (Invitrogen)**

Das verwendete S.O.C.-Medium war im Klonierungskit bereits enthalten und setzte sich wie folgt zusammen:

2 % Trypton

0.5 % Hefeextrakt

10 mM Natriumchlorid (NaCl)

2.5 mM Kaliumchlorid (KCl)

10 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂)

10 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄)

20 mM Glukose

- **50x TAE-Puffer (Tris-Actetat-EDTA)**

242,2 g Tris

+ 37,2 g EDTA

in 500 ml Aqua dest. Lösen, mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,0 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

1.5.3 *In situ*-Hybridisierung

- **BCL-Puffer** (Lösung stets frisch ansetzen)

5 ml Tris/ HCl, pH 9,5 (1M)

+ 2,5 ml MgCl₂ (1M)

+ 1,25 ml NaCl (4M)

+ 250 µl 20 % Tween-20

+ 41 ml H₂O

- **2,5 % Blockierlösung**

Lösung in PBST ansetzen

pH 7,3 mit NaOH einstellen, stoppen, wenn sich die Lösung klärt

aliquotieren und bei -20 °C lagern

- **Formamidpuffer**

25 ml Formamid, deionisiert

+ 12,5 ml 20x SSC

+ 250 µl 20 % Tween-20

+ 11,5 ml DEPC-H₂O

+ 460 µl Zitronensäure (1M)

Puffer unter dem Abzug ansetzen und bei -20 °C lagern

- **Hybridisierungspuffer**

25 ml Formamid, deionisiert

+ 12,5 ml 20x SSC

+ 1 ml tRNA (Torula-RNA, 50 mg/ ml)

+ 25 µl Heparin (100 mg/ ml)

+ 250 µl 20 % Tween-20)

+ 11 ml DEPC-H₂O

+ 460 µl Zitronensäure

- **PBST**

0,1 % Tween-20 in PBS (250 µl 20% Tween-20 in 50 ml 1x PBS)

- **4% PFA in PBS**

10g PFA

+150 ml DEPC-H₂O

+ 0,5 ml NaOH

Dieses Gemisch wird bei maximal 60 °C unter Rühren und Abzug erhitzt bis sich das PFA gelöst hat. Danach wird die Lösung durch einen Papierfaltenfilter filtriert und 25 ml 10x DEPC-PBS zugegeben. Im Anschluss daran wird der pH-Wert von 7,4 kontrolliert, falls nötig, mit HCl eingestellt und das Volumen auf 250 ml mit H₂O aufgefüllt.

Die gebrauchsfertige PFA-Lösung kann nun in 15 ml Rörchen aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden.

- **20x SSC**

175,3 g NaCl

+ 88,2 g C₆H₅Na₃O₇ x 2 H₂O

Salze unter Rühren in H₂O auflösen, auf 1 l auffüllen und 1 ml DEPC zugeben. Lösung unter dem Abzug über Nacht rühren lassen und anschließend autoklavieren.

- **20 % Tween-20**

10 ml Tween-20

+ 40 ml DEPC-H₂O

Fertige Lösung dunkel und kühl lagern.

1.5.4 Morpholino-Injektion

- **50x Danieau-Puffer (100 ml)**

16,948 g NaCl

+ 0,26 g KCl

+ 0,49 g MgSO₄ x 7H₂O

+ 0,78 g Ca(NO₃)₂

+ 5,97 g HEPES

Alle Zutaten in H₂O lösen, mit 10 N NaOH auf pH 7,6 einstellen, auf 100 ml auffüllen und sterilfiltrieren.

- **Morpholinolösung zur Injektion (20 µl)**

x µl H₂O (je nach MO-Endkonzentration)

+ x µl MO-Lösung (Ausgangskonzentration 25 ng/ nl)

+ 0,4 µl 50x Danieau-Puffer

+ 5 µl Phenolrot

- **Silikon**

Zur Herstellung der Silikonform für Injektionen werden 9 Teile Basislösung und 1 Teil Polymerisierungslösung aus dem Silikon-Kit gut miteinander vermischt. Dieses Gemisch mit der eingebetteten Form lässt man an einem Exsikator entgasen und über Nacht bei 60 °C im Heißluftofen auspolymerisieren.

1.5.5 Immunfärbung

- **20 % Mowiol**

Zum Einbetten von Zebrafischembryonen werden 60 g Mowiol 4-88 in 200 ml PBS über Nacht gerührt. Am nächsten Tag fügt man 100 ml Glycerin zu und lässt das Ganze weitere 8 Stunden rühren. Zur Verbesserung der Löslichkeit kann man die Lösung auf nicht mehr als 40 °C erwärmen. Anschließend wird der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 8-8,5 eingestellt und 0,3 ml Thimerosal (0,2 %) als Konservierungsmittel zugegeben. Die fertige Lösung wird nun 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, in 15 ml Röhrchen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Vor Gebrauch können die Aliquots in der Mikrowelle aufgetaut werden. Um die Fluoreszenzfärbungen vor einem vorzeitigen Ausbleichen zu schützen, gibt man eine kleine Spatelspitze n-Propylgallat hinzu, mischt kurz und zentrifugiert 12 min bei 4000 rpm ab.

Gebrauchsfertiges Mowiol kann für 2 Wochen bei 4 °C gelagert werden, sollte aber innerhalb dieser Zeit verbraucht werden.

- **Natriumborhydridlösung, NaBH₄**

Vor jeder Verwendung muss die Lösung frisch angesetzt werden, da NaBH₄ in Lösung spontan zerfällt. Die benötigte Konzentration liegt hier bei etwa 1 µg/ ml, wofür man einige Krümel oder eine kleine Spatelspitze NaBH₄ in ca. 7 ml PBS gibt und unter dem Abzug auflöst.

- **1x PBS, phosphate buffered saline (Dulbecco und Vogt, 1954)**

Das fertige Salzgemisch enthielt pro Liter

- 8,0 g NaCl
- + 0,2 g KCl
- + 0,2 g KH₂PO₄
- + 1,15 g NaH₂PO₄

- **PBS/ BSA/ DMSO-Lösung**

1 % (w/ v) BSA und 1 % (w/ v) DMSO in PBS unter Rühren auflösen

Die Lösung ist bei 4 °C maximal 3 Tage haltbar.

- **4 % PFA in Phosphatpuffer**

- 10 g PFA
- + 150 ml H₂O
- + 0,5 ml NaOH

Die Herstellung von PFA in Phosphatpuffer erfolgt prinzipiell ähnlich wie im Rezept mit PBS beschrieben. Anstatt DEPC-PBS werden hier aber 62,5 ml 4x Phosphatpuffer zugegeben und es wird, wie oben beschrieben, weiter verfahren.

- **4x Phosphatpuffer (0,4 M)**

- 5,32 g NaH₂PO₄ x 1 H₂O
- + 52,11 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O

Die Salzmischung wird unter Rühren in H₂O gelöst, der pH-Wert von 7,4 kontrolliert und anschließend das Volumen auf 500 ml mit H₂O aufgefüllt.

Zur Verbesserung der Löslichkeit kann hierfür die Temperatur auf maximal 40 °C erhöht werden. Für die Herstellung von 1x Phosphatpuffer für Immunfärbungen wird dieser 4x Puffer 1:4 mit H₂O verdünnt.

1.6 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG ohne zusätzliche Modifikationen synthetisiert. (<http://www.mwgbio.com>)

1.6.1 cDNA-Synthese-Primer

AP: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATGATCAGCTGCGCACCGG-3'

AUAP: 5'-CATGATCAGCTGCGCACCGG-3'

1.6.2 zNCAM

zNCAM 1 for: 5'-CAGACAGACAGCACCACACC-3'

zNCAM 2 for: 5'-GGCTTTCAGTAACTGTGTCTTCTTTG-3'

zNCAM 3 for: 5'-CTTCAGGACCTTGCCAGAAC-3'

zNCAM 7 for: 5'-GATCACCTTCCTAGAAAACCAGAC-3'

zNCAM 9 for: 5'-AACTGAACCCAACGAGACCAC-3'

zNCAM 4 rev: 5'-AAGACGGGACTTAACTGAAACATC-3'

zNCAM 5 rev: 5'-CTGTGAATACTCAGGGCTGG-3'

zNCAM 6 rev: 5'-CAAACTAAATGGAAGGAACCCTG-3'

zNCAM 8 rev: 5'-TCTCCTTCACCTTTGCCGTTG-3'

zNCAM 10 rev: 5'-CCGGCGCTTTACTTTTGTCATC-3'

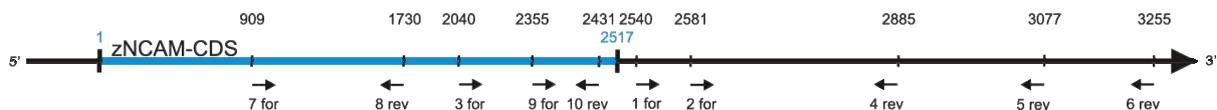


Abb. 13: Lokalisation der zNCAM-Primer

1.6.3 zPCAM

zPCAM 1 for: 5'-CCACCGATGGAGAAGAAAAGTG-3'

zPCAM 2 for: 5'-CATGAACGTGTTTGTTAATCAGTGCC-3'

zPCAM 3 for: 5'-TAAATCCCATCAGCCCACAGG-3'

zPCAM 4 for: 5'-AACGTGTTTGTTAATCAGTGCCC-3'

zPCAM 8 for: 5'-GACCCCACACCCACCATTAC-3'

zPCAM 5 rev: 5'-CCTAGCCCTCAAACACTCAAG-3'

zPCAM 6 rev: 5'-GCACGTTGGAAGAATGATTGAAAG-3'

zPCAM 7 rev: 5'-ACTGGCAGTGAATAACTGAACAAC-3'

(ergab kein PCR-Produkt)

zPCAM 9 rev: 5'-CTTCTAGAATAGGAGGACTGGG-3'

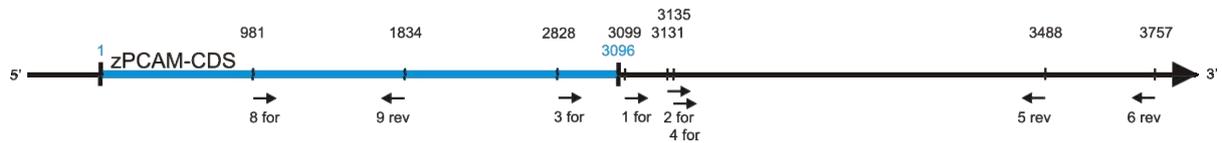


Abb. 14: Lokalisation der zPCAM-Primer

1.6.4 zOCAM

zOCAM 1 for: 5'-CACCCGGAGACCAATAGCAAG-3'

zOCAM 2 for: 5'-GTAAGATCCTTTGTTAGAGACTCCTTG-3'

zOCAM 3 for: 5'-AAGCTCTGCAGCAAAAAGACTG-3'

zOCAM 6 for: 5'-TGTTTCTCAAGGTTTTTCGTCCAG-3'

zOCAM 4 rev: 5'-TTCACATTTGGGTGAGACACAC-3'

zOCAM 5 rev: 5'-GCCCTTCTTTAGCTCTTGATG-3'

zOCAM 7 rev: 5'-TAGGTCGTGTTAGGCTCAAGG-3'

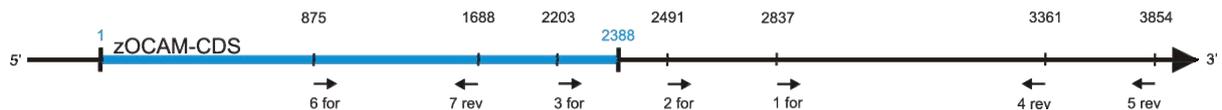


Abb. 15: Lokalisation der zOCAM-Primer

1.6.5 Klonierungsprimer

M13 for: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

M13 rev: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

1.7 Morpholinos

Bei Morpholinos (MOs) handelt es sich um chemisch modifizierte Antisense-Oligonukleotide, die aufgrund ihrer Modifikationen abbaustabil gegenüber RNasen sind. Hierfür wird in mehreren Reaktionsschritten der Ribosering aufgebrochen und ein Stickstoffatom eingefügt. Auf diese Weise modifizierte Basen werden durch ein stickstoffatomhaltiges Phosphatrückgrat bis zu einer Kettenlänge von 25 Nukleotiden verknüpft (Abb. 16).

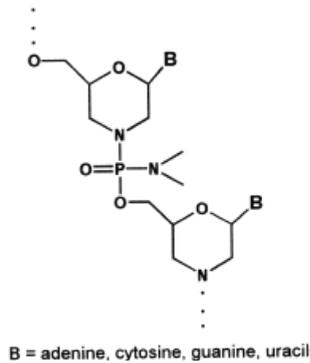


Abb. 16: Morpholinostruktur nach Summerton und Weller (1997)

Mit Hilfe dieser Antisense-Nukleotide ist es möglich, die Translation von mRNA zu inhibieren und so einen zeitweiligen Genknockdown zu induzieren. Dies erreicht man, indem die Translationsinitiationsstrukturen in der 5'UTR blockiert oder die Reifung der mRNA via Spleißen durch Blockade von Intron-Exongrenzen unterbindet. Ebenfalls ist es möglich mit Morpholinos einzelne Motive der mRNA zu maskieren und so deren Funktion zu stören.

Alle Morpholinos wurden von der Firma GeneTools ohne zusätzliche Modifikationen hergestellt. (<http://www.gene-tools.com>)

1.7.1 Kontroll-Morpholino

Bei dem hier verwendeten Kontroll-Morpholino handelte es sich um einen handelsüblichen Standardkontroll-MO der Firma GeneTools, der aus einer unspezifischen Nukleotidsequenz bestand. So sollte ein genereller Effekt der modifizierten Oligonukleotide auf die mRNA ausgeschlossen werden.

5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

1.7.2 zNCAM 5'UTR-Morpholino

5'-TTCCGTGTAGAATAGGTAGAGTTGG-3'

1.7.3 zNCAM 3'UTR-Morpholino

Der 3'UTR-MO stellte eine interne Kontrolle für die Manipulation des CPE-Motivs dar. Mit seiner Hilfe sollte überprüft werden, ob es bei der Anwendung eines Morpholinos in der 3'UTR einer mRNA zu generellen Effekten kommt, die nicht auf das CPE zurückzuführen sind. Im vorliegenden Fall blockiert der Morpholino einen Bereich der mRNA, der sich direkt an das Stopcodon der codierenden Sequenz für zNCAM anschließt.

5'-TGTCTGCGACTGTCGTGCTGATTC-3'

1.7.4 zNCAM CPE-Morpholino

5'-AATAAAAAGGCGGTTGTTTTGTAC-3'

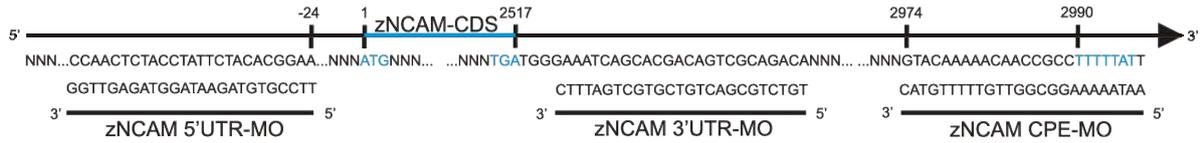


Abb. 17: Lokalisation der zNCAM-Morpholinos

1.7.5 zPCAM 5'UTR-Morpholino

5'-GTTTACTGTTTGTGTTTTGCCTTCCG-3'

1.7.6 zPCAM CPE-Morpholino

5'-GCCCTCAAACACTCAAGATAAAAAA-3'

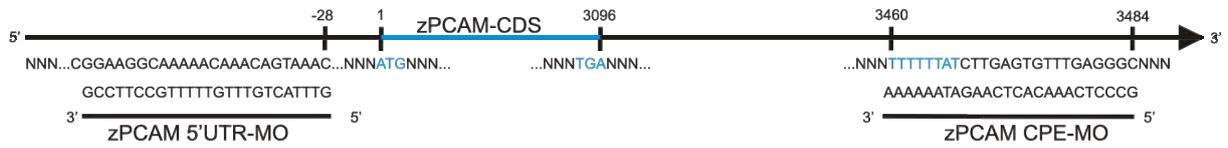


Abb. 18: Lokalisation der zPCAM-Morpholinos

1.8 Antikörper

1.8.1 *In situ*-Hybridisierung

Name	Herkunft	Typ	Spezifität	Verdünnung
Anti-Digoxigenin-AP (Roche)	Schaf	F _{ab} -Fragment mkl	Digoxigenin-markierte Nukleinsäuren	1 :2000

Tabelle 1: Verwendeter ISH-Antikörper

1.8.2 Immunfärbung

Alle Verdünnungen und Inkubationsschritte in PBS/ BSA/ DMSO-Lösung.

Primärantikörper

Name	Herkunft	Typ	Spezifität	Verdünnung	Referenz
T 741	Kaninchen	IgG pkl	Zebrafisch Tag-1 (GPI-verankertes Zelladhäsions- molekül)	1 :5000	Lang et al., 2001
m735	Maus	IgM mkl	PSA	1:200	
D3	Maus	IgM mkl	NCAM 140 und 180	1:600	Schlosshauer, 1989 Bastmeyer et al., 1990
704	Kaninchen	IgG pkl	zNCAM und zPCAM	1:2500	Marx, 2002

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper

Sekundärantikörper

Herkunft	gekoppelter Farbstoff	Typ	Spezifität	Verdünnung
Esel (Dianova)	Cyanin 3 (Cy 3)	IgM F _{ab} -Fragmente und μ-Kette	IgM Maus	1:1000
Ziege (Molecular Probes)	Alexa 488	IgG F _{ab} -Fragmente	IgG Maus	1:1000
Ziege (Molecular Probes)	Alexa 488	IgG F _{ab} -Fragmente	IgG Kaninchen	1:1000

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper

1.9 Fusionsprotein

Alle Verdünnungen und Inkubationsschritte erfolgten in PBS/ BSA/ DMSO-Lösung.

Name	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Referenz
Endo:GFP-Fusionsprotein	E. coli K1 Phage	PSA	1:500	Jokilammi et al., 2004

Tabelle 4: Verwendetes Fusionsprotein

1.10 Versuchstiere

Als Versuchsobjekt diente der Zebrafisch, *Danio rerio*, ein ca. 6 cm langer Zierfisch aus der Familie der Karpfenfische, *Cyprinidae*. Zur Verwendung kamen in den nachfolgend beschriebenen Experimenten ausschließlich Embryonen in einer Altersspanne von 10 – 72 hpf.

2. Methoden

2.1 Haltung der Versuchstiere

Für die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden ausschließlich Wildtyp- und golden-Stämme (*gol*) verwendet, die alle aus der Zebrafischzucht der Universität Konstanz entstammten. Bei dem genannten golden-Stamm handelt es sich um eine Mutation, die sich in ihrer Pigmentierung vom Wildtyp unterscheidet. Hier ist die Bildung von Melanin vermindert, wodurch Individuen mit dieser Mutation weniger dunkel gefärbt sind und golden schimmern.

Heterozygote *gol*-Weibchen und homozygote *gol*-Männchen wurden zusammen in Aquarien mit einer Schwarmgröße von 20 bis 30 Fischen gehalten. Auf diese Weise konnten sich innerhalb eines Schwarmes Pärchen ausbilden und Rivalitäten unter den Männchen wurden vermieden, was insgesamt zu einem friedlichen und natürlichen Verhalten dieser Tiere führte. Um einen weiteren Stressfaktor zu reduzieren, wurden alle Aquarien auf einen dunklen Untergrund gestellt, der den natürlich vorkommenden Flussgrund imitieren sollte. Alle Becken hatten ein Volumen von 40 l und waren mit einem Wasserfilter, einem Regelheizer, der eine konstante Temperatur von 25 °C ermöglichte und einer zusätzlichen Sauerstoffversorgung in Form einer elektrischen Luftpumpe ausgestattet. Die standardisierte Wassertemperatur von 28,5 °C wurde auf 25 °C abgesenkt, um die Gesundheit der Fische unter den unphysiologischen Parametern des Karlsruher Leitungswassers dauerhaft zu gewährleisten. Unter Einsatz einer Zeitschaltuhr konnte ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus mit 12 Stunden Tageslicht und 12 Stunden Dunkelheit geschaffen werden. Die Fütterung der Fische erfolgte einmal täglich abwechselnd mit Frost- oder Trockenfutter. Zur Reduktion von Schadstoffen, wie Nitrat, Nitrit und Ammoniak, die mit Kot und

Futterresten anfallen, wurde einmal pro Woche ein Teilwasserwechsel durchgeführt. Dafür wurde ca. ein Drittel das Aquariumwassers abgezogen und durch ein Wassergemisch ersetzt. Hierfür wurden Leitungswasser und Aqua dest. im Verhältnis 1:1 gemischt, wodurch spezielle Parameter des Leitungswassers, wie Karbonathärte und Osmolarität gesenkt werden konnten.

2.2 Gewinnung von Embryonen

Zebrafische benötigen als Dämmerungslaicher einen Lichtreiz zur Stimulation des Ablaichens, weswegen dieser Vorgang nur während der Morgendämmerung zu beobachten ist. Am Abend vor dem geplanten Ablaichen wurden jeweils 2 Pärchen aus den Schwärmen herausgefangen und in 2 ineinander gestellte Mäusehaltungskästen umgesetzt. Der obere Kasten war an Stelle des Bodens mit einem Drahtgitter mit einer Maschenweite von 2 mm versehen, sodass die Eier vor den Alttieren geschützt hindurchfallen und nicht wieder aufgeessen werden konnten.

Um unnötigen Stress durch frisches Wasser mit ungewohnter Temperatur, Chemismus und hellen Untergrund zu vermeiden, wurden die Laichkästen mit ca. 3 l Wasser aus den jeweiligen Aquarien gefüllt und auf einen dunklen Untergrund gestellt. Zusätzlich wurden einige Pflanzen aus Plastik zur Stimulation des Ablaichens hinzugegeben. Am nächsten Tag erfolgte im günstigsten Fall innerhalb von 30 bis 45 Minuten nach Anschalten des Lichtes die Eiablage. Die adulten Tiere wurden danach zum Schwarm zurückgesetzt und die Eier gewonnen, indem man das Wasser aus den Laichkästen durch ein Teesieb in das Aquarium zurückschüttete. Verunreinigungen durch Kot oder andere Stoffe wurden mit leicht temperiertem Leitungswasser vorsichtig ausgespült und die Eier in eine Petrischale überführt.

2.3 Aufzucht der Embryonen

Die frisch gelegten Eier wurden in mit E3-Embryomedium-gefüllte Petrischalen umgesetzt und, sofern bereits erkennbar, nicht befruchtete oder abgestorbene Eier aussortiert. Die Zugabe von Methylblau zum Medium in einer Konzentration von 0,02 % verhinderte den Befall der Brut mit Pilzen und Bakterien.

Im Anschluss daran erfolgte im Brutschrank die weitere Inkubation bei konstant 28,5 °C bis das gewünschte Alter erreicht war. Die Altersbestimmung der Embryonen erfolgte nach Kimmel et al. (1995) mit der Angabe der Entwicklungsstadien in Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilization, hpf). Gleiches gilt für die Bezeichnung dpf (days post fertilization), dem Alter in Tagen nach der Befruchtung.

Per Definition aus dieser Arbeit spricht man bis zu einem Alter von 3 dpf von Embryonen und ab 3 dpf von Larven.

Um die im Alter von 24 hpf einsetzende Pigmentierung der Embryonen zu verhindern, wurde dem Medium in diesem Stadium 0,2 mM PTU zugesetzt (Westerfield, 1994). Dadurch konnte die Bildung des Farbstoffes Melanin nahezu komplett inhibiert werden. Das Prinzip dieser Reaktion ist die Hemmung der Umsetzung von Tyrosin, dem Ausgangsstoff der Melaninsynthese durch die

Monophenol-Monooxygenase (Weiland, 1995). Auf diese Weise behandelte Embryonen bildeten keine bzw. nur eine schwache Melanisierung aus, was die Auswertung der Versuche am Konfokalmikroskop erheblich erleichterte.

2.4 Amplifizierung und Klonierung der CAMs

2.4.1 Gewinnung von totaler RNA

Die Gewinnung totaler RNA wurde nach dem peqGOLD TriFast (PeqLab) Standardprotokoll durchgeführt. Dafür wurde 1 Teil Gewebe in 9 Teilen TriFast homogenisiert. Bei dem Gewebe handelte es sich entweder um 100 mg 31 hpf alter Zebrafischembryonen oder um das Gehirn eines adulten Zebrafischs, um die Expression der CAMs in diesen beiden Stadien vergleichen zu können.

Anschließend erfolgten die Phasentrennung und die RNA-Präzipitierung nach Protokoll, die RNA wurde gewaschen und in Wasser gelöst. Vor der Lagerung bei -20 °C wurde photometrisch noch die Reinheit der RNA mit Hilfe des A_{260}/A_{280} -Quotienten bestimmt, der bei reiner RNA zwischen 1,6 und 1,8 liegen sollte.

Die zu erwartenden Gesamt-RNA-Mengen liegen im Fall der Embryonen bei ca. 8 µg/ mg Gewebe und im adulten Gehirn bei ca. 3 µg/ mg.

2.4.2 Synthese von cDNA (3'RACE)

Die isolierte RNA konnte nun für die Synthese von cDNA eingesetzt werden. Als Methode der Wahl kam die 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends) zum Einsatz. Das dafür zugrunde liegende Protokoll entstammt der Firma GibcoBRL, von der auch der dafür benötigt Kit stammt.

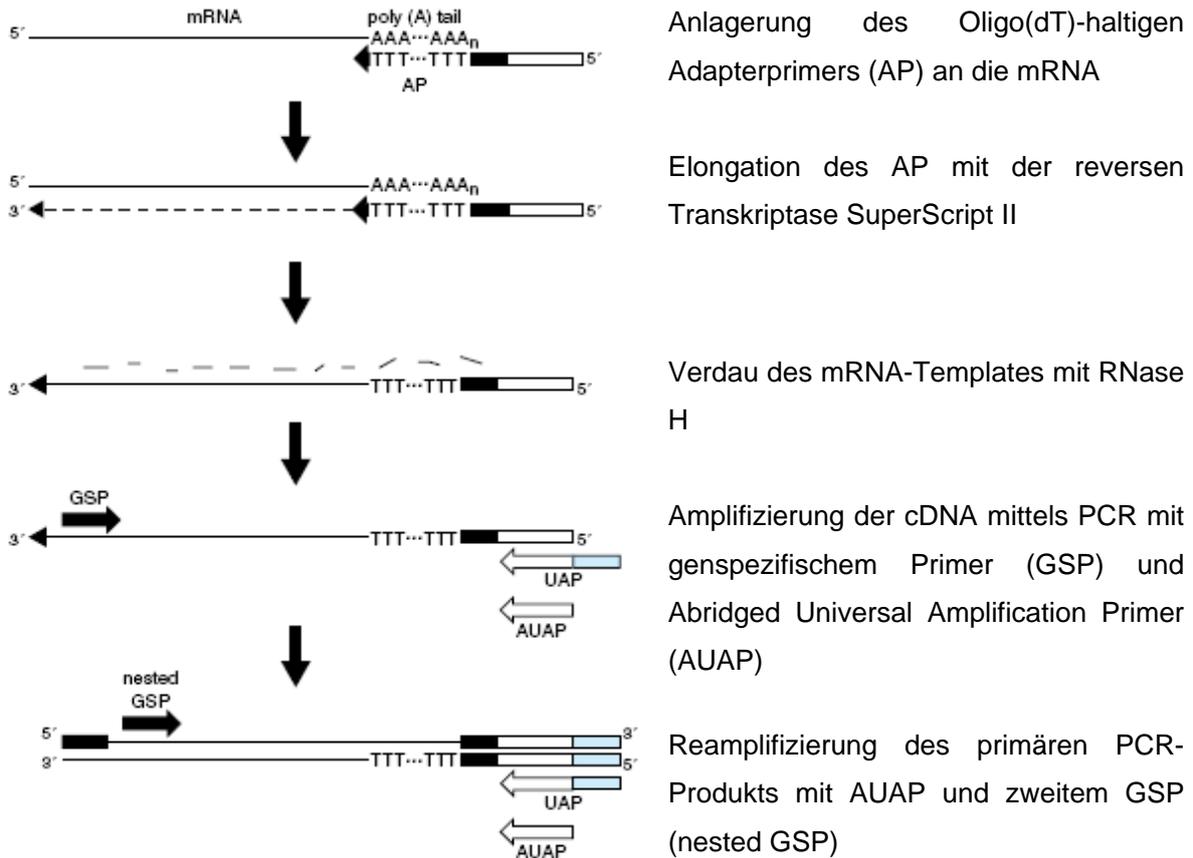


Abb. 19: Schematische Darstellung der 3'RACE nach GibcoBRL

2.4.3 Amplifikation von CAM-Fragmenten mittels PCR

Nachdem mit der bevorstehend beschriebenen Methode doppelsträngige cDNA von zNCAM, zPCAM und zOCAM synthetisiert wurde, konnte nun deren jeweilige 3'UTR mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Dafür fanden die unter Kapitel III.1.6 aufgelisteten genspezifischen Primer ihre Anwendung. Der Mastermix des verwendeten Standard-PCR-Protokolls enthielt folgende Komponenten:

Mastermix für eine PCR-Reaktion

- 13 µl H₂O
- 2 µl 10x PCR-Puffer (enthält bereits Mg²⁺)
- 1,6 µl dNTPs (aus einem 10mmol Stock)
- 0,8 µl Primer 1 (aus einem 10 µmol Stock)
- 0,8 µl Primer 2 (aus einem 10 µmol Stock)
- 0,8 µl RedTaq-Polymerase (Sigma)
- 1 µl Template (cDNA, PCR-Produkt)

Gesamtvolumen: 20 µl

Als Templates dienten entweder cDNA, die 1:20 - 1:100 verdünnt eingesetzt wurde, oder ein 1:10 verdünntes, zur Reamplifizierung vorgesehenes PCR-Produkt. Kam eine Bakterienkultur als Template zum Einsatz, wurde sie unverdünnt zum Mastermix zugegeben. Entsprechend der ermittelten annealing-Temperaturen der eingesetzten Primerpaare wurde das Template anschließend nach folgendem PCR-Programm vervielfältigt:

94 °C für 5 min (Denaturierung)	}	35 Zyklen
94 °C für 1 min (Denaturierung)		
XX °C für 1 min (Annealing-Temperatur der Primerpaarung)		
72 °C für 3 min (Elongation)		
72 °C für 7 min (finale Elongation)		
4 °C ∞ (Kühlung bis zur weiteren Verwendung)		

Die anschließende Auswertung der PCR erfolgte mit Agarose-Gel-Elektrophorese. Je nach Anzahl der zu analysierenden PCR-Produkte wurde ein kleines bzw. mittleres 1%-iges Agarosegel mit der entsprechenden Anzahl Taschen gegossen und nach Aushärten mit den Proben beschickt. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer bei 125 mA und 90 V durchgeführt und das Gel im Anschluss in der Geldokumentationseinheit unter UV-Licht begutachtet und fotografiert.

kleines 1%-iges Agarosegel

0,3 g Agarose
30 ml H₂O
600 µl 50x TAE-Puffer
1,5 µl Ethidiumbromid

mittleres 1%-iges Agarosegel

0,8 g Agarose
80 ml H₂O
1,6 ml 50x TAE-Puffer
4 µl Ethidiumbromid

2.5 Klonierung der CAM-Fragmente

PCR-Produkte, bei denen sich nach der Gelelektrophorese herausstellte, dass sie die erwartete Größe aufwiesen, wurden zur Klonierung dieser Fragmente weiter verwandt. Zur Anwendung kam hier der pCRII-TOPO-Vektor aus dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Eine Ligation der PCR-Produkte in dieses Plasmid wurde durch die in der PCR benutzte RedTaq-Polymerase vereinfacht, da sie Überhänge von zwei Adeninresten am 3'-Ende eines DNA-Strangs induziert. Diese so erzeugten „klebrigen“ Enden des DNA-Doppelstrangs verbinden sich relativ problemlos mit der im Vektor enthaltenen Insertionsstelle, die die zu den Insertenden komplementären Thymidinreste aufweist. Ein weiterer Vorteil dieses Vektors ist das enthaltene lacZ-Operon, das für die spätere Differenzierung der erfolgreich inserierten Fragmente von Nöten ist.

Die eigentliche Klonierung mit der anschließenden Transfizierung des Vektors in die TOP10F' kompetenten *Escherichia coli* erfolgte strikt nach dem vorgegeben Protokoll. Die so transfizierten Bakterien wurden in 250 µl S.O.C.-Medium überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert, ehe sie auf Ampicillin-, X-Gal- und IPTG-haltige Agarplatten (AXI-Platten, vgl. Kapitel III.1.5.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Die im Vektor kodierte Ampicillinresistenz diente hier als Selektionskriterium, IPTG als Induktor und X-Gal als Substrat des lacZ-Operons. Auf diese Weise war es möglich, Klone zu selektieren, bei denen das PCR-Fragment erfolgreich in den Vektor inseriert hatte. Ermöglicht wurde dies durch die Lage der Insertionsstelle innerhalb des lacZ-Operons, das bei erfolgreichem Einbau des PCR-Produktes unterbrochen wird. Dadurch ist es mit diesem Vektor transfizierten Bakterien nicht mehr möglich X-Gal zu metabolisieren und sie erscheinen als weiße anstatt als blaue Kolonien auf der bebrüteten AXI-Platte (blue/ white-Screening).

Am nächsten Morgen wurden mit kleinen Pipettenspitzen von jeder Platte ca. zehn weiße Kolonien gepickt, jede Spitze in ein mit 100 µl LB-Medium gefülltes Loch einer 96 well-Platte gesteckt, diese darin kurz verrührt und die gesamte 96 well-Platte 2-3 h bei 37 °C im Bakterieneschüttler inkubiert.

Um zu überprüfen, ob die gepickten Klone die richtigen Inserts enthielten, wurde nach der Inkubation eine PCR nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt und elektrophoretisch ausgewertet. Als Primer dienten hier M13 for und M13 rev, deren Bindungsstellen sich rechts und links vom Insert im Vektor befinden. Aus Klonen, die ein Insert in der richtigen Größe enthielten, wurde eine Übernachtskultur angefertigt, d.h. 5 µl der Bakteriensuspension aus dem entsprechenden well der bebrüteten 96 well-Platte wurden in ein Röhrchen mit 5 ml LB-Medium pipettiert und dieser Ansatz über Nacht bei 37 °C auf dem Bakterieneschüttler inkubiert.

Aus diesen Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag mit Hilfe eines Miniprep-Kits (Qiagen) nach der enthaltenen Anleitung die Plasmide isoliert. Um nochmals die Korrektheit und auch die Reinheit der Plasmide zu überprüfen, wurden sie mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und so das Insert mit den angrenzenden Vektorbereichen isoliert. Standardmäßig kam EcoRI zur Verwendung, dessen Schnittstellen sich ebenfalls rechts und links vom Insert befinden. Der Verdauungsansatz enthielt:

- 3 µl Plasmidlösung
- 1 µl Restriktionsenzym (EcoRI, Fermentas)
- 1 µl 10x Enzympuffer
- 5 µl H₂O

Dieser Ansatz wurde 1-2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. Um einen Vergleich mit dem unverdauten Plasmid zu haben, wurden beide nebeneinander auf das Gel aufgetragen.

Verdautes Plasmid

10 µl Verdauansatz
 + 1 µl 10x Ladepuffer (Blue Juice, Invitrogen)

unverdautes Plasmid

0,5 µl unverdautes Plasmid
 + 1 µl 10x Ladepuffer
 + 9 µl H₂O

Traten nach der Elektrophorese keine Auffälligkeiten, wie z.B. Doppelbanden nach Verdau der Plasmide, auf und hatten die Plasmide die erwarteten Größen, konnten sie zur Sequenzierung eingeschickt werden. Diese erfolgte entweder bei Agowa, MWG oder Qiagen. Nach Erhalt der jeweiligen Sequenzen wurden diese mit Hilfe der DNASTar-Software ausgewertet. Entsprechend den daraus gewonnenen Resultaten wurden *in situ*-Sonden synthetisiert und Morpholinos entworfen.

2.6 Expressionsanalyse mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH)

Die Sequenzen der Sonden für zNCAM und zPCAM lagen jeweils in der codierenden Region der mRNA und waren PCR-Produkte der Primer zNCAM 7 for und 8 rev bzw. zPCAM 8 for und 9 rev. Die zOCAM-Sonde wurde aus dem PCR-Produkt von zOCAM 3 for und 4 rev, sowie die Sonde für das alternative zNCAM-Exon aus zNCAM 9 for und 10 rev hergestellt (vgl. Kapitel III.1.6)

2.6.1 ISH-Sonden-Synthese

Zu Beginn der Sondensynthese musste das Plasmid mit der codierenden Sondensequenz linearisiert werden. Hierfür wurden 5 µl isoliertes Plasmid (ca. 1 µg Plasmid-DNA) mit einem Restriktionsenzym verdaut, das auf der Seite des Inserts schneidet, die dem jeweiligen RNA-Polymerasepromotor gegenüberliegt. Abhängig von der Orientierung mit der das jeweilige PCR-Produkt in den Vektor inseriert hatte, musste hier mit Restriktionsenzymen verdaut werden, die den jeweils benötigten Promotor intakt ließen. Auf diese Weise war gewährleistet, dass die Polymerase am Ende des Inserts abfällt und nur diesen Bereich transkribiert. Aus der Vektorkarte waren die Schnittstellen der jeweiligen Enzyme ersichtlich. Der Plasmidverdauansatz enthält:

5 µl Plasmid-DNA
 1 µl Restriktionsenzym (BamHI, SpeI, oder XhoI)
 3 µl 10x Restriktionspuffer
 21 µl H₂O

30 µl Gesamtvolumen

Dieser Ansatz wurde 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Dafür wurden dem Verdauansatz hinzugefügt:

3 µl 3 M Natriumacetat (NaOAc) (entspricht 1/10 des Verdauvolumens)
 60 µl 100% EtOH (entspricht dem doppeltem Verdauvolumen)

Dieser Ansatz wurde gemischt und 30 min bei -20 °C inkubiert, danach bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand so gut es ging abgenommen. Für die anschließende Waschung des Pellets wurden 200 µl 70% Ethanol zugegeben, das Ganze wiederum 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das gewaschene DNA-Pellet konnte nun 5 min an der Luft getrocknet werden.

Für die nachfolgende Transkriptionsreaktion wurde die linearisierte DNA in 6,5 µl DEPC-H₂O resuspendiert und auf Eis zwischengelagert. Hinzugefügt wurde weiterhin:

1 µl NTP-Gemisch (enthält Digoxigenin-markiertes Uracil)

1 µl 10x Transkriptionspuffer

0.5 µl RNase-Inhibitor

1 µl RNA-Polymerase (entweder T7 oder SP6)

Dieser Transkriptionsansatz wurde 2 Stunden bei 37 °C im Thermo-Cycler inkubiert, anschließend wurde 1 µl DNase I zugegeben und das DNA-Template 15 min bei 37 °C verdaut. Zur Kontrolle der Transkriptionsreaktion wurden 0,5 µl entnommen, mit 5 µl deionisiertem Formamid, 1 µl 10 x Ladepuffer und 4 µl H₂O versetzt 2-3 min bei 60 °C denaturiert, danach auf Eis abgeschreckt und anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Sofern die RNA-Sonde keine Auffälligkeiten aufwies, konnte mit der Aufreinigung fortgefahren werden. Zur Entfernung von Salzen und nicht eingebauten Nukleotiden kamen Vivaspin 500-Säulen (Sartorius) zum Einsatz. Dem Transkriptionsansatz wurden 490 µl DEPC-H₂O zugefügt und bis nach der Aktivierung der Säulen wurde dieser auf Eis gelagert.

Zur Vorreinigung der Säulen wurden diese mit 500 µl DEPC-H₂O beladen und 4 min bei 2 °C und 6000 rpm abzentrifugiert bis das ganze Wasser durchgeflossen war und verworfen werden konnte. Danach konnte die Säule mit dem 500 µl Transkriptionsansatz beladen werden, der ebenfalls 4 min bei 2 °C und 6000 rpm abzentrifugiert wurde. Um zu verhindern, dass die Säule trocken fällt, wurden ca. 50 µl Lösung in der Säule belassen. Anschließend wurde zweimal gewaschen, wofür die Säule jeweils wieder mit 500 µl DEPC-H₂O beladen wurde, was 4 min bei 2 °C und 6000 rpm (evtl. zusätzlich 2 min bei 2 °C und 6000 rpm) und im letzten Schritt 5 min bei 2 °C und 6000 rpm abzentrifugiert wurde. Am Ende sollten noch ca. 100 µl H₂O übrig bleiben, mit denen die Sonde von der Säulenmembran gelöst werden konnte. Hierfür wurde das Wasser in der Säule etwa eine Minute lang auf und ab pipettiert. Diese 100 µl Sondensuspension wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 ISH-Protokoll

Alle für die *in situ*-Hybridisierung verwendeten Zebrafischembryonen wurden nach dem Dechorionieren über Nacht bei 4 °C mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und anschließend 2 x 5 min in DEPC-PBST gewaschen. Zur weiteren Lagerung der fixierten Embryonen bei -20 °C

wurde das PBST entfernt, durch Methanol ersetzt und kurz gemischt. Dieses Methanol wurde nochmals entfernt und durch frisches ersetzt.

Zu Beginn des ersten Tages mussten die fixierten, in Methanol gelagerten Embryonen rehydriert werden. Dafür wurde alles MeOH bis auf ca. 500 µl entfernt, 500 µl PBST zugegeben und die Eppendorf-Gefäße kurz auf einem Taumler bei langsamer Geschwindigkeit geschüttelt. Das MeOH-PBST-Gemisch wurde anschließend abgenommen und die Embryonen 2 x 5 min mit PBST gewaschen. Nachdem auf diese Weise das MeOH ausgewaschen wurde, mussten die Embryonen 20 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA/ PBS auf dem Taumler nachfixiert werden, ehe sie nun 2 x 5 min und 1 x 10 min mit DEPC-PBST gewaschen wurden.

Um die Epidermis zu permeabilisieren, damit im weiteren Verlauf Sonden und Antikörper in den Embryo eindringen können, wurde diese mit Proteinase K behandelt und dadurch anverdaut. Die in dieser Arbeit eingesetzte Endkonzentration der Proteinase K betrug 9,6 µg/ ml PBST.

Je nach Alter der Embryonen wurden sie unterschiedlich lange bei Raumtemperatur in der Proteinase K/ PBST-Lösung belassen.

Gastrulastadien	keine Proteinase K-Behandlung
Knospenstadium/ frühe Somitogenese	1 min
24 hpf	2 - 4min
36 hpf	5 min
48 hpf und älter	8 min

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden alle Embryonen zweimal mit DEPC-PBST gespült und anschließend wiederum 20 min bei Raumtemperatur mit 4 % PFA/ PBST auf dem Taumler nachfixiert. Durch diese Fixierung wurde gleichzeitig die Proteinase K inaktiviert. Das PFA wurde danach wieder 2 x 5 min, 1 x 10 min und 1 x 20 min in DEPC-PBST ausgewaschen.

Als nächstes schloss sich die Prähybridisierung der Proben an. Dafür mussten die Embryonen 10 min in 250 µl DEPC-PBST und 250 µl Formamidpuffer, sowie weitere 10 min in 250 µl Formamidpuffer gewaschen werden. Der Formamidpuffer wurde danach entfernt und durch 250 µl Hybridisierungspuffer ersetzt. Darin wurden die Embryonen mindestens 4 Stunden bei 68 °C im Heizblock prähybridisiert.

Nach Ablauf der Prähybridisierung erfolgte die Hybridisierung der Proben mit den *in situ*-Sonden. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei 68 °C im Heizblock, wodurch gewährleistet wurde, dass alle Komponenten, wie Puffer und Sondenmastermix, gleiche Temperaturen aufwiesen. Pro Reaktion enthielt der Sondenmastermix 3 µl Sonde und 50 µl Hybridisierungspuffer. Vom Puffer der Prähybridisierung wurde soviel entfernt, dass die Embryonen nur noch minimal damit bedeckt waren. Im Anschluss daran wurden 53 µl des auf 68 °C erhitzten Mastermixes mit Schwung auf die Embryonen pipettiert, sodass diese kurz durcheinander wirbelten.

Die Hybridisierung der Sonde erfolgte über Nacht bei 68 °C im Inkubationsschrank.

Am zweiten Tag der ISH wurde überschüssige Sonde durch zweimaliges Waschen mit auf 68 °C erhitztem Formamidpuffer entfernt. Dafür wurden die Eppis mit den jeweiligen Proben in den Heizblock überführt, die 53 µl Hybridisierungslösung weitestgehend abgenommen und durch 500 µl temperierten Formamidpuffer ersetzt. Nach 15 Minuten wurde dieser gegen frischen ausgetauscht. Weitere 15 Minuten später wurden 500 µl PBST zugegeben und die Embryonen bei Raumtemperatur auf dem Taumler weiter gewaschen. Im nächsten Schritt wurde dieses Formamid-PBST-Gemisch durch frisches DEPC-PBST ersetzt und die Proben nochmals 2 x 15 min gewaschen.

Vor der Markierung der Digoxigenin-haltigen Sonden mit dem anti-DIG-AP-Antikörper mussten noch unspezifische Bindungsstellen in den Embryonen blockiert werden. Hierfür wurden sie 30 min lang in DEPC-PBST mit 0,5 % Blockierlösung inkubiert. Die auf diese Weise behandelten Proben konnten nun zum Nachweis der Sonden mit dem anti-DIG-AP-Antikörper weiter benutzt werden. In diesem Fall wurde die Blockierlösung entfernt und durch eine antikörperhaltige 0,5 %-ige Blockierlösung ersetzt. Der AK wurde dafür 1:2000 verdünnt und mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur auf den Proben belassen.

Als letzter Schritt erfolgte die Detektion des Digoxigenins. Dafür wurden die Embryonen 3 x 5 min in frischem BCL-Puffer gewaschen und zur besseren Beobachtung der Nachweisreaktion in 48 well-plates umpipettiert. Der Waschpuffer wurde danach komplett von den Proben abgenommen und durch eine NBT/ BCIP/ X-phos-haltige BCL-Lösung ausgetauscht. NBT und BCIP/ X-phos dienen hier als Substrat für die alkalische Phosphatase, die am anti-DIG-Antikörper gebunden vorliegt. Pro ml BCL-Lösung enthielt die Nachweisreagens 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP/ X-phos. Die Farbreaktion erfolgte im Dunkeln, wurde regelmäßig auf ihren Fortschritt hin kontrolliert und nach Erreichen der gewünschten Intensität durch zweimaliges intensives Spülen mit DEPC-PBST gestoppt.

Über Nacht wurden die Embryonen bei 4 °C mit 4 % PFA/ PBST nachfixiert, was die Reaktivität der alkalischen Phosphatase endgültig hemmte.

Abschließend wurden alle Embryonen in einer aufsteigenden Glycerinreihe gespült und zur Auswertung in 70 %-igem Glycerin eingebettet.

Die Glycerinreihe beinhaltet folgende Schritte:

5 min 30% Glycerin/ 70% PBS

5 min 50% Glycerin/ 50% PBS

5 min 70% Glycerin/ 30% PBS

2.7 Morpholino-Injektion

Um die Expression eines Proteins so früh wie möglich im sich entwickelnden Zebrafischembryo zu inhibieren, wird ein Morpholino bereits im Ein- bis maximal Vierzellstadium in den Dotter eines Eis injiziert. Durch die in diesem Stadium einsetzenden Dotterströme kann der Morpholino

in die auf dem Dotter liegenden Zellen diffundieren und wird mit jeder Zellteilung auf die jeweiligen Tochterzellen aufgeteilt. Die Zeitspanne, die diesem Entwicklungsschritt entspricht, beträgt je nach Umgebungstemperatur etwa eine Stunde. Danach schließt sich die bis dahin relativ lockere Verbindung zwischen Dotter und Embryozellen, wodurch die Diffusion des Morpholinos be- bzw. verhindert wird.

Unabhängig von der Endkonzentration einer Morpholinolösung wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils etwa 5 nl eines jeden Morpholinos unter Zuhilfenahme eines Transjektors in den Dotter eines Eis injiziert. Hierfür wurden die gerade befruchteten Eier aus dem Ablanchbecken durch ein Teesieb abgeschüttet, unter leicht temperiertem Wasser kurz durchgespült und in 1x Danieau-Puffer überführt. In diesem Puffer wurden diese Eier in eine Silikonform pipettiert, die mehrere kleine Rillen aufwies. Darin wurden sie nebeneinander aufgereiht, der Puffer mit einer kleinen Pipette abgezogen und der Morpholino mit einer ausgezogenen Glaskapillare bei einem Transjektordruck von 4500 hPa injiziert. Die fertig injizierten Eier wurden in 1x E3-Embryomedium überführt und im Brutschrank bei 28,5 °C bis zum gewünschten Alter inkubiert. Um die Pigmentierung der Embryonen zu unterdrücken, wurde, wie in Kapitel III.2.3 beschrieben, PTU zum Medium zugegeben.

2.8 whole mount-Immunfärbung

Die Vorbereitung der Immunfärbung begann damit, die zu färbenden Embryonen zu dechorionieren, d.h. die Eihüllen wurden unter einem Stereomikroskop mit Hilfe spitzer Pinzetten vorsichtig aufgerissen und entfernt. Durch leichtes Schwenken der Petrischalen konnte man ohne Mühe die entfernten Chorions von den befreiten Embryonen trennen. Dabei sammelten sich die Fische im Zentrum und die Hüllen am Rand der Petrischale, von wo aus sie zusammen mit eventuell vorhandenen abgestorbenen Eiern mit einer Pipette abgesaugt und verworfen werden konnten. Nach dem Betäuben der Embryonen auf Eis konnte mit dem Fixierungsschritt fortgefahren werden. Hierfür und alle weiteren Schritte wurden sie mit einer Pipette abgesaugt und in ein mit einem Netz versehenes 2 ml Eppendorf-Tube (Eppi) überführt. Dieses Netz war die abgeschnittene Pipettenspitze einer 1 ml Pipette mit einem angeschweißten Kunststoffnetz. Die Maschenweite war mit ca. 0,5 mm so klein, dass keine Embryonen durchfallen konnten. Dadurch wurde eine bessere Handhabung bei den nachfolgenden Schritten der Immunfärbung erreicht, indem man das Netz mit einer Pinzette aus den Eppis hob und die darin enthaltene Flüssigkeit abschüttete.

Zur Fixierung wurde auf 4 °C vorgekühltes 4 %-iges PFA vorsichtig auf die Embryonen pipettiert, das Eppi verschlossen und für 4,5 Stunden waagrecht auf ein im Kühlschrank (4 °C) befindliches Drehrad gesteckt. Nach Ablauf der Fixierzeit wurde das nicht mehr benötigte PFA abgeschüttet, durch Phosphatpuffer ersetzt und die Fische darin für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Drehrad gespült. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal für weitere 5 min wiederholt.

Der anschließende Permeabilisierungsschritt begann mit einem maximal 5 Sekunden langen Spülen mit Aqua bidest, gefolgt vom eigentlichen Permeabilisieren mit -20 °C kaltem Aceton. Dieses organische Lösungsmittel macht die Lipiddoppelschichten sämtlicher Zellmembranen porös und ermöglicht so ein leichteres Eindringen von Antikörpern bei der Immunfärbung in das Präparat. Die entsprechenden Permeabilisierungszeiten richten sich nach dem Alter der jeweils verwendeten Embryonen (vgl. Kapitel III.2.8, Tabelle 6). Im Anschluss daran wurde das Aceton abgegossen und Reste davon in 4 weiteren Spülschritten ausgewaschen. Der erste Schritt mit Aqua bidest dauerte wiederum nur maximal 5 Sekunden, gefolgt von jeweils 3 x 5 Minuten langen Spülvorgängen mit Phosphatpuffer bei Raumtemperatur auf dem Drehrad.

Zur Verminderung der Autofluoreszenz der Präparate, die durch die Fixierung mit PFA eingeführt wurde, schloss sich nun ein 5 Minuten dauernder Schritt an, in dem mit einer Natriumborhydridlösung (NaBH_4) gespült wurde. Diese Lösung wurde unter dem Abzug mit einer Pasteurpipette nach und nach vorsichtig über die Embryonen pipettiert. NaBH_4 dient hier als Reduktionsmittel und entfernt so durch die Fixierung mit PFA zusätzlich eingeführte Doppelbindungen im Präparat.

Bevor nun die Antikörper für die Immunfärbung aufgetragen werden konnten, wurden Reste von NaBH_4 mit PBS solange ausgespült, bis sich keine Blasen mehr bildeten.

Im Anschluss daran wurden die Embryonen vorsichtig aus den Netzen pipettiert und in $250\ \mu\text{l}$ PCR-Eppis überführt, überschüssiges PBS abgezogen, durch PBS/ BSA/ DMSO-Lösung ersetzt und die entsprechenden Primäantikörper aufgetragen (vgl. Kapitel III.1.8.2, Tabelle 2). Unter langsamem Drehen auf dem Drehrad erfolgte über Nacht die Inkubation bei 4 °C . Am nächsten Morgen konnten nach 3 x 15 minütigem Spülen mit der PBS/ BSA/ DMSO-Lösung die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sekundäantikörper (vgl. Kapitel III.1.8.2, Tabelle 3) aufgetragen und bei Raumtemperatur ebenfalls auf dem Drehrad 2,5 Stunden inkubiert werden. Abschließend wurde wieder 3 x 15 min in PBS/ BSA/ DMSO gespült.

2.8.1 Färbeprotokoll

Schritt	Dauer	Temperatur	Reaktionsgefäß
Fixierung mit PFA	4,5 h	4 °C	2 ml Eppi mit Netz, auf Drehrad
Spülen in 1x Phosphatpuffer	2 x 5 min	Raumtemperatur	2 ml Eppi mit Netz, auf Drehrad
Spülen mit H_2O	5 sek	Raumtemperatur	Netz

Permeabilisieren in Aceton	siehe Tabelle 6, *	-20 °C	2 ml Eppi mit Netz
Spülen mit H ₂ O	5 sek	Raumtemperatur	Netz
Spülen mit 1x Phosphatpuffer	3 x 5 min	Raumtemperatur	2 ml Eppi mit Netz, auf Drehrad
Spülen mit NaBH ₄	5 min	Raumtemperatur	Netz, in Petrischälchen
Spülen mit PBS	5 min	Raumtemperatur	Netz
Primärantikörper auftragen	ON	4 °C	250 µl PCR-Eppi, auf Drehrad
Spülen mit PBS/ BSA/ DMSO	3 x 15 min	Raumtemperatur	2 ml Eppi, auf Drehrad
Sekundärantikörper auftragen	2,5 h oder ON	Raumtemperatur oder 4 °C	250 µl PCR-Eppi, auf Drehrad
Spülen mit PBS/ BSA/ DMSO	3 x 15 min oder ON	Raumtemperatur oder 4 °C	2 ml Eppi, auf Drehrad

Tabelle 5: Färbeprotokoll der Immunfärbung

* Dauer der Permeabilisierung in Abhängigkeit vom Embryonalalter:

Alter der Embryonen	Permeabilisierungsdauer
15-19 hpf	1 min
20-24 hpf	2 min
25- 30 hpf	3 min
31- 40 hpf	4 min
41-55 hpf	6 min
> 55 hpf	8 min

Tabelle 6: Permeabilisierungszeiten in Aceton

2.8.2 Einbetten der gefärbten Embryonen

Für eine Auswertung der Färbungen aus dorsaler oder ventraler Ansicht war es nötig die Dottersäcke der Embryonen in einer PBS-gefüllten Petrischale unter einem Stereomikroskop zu entfernen. Dafür wurden kleine, aus Minutiennadeln geformte Häkchen verwendet, die zur Befestigung in die angeschmolzene stumpfe Seite einer Impföse aus Plastik gesteckt wurden.

Das Einbetten erfolgte in Mowiol. Dafür wurde ein Streifen dieser Lösung auf ein zuvor beschriftetes Deckgläschen und die Embryonen mittels Häkchen hinein gegeben. Unter einem Stereomikroskop konnte man sie nun in die gewünschte Einbettposition bringen und ließ das Mowiol danach ca. 15 Minuten antrocknen; überflüssiges Mowiol wurde zuvor vorsichtig entfernt. Als Abstandhalter wurden Deckgläser mit einem Diamantstift in schmale Streifen geschnitten und jeweils 2 davon übereinander gelegt und auf beiden Seiten der Präparate platziert, ehe einige frische Tropfen Mowiol aufgetragen und ein zweites Deckglas luftblasenfrei aufgelegt wurde. Bis zu ihrer Untersuchung wurden die Präparate bei 4 °C dunkel gelagert.

2.8.3 Auswertung der Präparate

Für die Auswertung der immungefärbten Präparate kam ausschließlich das Konfokalmikroskop LSM 510 von Zeiss zur Anwendung, mit dessen Hilfe optische Schnitte in der z-Achse von den untersuchten Regionen erstellt werden konnten.

2.8.4 Quantifizierung der PSA-Menge mittels Endo:GFP-Fusionsprotein

Zur Quantifizierung der PSA-Menge im Rückenmark wurden die Embryonen, wie unter Kapitel III.2.7 beschrieben, gefärbt. Allerdings wurde hier der Primärantikörper durch das Endo:GFP-Fusionsprotein ersetzt und die Embryonen nach diesem Inkubationsschritt wie unter Kapitel III.2.8.2 eingebettet, am Konfokalmikroskop ausgewertet und gescannt. Die Analyse der PSA-Menge erfolgte über Intensitätsmessung der GFP-Fluoreszenz im Rückenmark. Hierfür wurden drei unabhängige MO-Injektionen durchgeführt und aus jedem dieser Experimente die Schwänze, wie unter Kapitel III.2.8.3 beschrieben, von fünf Embryonen gescannt. Um einen Vergleich der Intensitäten zu gewährleisten, wurden sämtliche Mikroskopeinstellungen während des Scanprozesses unverändert beibehalten.

Für die Messung der Fluoreszenzintensitäten in diesem Schwanzabschnitt wurde ein einzelner optischer Schnitt aus der Mitte des Rückenmarks verwendet, in dem die PSA-positiven Zellkörper der floor plate deutlich zu erkennen waren. Mit Hilfe der LSM 510 Software konnte man sich nun die Intensitätsverteilung entlang einer zuvor eingezeichneten Linie anzeigen lassen (vgl. IV.5, Abb. 55) Bei den gemessenen Fluoreszenzintensitäten handelte es sich um die jeweiligen Graustufen eines aufgenommenen Bildes. Im vorliegenden Fall wiesen alle Aufnahmen eine Bildtiefe von 12 Bit auf. Folglich waren theoretisch 4096 verschiedene Grautöne möglich.

Für jeden Versuchsansatz mit dem entsprechenden Morpholino wurden die Intensitäten tabellarisch erfasst und aus ihnen die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern berechnet. Aus all

diesen Mittelwerten, die aus derselben MO-Gruppe stammten, wurde wiederum ein Mittelwert mit Standardfehler ermittelt. Auf diese Weise erhielt man pro Morpholino-Injektion einen Wert für die daraus resultierende Fluoreszenzintensität im Rückenmark, die nun untereinander verglichen werden konnten.

2.9 Datenanalyse und Bildbearbeitung

Zur Bearbeitung und Auswertung von Daten kam verschiedene Software zum Einsatz, unter anderem DNASTar (Lasergene), Chromas, Origin 6.0 (Microcal) und LSM510 (Zeiss). Sequenzen wurden teilweise auch mit online verfügbaren Datenbanken analysiert:

Ensemble: www.ensembl.org,

PubMed: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi,

Expasy: www.expasy.org,

Webcutter: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>,

Primer3: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

Die Bildbearbeitung erfolgte ausnahmslos mit Adobe Photoshop 6.0 und CorelDraw 10.

IV. Ergebnisse

1. Klonierung der 3'UTRs der CAMs

Um heraus zu finden, ob die im Zebrafisch vorkommenden Zelladhäsionsmoleküle zNCAM, zOCAM und zPCAM in der 3' untranslatierten Region (UTR) ihrer mRNAs ein CPE-Motiv enthalten, wurden diese kloniert und sequenziert. Ziel der Untersuchungen war es, das propagierte Modell eines möglichen CPE-abhängigen mRNA-Transports in die Axone der Motoneurone zu überprüfen.

Alle Klonierungsergebnisse wurden auf der Ebene von mRNA erzielt. Trotzdem sind die entsprechenden Sequenzen zur Vereinfachung mit Thymidin (T) anstatt Uracil (U) dargestellt.

1.1. zNCAM 3'UTR

Die Analyse der klonierten zNCAM 3'UTR ergab, dass 473 Basen nach dem Stop-Codon ein CPE-Motiv mit der Sequenz TTTTAT vorhanden ist. Ebenfalls kommt 161 Basen downstream davon das Poly(A)-Signal mit der Sequenz AATAAA vor (Abb. 20/ 21). Insgesamt hat die klonierte 3'UTR eine Länge von 873 Basen, davon wurden die ersten 79 Basen von Mizuno et al., 2001 publiziert.



Abb. 20: Schematische Darstellung der zNCAM-mRNA mit ihren 3'UTR-Motiven

rot = CPE-Motiv, blau = Poly(A)-Signal

```

TGGGAAATCAGCAGCAGTTCGCGACAGACAGCACCACACCACCACCTTCTCAGATACAAGGCTTTCAGTAACTGTGTCTCTTTGA      2607
GTTTCGCAGAACAAAAACATCTGTAGATGTATAGAGCACCTAAAGAGCTCGCACACTTGCCCTTTGATTTTGTACTTTTCATTTGTTATC      2697
ACTATTGAAATGTCGTTTCTTTCAAAAAACGCAAGAAGGAAAGATTCTTCACCTCTAGCACAGTCTCCTTGACCTCTGTGAGTAAGACCA      2787
GCATCTTTCAAGTACACTCAGTTTTTGTGTTTTTTGAGGAAGAGAAATTTGCTTTTACACATTCAGCCAGCGAGATGTTTCAGTTAAGT      2877
CCCGTCTTATAACATGCAGTATGCCATCATTATTGTCTGCCACATTCATTCTTTTGGGAACATTTTAAATGTTTACTTGTGTTTAA      2967
ATAATGTACAAAAACAACCGCCTTTTTATTTTTTTTACATGATTTTAGCGCTAGATTTTAGCACGCTTGCTTTGCAGAATGATT      3057
CCAGCCCTGAGTATTCACAGCATTTTACTTTGATAAAAACCTGCTGTTTGCTTCACAGAAGATTACACAAACTAAAGGTCTGAACTAGTGG      3147
TTAGGTTTGAATAAATAATCGCCACTTTATTTTCTGTTTTTACACATACTTTTCAATTTTACAACACATGCCGTTTTCTCTGAGCCTCAGGGT      3237
TCCTTCCATTTAGTTTTGGTTTTTAGAGCAGGATTGAGAGTCAAATAGGTCTCCACAGTGATCTTTGCTTAAAAACGTCCCGCAAGTCC      3327
TTTAAAAAACATTAGGAACAACCTCGGAGCTCTTAGATATGGATCGAATGGCTCCTTGAGAGG - 3'      3390

```

Abb. 21: Sequenz der zNCAM 3'UTR

Gezeigt ist die Sequenz der zNCAM 3'UTR. Die nicht unterstrichenen Bereiche entsprechen der 3'UTR-Sequenz, wie sie von Mizuno et al. (2001) publiziert wurden. Der unterstrichene Bereich ist Ergebnis der Klonierung und enthält das CPE-Motiv (rot), sowie das Poly(A)-Signal (blau).

1.2 zPCAM 3'UTR

Die Analyse der klonierten zPCAM 3'UTR ergab, dass 364 Basen nach dem Stop-Codon ein CPE-Motiv mit der Sequenz TTTTAT vorhanden ist, das möglicherweise ebenfalls für den Transport der mRNA aus dem Zellkörper in das Axon verantwortlich ist. Ein Poly(A)-Signal wie in der zNCAM 3'UTR wurde nicht gefunden. Insgesamt hat die klonierte 3'UTR eine Länge von 661 Basen, von denen die ersten 432 Basen von Mizuno et al. 2001 publiziert wurden.

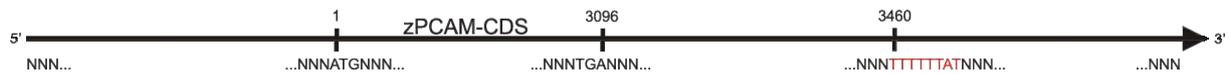


Abb. 22: Schematische Darstellung der zPCAM-mRNA mit ihrem 3'UTR-Motiv

rot = CPE-Motiv

```

AACCACCGATGGAGAAGAAAAGTGTTCATGATGACCATGAACGCTGTTTGTAAATCAGTGCCTTAAAGATTTTCTCAAACGAAACGGTGT      3186
ATATTCTATACAGAAGTCTCATTTATAATGTGCATTTTCTTTTATTTTGGAGTAAAGATTCGAGTAAACTTCCAGAAGCTTCTATTTGA      3276
GGACTTAAATCAAATTCATTTAAAACAAAATGCTCTTGTAGAAACTCTTGTGTGTTTTTGTATTTTATTTTATTTCTTTTCTTTGATG      3366
ATCCAACAGGGCAAGCTATTCAGGAGAATTATATATTCAGTAATATGTTTTATTTCGCATAAAACATTGTTAAAATGTAATGATTTCTGA      3456
TATTTTTTATCTTGAGTGTGTTGAGGGCTAGGTTTGGTTTGTCTTTTATTAATTTTATCATTATGTTTTAATTACACGTAACGTTTTG      3546
CCTCTTGGATGATATAATTACTCATGATGGCAGTTATGTAACACAAAAATATCTTAAAGATATTTAACATACTGTTATGACCAAGGATCT      3636
GATAAAGATTCAAGTTAGCCATTTGATTGGTTGAAGTCTTTATTAGATCAGTTTTTTACAGTTGTGCGGTGATTTCTAATATCTGAGA      3726
TTAATACTTTCAATCATCTTCCACGTGC - 3'      3757

```

Abb. 23: Sequenz der zPCAM-mRNA mit 3'UTR

Gezeigt ist die Sequenz der zPCAM 3'UTR. Die nicht unterstrichenen Bereiche entsprechen der 3'UTR-Sequenz, wie sie von Mizuno et al. (2001) publiziert wurden und enthalten das CPE-Motiv (rot). Der unterstrichene Bereich ist Ergebnis der Klonierung.

1.3 zOCAM 3'UTR

Die Klonierung und Sequenzierung der zOCAM 3'UTR ergab, dass diese kein CPE-Motiv, dafür aber zwei Poly(A)-Signale enthält. Insgesamt hat die klonierte 3'UTR eine Länge von 1466 Basen, von denen die ersten 442 Basen von Mizuno et al. (2001) publiziert wurden. Da zOCAM im untersuchten Alter von 36 hpf lediglich in kleinen Clustern der olfaktorischen Plakode exprimiert wird (vgl. Kapitel IV2.2), spielt es für eine PSA-Expression auf den Motoraxonen in dieser Phase der Entwicklung offensichtlich keine Rolle. Aus diesem Grund wird in den nachfolgenden Experimenten, mit Ausnahme der *in situ*-Hybridisierung, nicht weiter auf zOCAM eingegangen.

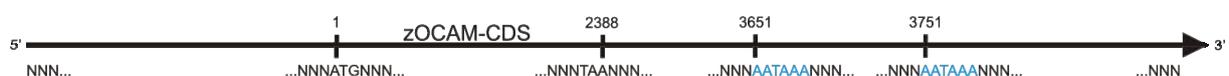


Abb. 24: Schematische Darstellung der zOCAM-mRNA mit ihren 3'UTR-Motiven

blau = Poly(A)-Signale

```

TGGAGGCCCTGCGACCCTCTAAAAGAACATGCAAAGTGAGCCACCCGGAGACCAATAGCAAGCAAACAACGAGAATACAAGCAAGAACA      2478
CGCCAATCAATTGTAAGATCCTTTGTTAGAGACTCCTTGTGCGGGTGTGAGAAAGGCCATGCGAAAACCTGCTTTTGTGAAACATTTTTC      2568
GAAGGTTGCCGCTCAACAGACAGGCTCCTGTTTATTTGTGCTTGTTCGCTTGTTTTCAGTCTTTAGTTTCTCTTTAAGGCTTGTCT      2658
GTTGCTTTGAGTCTTTGTTATTTGAAGAGGTTTGATCTAAGCGGACAAGCGTCACAATTTTTCTCTCGCTCTCATTGAGTCTTTCTCTGG      2748
AATCCGGCCGTTGCACTTTTTTCCAGTGTGGTTGCGCAAACACGTCGTTGGAGGCCCTGCGACCCTCTAAAAGAACATGCAAAGTGAGCCA      2838
CCCGGAGACCAATAGCAAGCAAACAACGAGAATACAAGCAAGAACACGCCAATCAATTGTAAGATCCTTTGTTAGAGACTCCTTGTGCGG      2928
GGTGTGAGAAGAGGCCATGCGAAAACCTGCTTTTGTGAAACATTTTTCGAAGGTTGCCGCTCAACAGACAGGCTCCTGTTTATTTGTGCTT      3018
GTTCTCGCTTGTTTTCAGTCTTTAGTTTCTTCCTTTAAGGCTTTGCTGTTGCTTTGAGTCTTTGTTATTTGAAGAGGTTTGATCTACGCG      3108
GACAAGCGTCACAATTTTTCTCTCGCTCTCATTGAGTCTTTCTCTGGAATCCGGCCGTTGCACTTTTTTCCAGTGTGGTTGCGCAAACAC      3198
GTCGCTTTTTAATACATCATTTCACTCGAGATTAACCGGTGGAACCTCCACACCTCTGTTTGCAGTCCGTTGTTGTTTTGGGTGACTG      3288
TTTGAGTAATGTGTTGGGTTTTTTGTTTTTTTTTAAAGCCTTTTGGCACTGTGTGTCTCACCCAAATGTGAAGAATTTTTCGAATGCTC      3378
AATAGCAAAGCGAGGATCAACCACGCTTGACCCACAGACTGAGTATGTGGTGGTCCCGTAACTCTTCGGATTGAACAATGAATAGATTAC      3468
AAGTGTTTTTGTGGATGAAAATATGTCCTCGTTTTCAACACTTTTGTTCATCACTCAAAGGAGCCCAATGTGTGTCATGGATTGATTGTT      3558
TAAGATATTTTCGAAACAAAAGAGAACAAAAAAGAGTCTTTTCTTTTCAAAGCGTCCGAGGAAAGTAGAGGTTGCCAAGTCTTGCAAT      3648
AAATAAAGATTAGGAAAATATAAAGAAGAAAAAAGATTTTCCAGTGCACAGATGTAAATATAATTGTTATTCTTTGGAGCATTTC      3738
ACAAAAGAAAAAATAAATATGATTCACTACAAATCTGTGCATATTACTGATAAGTTATTAATATTGGCAATCTTAAAAGATTCATTAA      3828
GAACTCATCAAGAGCTAAAGAAGGGC - 3'      3854
    
```

Abb. 25: Sequenz der zOCAM 3'UTR

Gezeigt ist die Sequenz der zOCAM 3'UTR mit den beiden darin enthaltenen Poly(A)-Signalen (blau). Die nicht unterstrichenen Bereiche entsprechen der zOCAM-Sequenz, wie sie von Mizuno et al. (2001) publiziert wurden. Der unterstrichene Bereich ist Ergebnis der Klonierung. Beide Abschnitte enthalten kein CPE-Motiv.

1.4 zNCAM enthält ein alternatives Exon

Bei der Klonierung der zNCAM 3'UTR aus embryonaler cDNA und cDNA aus adulten Gehirnen mit dem Primern zNCAM 3 for und 4 rev sowie 5 rev und 6 rev traten wiederholt Doppel- bzw. Dreifachbanden bei der Auswertung der entsprechenden PCRs mittels Agarose-Gel-Elektrophorese auf (Abb. 26). Um deren Ursache aufzuklären, wurden die PCR-Produkte EN34 und GN34 kloniert, amplifiziert und anschließend sequenziert.

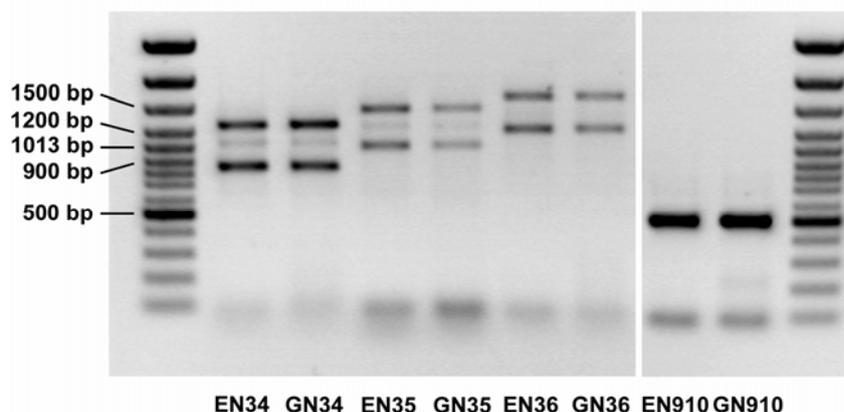


Abb. 26: Doppelbanden bei der Klonierung der zNCAM 3'UTR

Die Abbildung zeigt die bei der Klonierung der zNCAM 3'UTR aufgetretenen Doppel- bzw. Dreifachbanden und das amplifizierte alternative Exon aus dem die *in situ*-Sonde hergestellt wurde. E = embryonale cDNA, G = cDNA aus dem adulten Gehirn, die Zahlen geben jeweils die Primerkombinationen an (34 = 3 for + 4 rev usw.).

Die Auswertung der Sequenzierung zeigte, dass es sich bei den Doppelbanden um Fragmente von zNCAM handelte, von denen die größere von beiden ein alternatives Exon enthielt, das zwischen Exon 15 und 16 inseriert und eine Länge von 423 bp aufweist (Abb. 27). Das Ende von Exon 15 entspricht Aminosäure 797. Folglich ist dieses alternative Exon Teil der cytoplasmatischen Domäne von zNCAM.

Trotz zweimaligem Sequenzieren der Klone EN34 und GN34 wies die Exonsequenz einen Fehler im Leseraster auf, was zur Folge hatte, dass das Stopcodon am Ende von Exon 16 für die Ribosomen nicht mehr zu erkennen wäre. Aus diesem Grund ist hier die Aminosäuresequenz des Exons nicht dargestellt (Abb. 28).

Die Amplifizierung dieses Exons mit den Primern zNCAM 9 for am Ende von Exon 15 und 10 rev am Anfang von Exon 16 (Abb. 26) ergab ein sauberes PCR-Produkt von 501 bp Länge, aus dem die *in situ*-Sonde nach dem oben beschriebenen Protokoll hergestellt wurde. Die kleine Bande im Bereich von 100 bp entspricht entweder ungebundenen Primern oder aber dem PCR-Produkt aus zNCAM 9 for und 10 rev, wenn das alternative Exon nicht exprimiert wird. Es besteht lediglich aus dem Ende von Exon 15 und dem Anfang von Exon 16 und hat eine theoretische Länge von 77 bp.

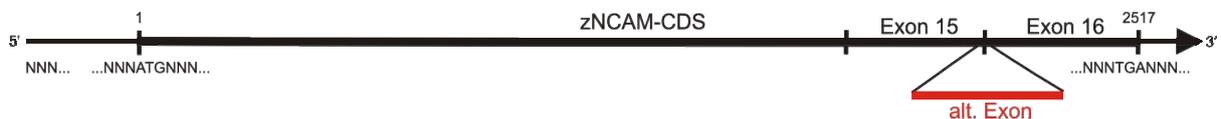


Abb. 27: Schematische Darstellung der Insertionsstelle des alternativen zNCAM-Exons

```

ATCGAGGAGGGAAAAGCTGCCTTCACTAAGGATGAATCTAAGGAGCCTATTGTGGAGGTAAAGAACTGAAGAAGAGCGCACACCAAATCAC      2340
 I E E G K A A F T K D E S K E P I V E V R T E E E R T P N H

GAGGGAGGAGGCCAACTGAACCCAACGAGACCACCCCTCTGACCGACCCCGCACGCTGTGACACCACAGCAACAGTAGTGGACTTGGCT      2430
 E G G G P T E P N E T T P L T D P

TCCCTCTGTAACCACTAACTCAGACCCCGGCACTGAAAGTCCGGCTAGCGATAGCACCACCCTTACCACCAGCACCGACCCTAAACCTAC      2520

TCCCAATCCAGCACCCCAAACTAGCGTCACCTCTCCACCTCCCTCCTCAAGCCGTGGCCCTCTGGTGGACCTGAGTGAAACACC      2610

CTCCAACAGACCTCAAAGTCCTTAGATGATTCAAGCCCGCAGAAGTGGCCAGAGCCGATGGCCAGAGCCCGGCTGAGCCGGCCAAAGC      2700

CCCCAAAGTAAGGACTCTCAGGTACAAGCAGGATCCCACCAGACCAGATAGTGACCCTGCCAAGAATTCCAGCGACTCCTCCAGCGC      2790

ACCGTCCGCACCCAACAGGACGAGACGGTAAAAATCATTGTAGATGACAAAAGTAAAGCGCCGAGACGGAGGTTAAGAAACCCCGGCG      2880
          D G K I I V D D K S K A P E T E V K K P P A

GAGGTGAAGACAGTCCCAATGAAGCCCGCAGGCGAACGGCAACGAGAGCAAAGCATGA      2940
 E V K T V P N E A P Q A N G N E S K A -
    
```

Abb. 28: codierende Sequenz von zNCAM mit alternativem Exon

Die dargestellte Sequenz zeigt einen Teil der codierenden Sequenz von zNCAM mit dem eingefügten alternativen Exon (rot). Darunter steht der Einbuchstabencode der Aminosäuresequenz. Für das alternative Exon konnte diese Darstellung nicht erfolgen, da die Sequenzierung nicht zu 100 % korrekt ist und einen Fehler aufweist, was eine Verschiebung des Leserasters zur Folge hat. Somit ist das Stopcodon nicht mehr zu lesen.

2. Expressionsanalyse der CAMs mittels *in situ*-Hybridisierung

Eine Analyse der Expression von zNCAM, zPCAM und zOCAM mittels *in situ*-Hybridisierung wurde bereits 2001 von Mizuno et al. publiziert. Die in dieser Publikation veröffentlichten Expressionsmuster von zNCAM und zPCAM wurden nur bis ins Alter von 30 hpf gezeigt. Eine Expression von PSA auf den Motoraxonen setzt erst ab etwa 34 hpf ein und ist ab diesem Zeitpunkt sicher auf den Axonen immunhistologisch nachweisbar. Deswegen sollten die Expressionsmuster der potentiellen PSA-Akzeptoren im Zebrafisch über 30 hpf hinaus analysiert werden.

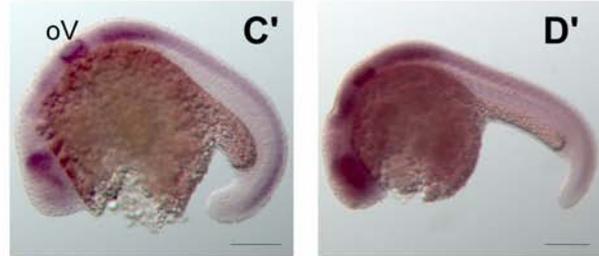
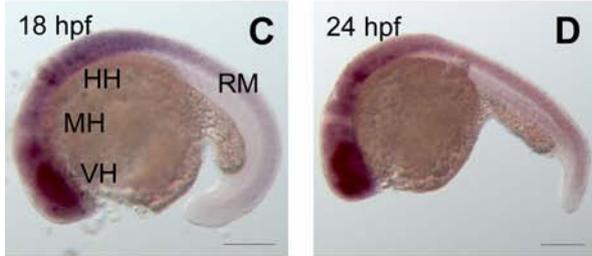
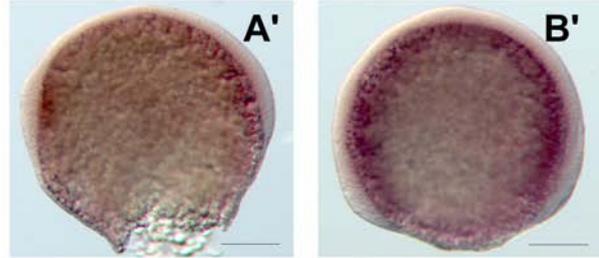
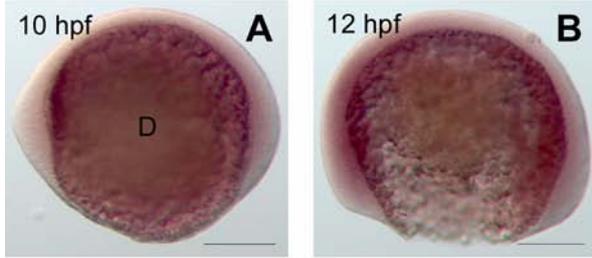
2.1 Expression von zNCAM und zPCAM

Die Ergebnisse von Mizuno et al. (2001) konnten mit den vorliegenden eigenen *in situ*-Hybridisierungen weitestgehend bestätigt werden. Mizuno et al. hatten den Beginn der zNCAM-Expression im Vorderhirn im Alter von 11 hpf nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einsetzen der Expression im Alter von 12 hpf gezeigt werden. Ab diesem Zeitpunkt breitet sich die Expression von rostral nach caudal vom Vorderhirn, über das Mittel- und Hinterhirn bis ins Rückenmark aus (Abb. 29C). Deutlich zu sehen ist dabei ein Streifenmuster im Hinterhirn, bei denen es sich um die einzelnen Rhombomere handelt. Bis ins Alter von 30 hpf intensiviert sich die Expression in diesen Arealen und erreicht ein Maximum. Hirnareale, die bis dahin noch zNCAM- bzw. zPCAM-negativ waren, sind ab diesem Stadium zNCAM- und zPCAM-positiv. Dieser Befund entspricht den Ergebnissen von Mizuno et al.. Im weiteren Verlauf der Entwicklung verringert sich die Expression von zNCAM im Rückenmark allmählich und ist im Alter von 72 hpf nicht mehr nachweisbar. Insgesamt bleibt sie im Gehirn aber auf einem hohen Niveau.

Die Befunde bezüglich der zPCAM-Expression decken sich prinzipiell mit denen von Mizuno et al.. Allerdings ist ein Einsetzen der Expression erst nach 12 hpf zu sehen. Danach gleicht das Muster dem von Mizuno beschriebenen. zPCAM-mRNA ist deutlich im otischen Vesikel, Vorderhirn und Rückenmark zu erkennen (Abb. 29C'). Allmählich schließen sich dann auch hier die bis dahin noch offenen Expressionslücken im Gehirn. Ähnlich wie bei der zNCAM-Expression wird ebenfalls im Alter von 30 hpf ein Expressionsmaximum erreicht und zPCAM-mRNA ist im Gehirn und Rückenmark nachweisbar. Je weiter die Entwicklung voranschreitet, desto schwächer wird die zPCAM-Expression vor allem im Rückenmark und ist ab etwa 48 hpf nicht mehr nachweisbar. Auch verringert sich die Expression im Gehirn, im Vergleich zur zNCAM-Expression deutlich. Zwar ist sie bis ins Alter von 72 hpf nicht komplett verschwunden, aber doch merklich reduziert.

zNCAM

zPCAM



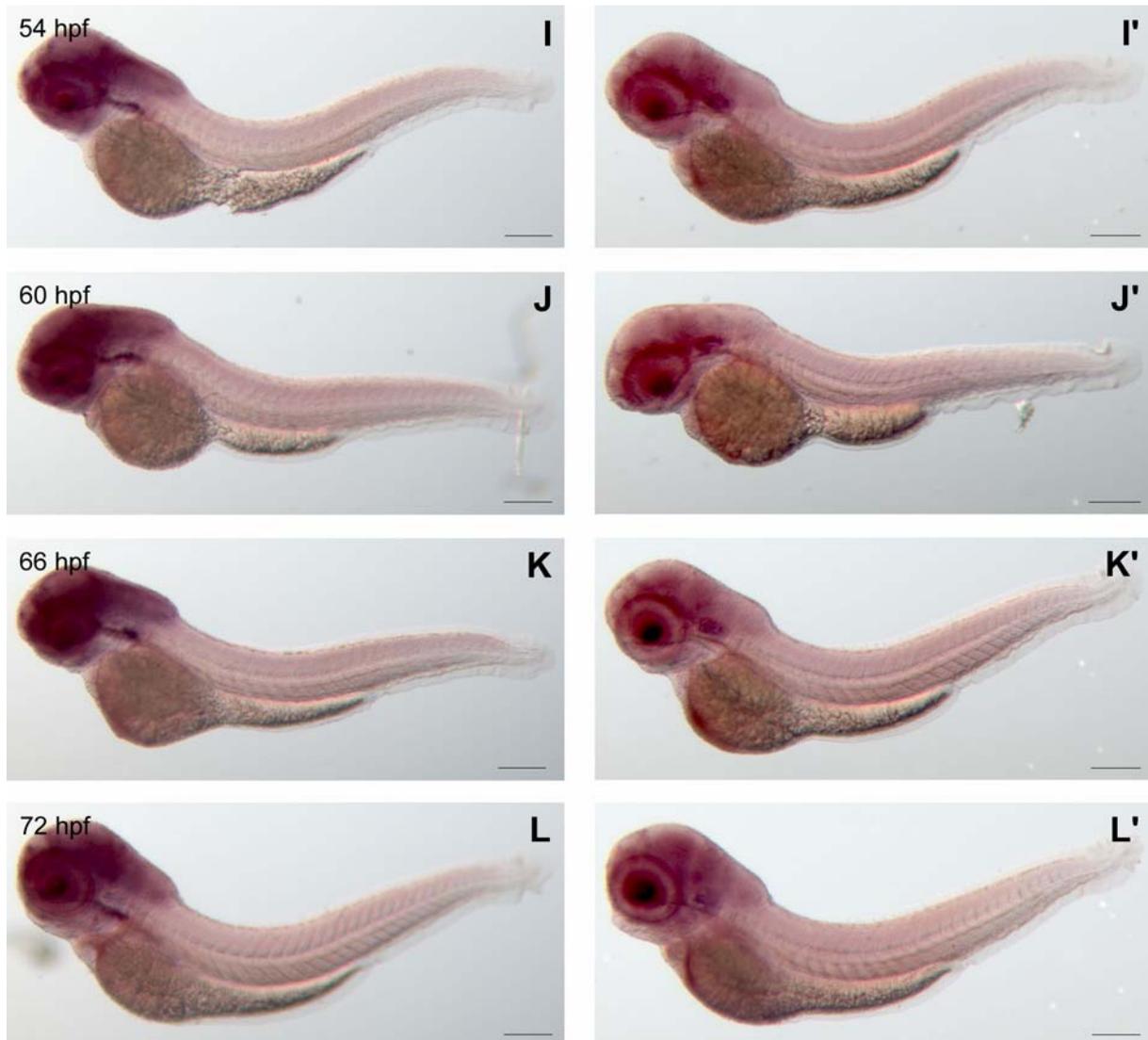


Abb. 29: Expression von zNCAM und zPCAM

Die Bilder A-L zeigen die *in situ*-Analyse der zNCAM Expression im Alter von 10 bis 72 hpf, A'-L' die der zPCAM-Expression. Die zNCAM-Expression setzt im Alter von 12 hpf im Bereich des Vorderhirns ein und schreitet im Lauf der Embryonalentwicklung nach rostral bis ins Rückenmark voran. Die Intensität der Expression im Gehirn erreicht bis 30 hpf ihr Maximum und nimmt danach allmählich ab. Die Expression im Rückenmark geht so weit zurück, bis sie im Alter von 72 hpf kaum noch nachweisbar ist. Im Vergleich zu zNCAM setzt die zPCAM-Expression erst nach 12 hpf ein und ist im Alter von 18 hpf vor allem im otischen Vesikel, im Rückenmark und im Vorderhirn zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird die mosaikhafte zPCAM-Expression im Gehirn geschlossen und ist bereits ab 48 hpf nur noch im Gehirn nachweisbar. Au – Auge, D – Dottersack, HH – Hinterhirn, MH – Mittelhirn, oV – otischer Vesikel, RM – Rückenmark, VH - Vorderhirn; Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

2.2 Expression von zOCAM

Mizuno et al. hatten 2001 gezeigt, dass die zOCAM-Expression erst im Alter von 30 hpf einsetzt und hier auch nur in Clustern der olfaktorischen Plakode. In dieser Arbeit war die Expression in diesen Bereichen noch so schwach, dass sie mit den Augen kaum sichtbar war (Pfeilspitzen in Abb. 30C und C'). Erst im Laufe der weiteren Entwicklung bis 54 hpf intensiviert sie sich in einem solchen Maß, dass sie deutlich in den Ventralaufnahmen der Embryonenköpfe zu erkennen ist.

Danach setzt wieder eine leichte Reduktion der Expression ein und nach 72 hpf sind diese Cluster in der Ventralansicht nur noch schwer zu erkennen. Dabei handelt es sich aber offenbar um ein Artefakt, mit außerhalb der Fokusebene liegenden olfaktorischen Clustern. Die Lateralansicht von 63 und 72 hpf alten Embryonen zeigt hier noch ein deutliches Signal innerhalb der olfaktorischen Plakode (vgl. Abb. 30 G und H).

Nach der Untersuchung älterer Stadien wird offensichtlich, dass ab etwa 48 hpf eine zusätzliche Expression im Vorder- Mittel- und Hinterhirn einsetzt, die sich bis 72 hpf manifestiert und in diesem Alter auch in der Retina nachweisbar ist.

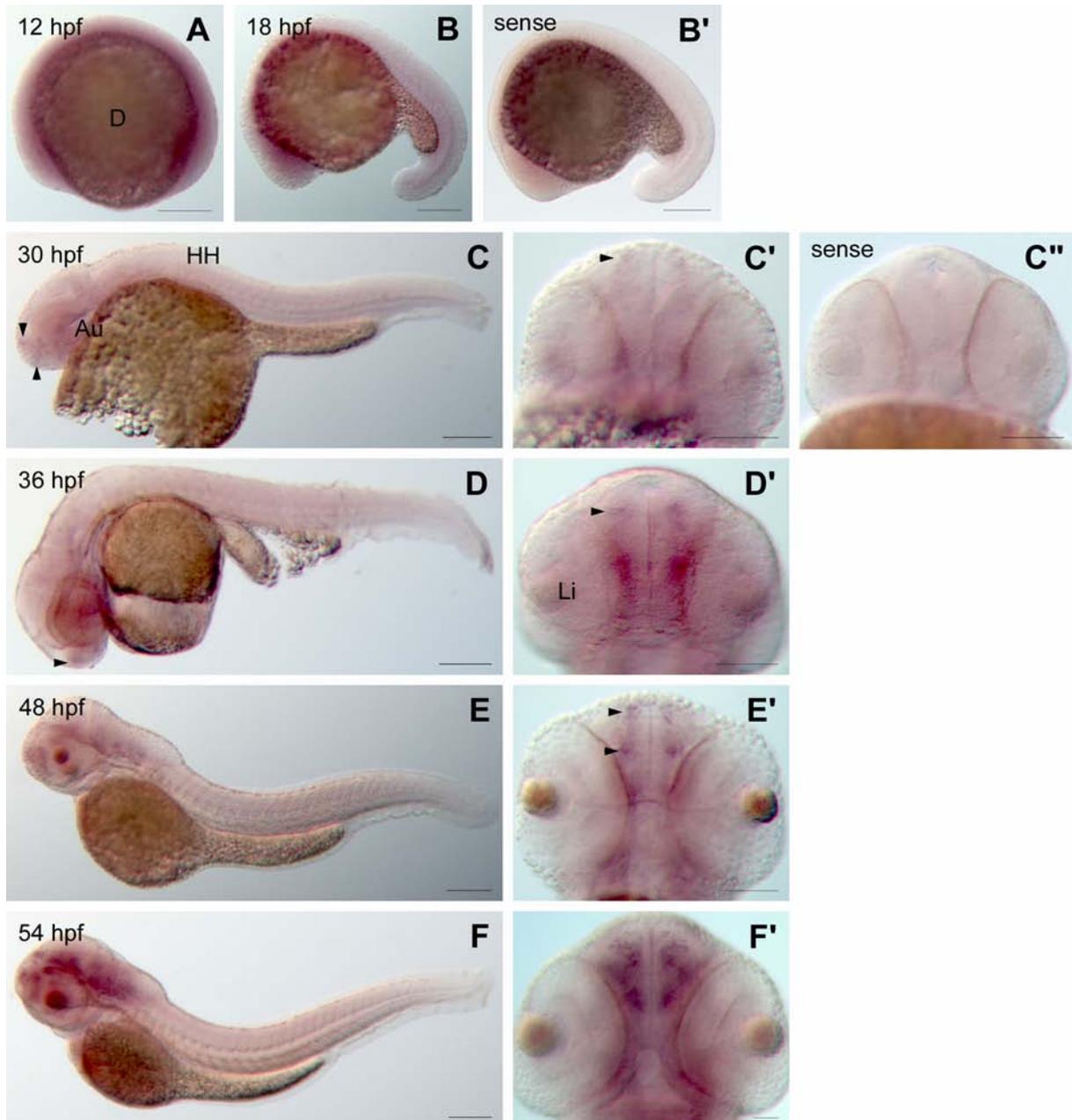




Abb. 30: Expression von zOCAM

Die Bilder A-H zeigen die *in situ*-Analyse der zOCAM Expression im Alter von 10 bis 72 hpf, C'-H' sind Ventralaufnahmen des jeweiligen Stadiums. Im Alter von 30 hpf setzt die zOCAM-Expression in Kernen der olfaktorischen Plakode im Vorder- bzw. Mittelhirn ein (Pfeilspitzen). In der weiteren Entwicklung wird sie deutlicher und bleibt bis ins Alter von 48 hpf auch nur auf diese beiden Kerngebiete beschränkt. Erst dann setzt eine zusätzliche Expression im Vorder-, Mittel- und Hinterhirn ein, die sich bis 72 hpf manifestiert und auch in der Retina nachweisbar ist. B' und C'' zeigen die jeweiligen sense-Kontrollen. Au – Auge, D – Dottersack, HH – Hinterhirn, Li – Linse, R – Retina, RM – Rückenmark; Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm (A-H), (C'-E' 100 μm), (F'-H' 50 μm)

2.3 Expression des alternativen zNCAM-Exons

Die Expression des alternativen zNCAM-Exons überlappt insgesamt mit der von zNCAM. Zwar setzt sie zeitversetzt erst ab etwa 18 hpf ein und schreitet dann vom Vorderhirn ausgehend über Mittel- und Hinterhirn bis ins Rückenmark fort. Im Alter von 30 hpf wird hier im Gegensatz zu zNCAM nur ein Expressionsmaximum im Rückenmark erreicht. Danach setzt wieder eine Reduktion der Expression ein und ist ab ca. 66 hpf nicht mehr im Rückenmark nachweisbar. Das Maximum der Expression im Gehirn wird erst nach 42 hpf erreicht und bleibt bis 72 hpf auf einem hohen Level (Abb. 31).

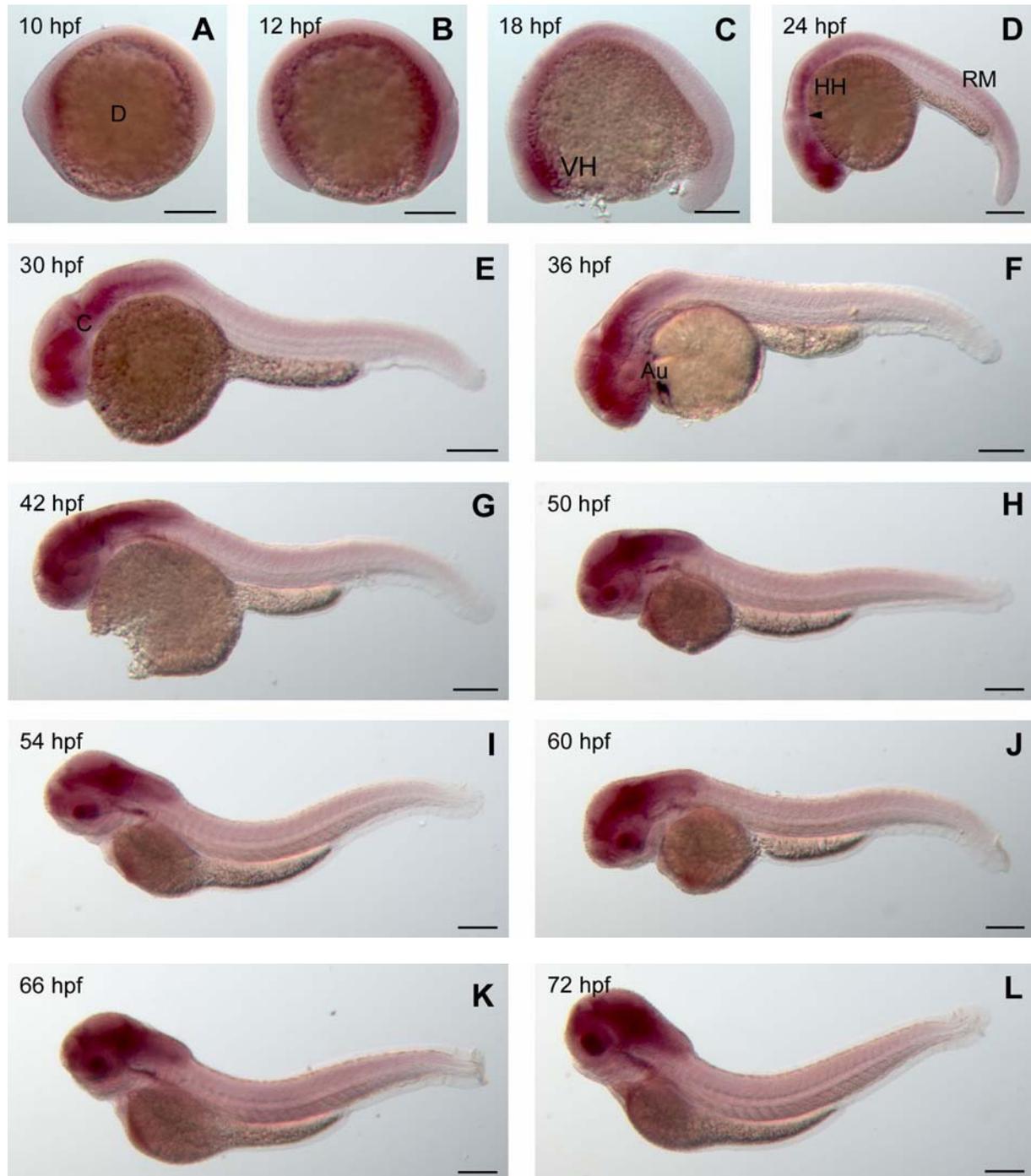


Abb. 31: Expression des alternativen zNCAM-Exons

Die Bilder A-L zeigen die *in situ*-Analyse der Expression des alternativen zNCAM-Exons im Alter von 10 bis 72 hpf. Die Expression setzt hier erst zwischen 12 und 18 hpf im Bereich des Vorderhirns ein und pflanzt sich im Lauf der Embryonalentwicklung nach rostral vom Vorderhirn über das Mittel- und Hinterhirn bis ins Rückenmark fort. Auch hier nimmt die Intensität der Expression im Gehirn bis 42 hpf immer weiter zu, wohingegen die der Expression im Rückenmark ab 30 hpf wieder abnimmt, bis sie im Alter von 66 hpf kaum noch nachweisbar ist. Au – Auge, C und Pfeilspitze – Cerebellum, D – Dottersack, HH – Hinterhirn, oV – otischer Vesikel, RM – Rückenmark, VH - Vorderhirn; Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Nachdem durch die hier gezeigten *in situ*-Hybridisierungen die Expressionsmuster der jeweiligen CAMs aufgeklärt wurden, konnte mit den Untersuchungen zur Rolle der PSA-Expression fortgefahren werden.

3. Analyse der PSA-Expression nach zNCAM-Knockdown

Dieser erste Versuchsansatz umfasste die Injektion von Kontroll-, zNCAM 5'UTR-, zNCAM 3'UTR- und zNCAM CPE-Morpholinos. Als Ausgangskonzentration wurden jeweils 1,25 ng/ nl injiziert, womit deren Auswirkung auf die Expression von PSA auf den Motoraxonen 36 hpf alter Zebrafischembryonen gezeigt werden sollte.

3.1 Entwicklungsfähigkeit und Überlebensraten der Embryonen

Zur Überprüfung eines möglichen Effektes der injizierten zNCAM-Morpholinos und des Kontroll-MOs auf die Entwicklungs- und Lebensfähigkeit der Embryonen wurden ihre Phänotypen und Überlebensraten nach der Injektion der jeweiligen Morpholinos bestimmt. Dabei zeigte sich, dass alle vier MOs keinen offensichtlichen Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen haben. Sie alle entwickelten sich äußerlich normal und zeigten keine Auffälligkeiten (Abb. 32).

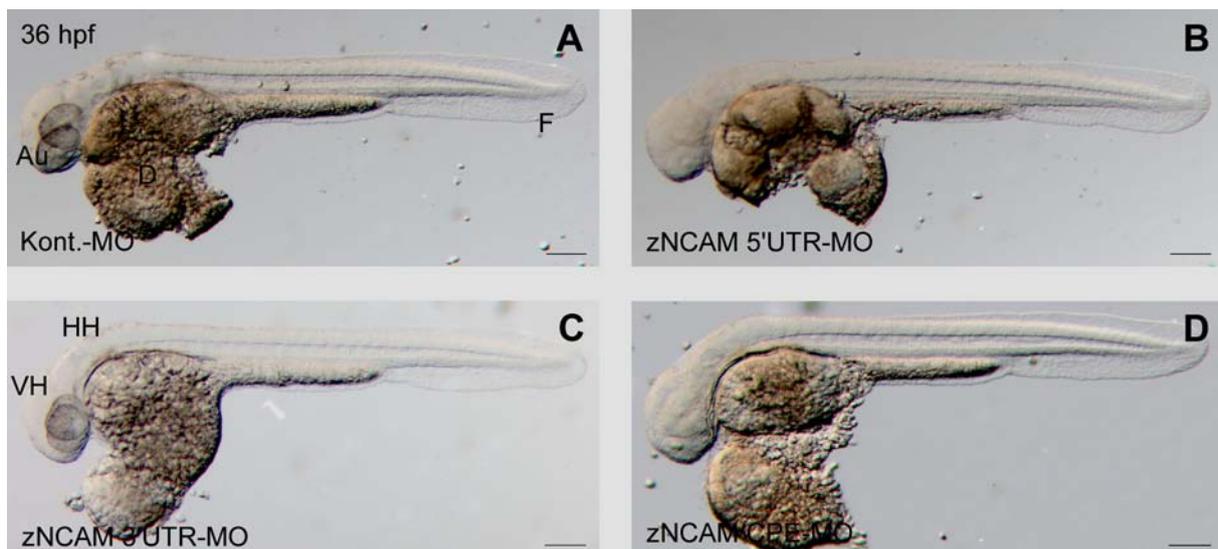


Abb. 32: Phänotyp nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl) im Alter von 36 hpf

Die Abbildungen A-D zeigen die Phänotypen von Kontroll-MO-, zNCAM 5'UTR-MO-, zNCAM 3'UTR-MO und zNCAM CPE-MO-injizierten Embryonen. In allen Fällen war der Phänotyp unverändert, die verschiedenen Morpholinos haben offensichtlich keinen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen. Die dunklere Pigmentierung der Augen in A und C geht auf einen heterozygot goldenen Pigmentierungshintergrund nach Kreuzung von goldenen und wildtypfarbenen Elterntieren zurück. In B und D sind beide Embryonen homozygot golden. Au – Auge, D – Dottersack, F – Flossensaum, HH – Hinterhirn, VH – Vorderhirn; Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

Es zeigte sich weiterhin, dass die Überlebensraten insgesamt abnahmen. Nach fünf unabhängigen Injektionen erreichten zwischen 45 und 59,3 % aller zNCAM-MO und 71 % aller Kontroll-MO injizierten Embryonen das gewünschte Alter von 36 hpf und konnten für die

anschließende Untersuchung der PSA-Expression mittels Immunhistochemie weiterverwendet werden (Abb. 33). Entweder hat der Prozess des Injizierens bereits einen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der so behandelten Embryonen oder die Qualität der Eier ist innerhalb eines Geleges nicht homogen.

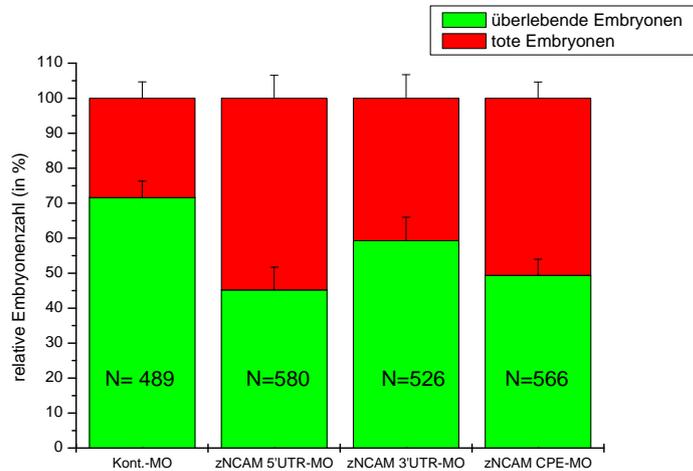


Abb. 33: Überlebensraten nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)

Nach der Auswertung von fünf unabhängigen Injektionsexperimenten zeigte sich, dass 71,63 % aller Kontroll-Morpholino injizierten, 45,19 % der zNCAM 5'UTR-MO-, 59,27 % der zNCAM 3'UTR-MO und 49,37 % der zNCAM CPE-MO injizierten Embryonen überlebten. Die Anzahl zNCAM 5'UTR- und zNCAM CPE-MO injizierter, überlebender Embryonen unterschied sich dabei signifikant von der Kontrolle. N = Gesamtzahl der Embryonen

3.2. PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen

Für die Analyse der PSA-Expression nach Morpholino-Injektion wurde hier der in Abb. 34 rot eingerahmte Schwanzbereich von 36 hpf alten Embryonen betrachtet. Dieser enthält die ersten, ab 17 hpf gebildeten Motoneurone. Somiten und die sie innervierenden Motoraxone aus der Schwanzspitze beispielsweise werden später in der Entwicklung gebildet und sind somit ontogenetisch jünger als deren Pendant im vorderen Schwanzabschnitt und exprimieren noch keine oder erst wenig PSA.

In der Kontrollgruppe war PSA auf den Zellkörpern des Rückenmarks, den Axonen der Motoneurone und dem Seitenliniennerv nachweisbar und erschien dabei in der Menge normal. Gleiches gilt für die Situation nach der Injektion von zNCAM 3'UTR- und zNCAM CPE-Morpholinos. Als Referenz hierfür dienten unbehandelte Embryonen, die nicht statistisch erfasst wurden. Lediglich im Fall des zNCAM 5'UTR-Morpholinos war die PSA-Menge im Rückenmark und auf den Motoraxonen reduziert, trotzdem aber noch auf den Zellkörpern im Rückenmark und auf den Motoraxonen zu finden.

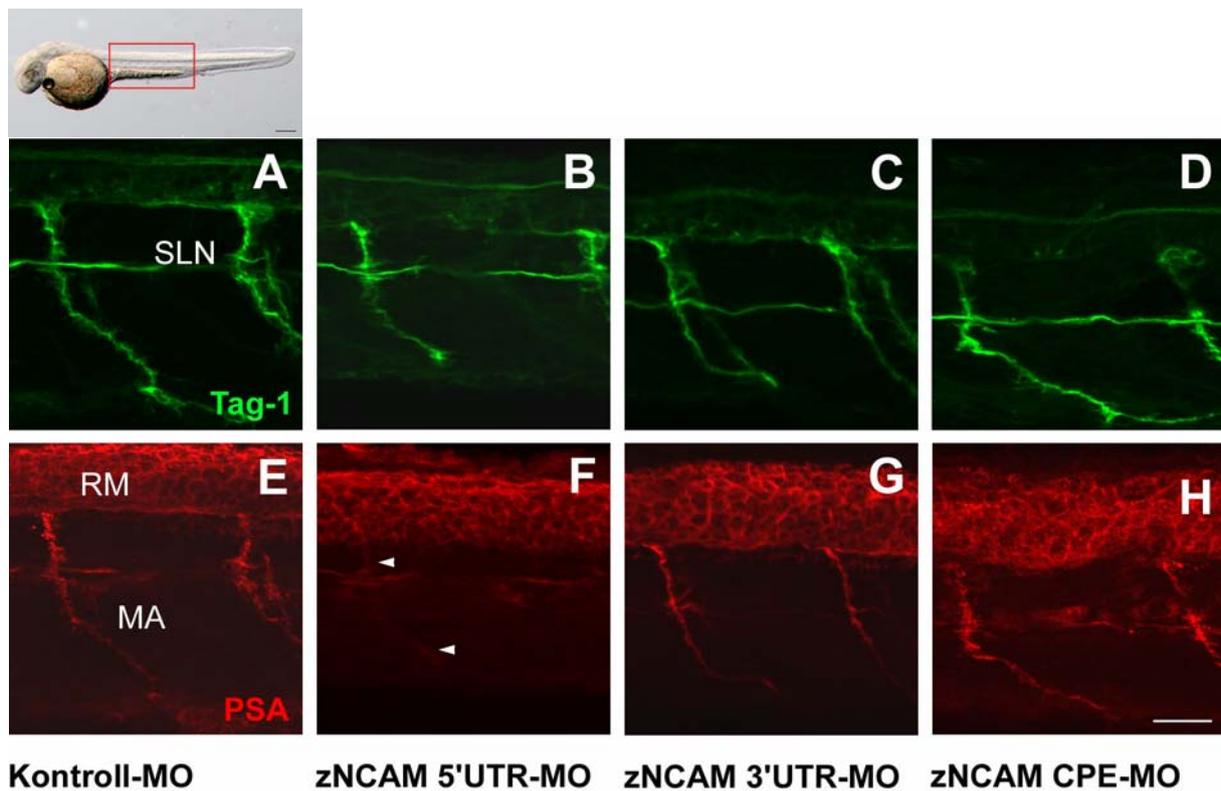


Abb. 34: PSA-Verteilung im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion

Die Abbildungen A-D zeigen Ausschnitte aus den untersuchten Schwanzabschnitten mit einer Immunfärbung gegen Tag-1, ein motoneuronspezifisches Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie. Abbildungen E-H zeigen die Gegenfärbung mit m735, einem monoklonalen PSA-Antikörper, in den entsprechenden Abschnitten. Die Kontrollsituation zeigt PSA auf den Zellkörpern im Rückenmark und den Axonen der Motoneurone, die in ihrem Wachstumsmuster unverändert sind. Die Injektion des zNCAM 5'UTR-MOs veränderte das Wachstumsmuster der Motoraxone nicht. Allerdings war noch immer, wenn auch reduziert, PSA auf den Zellkörpern des Rückenmarks und den Motoraxonen zu finden. Ähnlich wie in der Kontrolle stellte sich die Situation nach zNCAM 3' UTR- und zNCAM CPE-MO-Injektion dar. Die Motoraxone wuchsen normal aus und die PSA-Menge erschien ebenfalls unverändert. MA – Motoraxone, RM – Rückenmark, SLN – Seitenliniennerv, Pfeilspitzen zeigen auf die nur noch schwach markierten Motoraxone; Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Nach zNCAM-Knockdown zeigten nahezu 100 % aller injizierten Embryonen noch PSA im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone (Abb. 35).

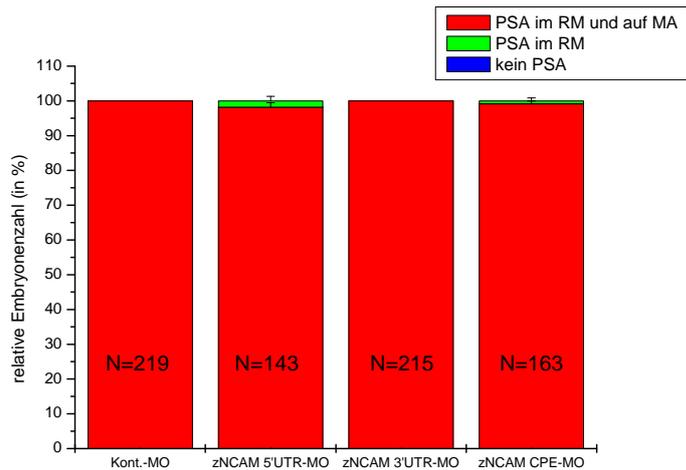


Abb. 35: Statistische Darstellung der PSA-Expression im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)

Nach der Auswertung von fünf unabhängigen Injektionen zeigte sich, dass in allen vier Injektionsansätzen nahezu 100 % aller Embryonen PSA-positiv für die Zellkörper des Rückenmarks und den Axonen der Motoneurone waren.

N = Gesamtembryonenzahl

Entgegen der Erwartung war nach dem Knockdown von zNCAM noch PSA im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone nachweisbar. Auch konnte dieses Experiment die Vermutung eines CPE-vermittelten zNCAM-mRNA-Transports nicht bestätigen, da die Blockade des zNCAM-CPEs keine Veränderung des PSA-Musters auf den Motoraxonen zeigte.

NCAM war bis zu diesem Zeitpunkt als einziges beschriebenes PSA-Substrat in Vertebraten bekannt. Wirkten hier womöglich die Morpholinos nicht oder hatte deren Injektion nicht funktioniert? Vielleicht konnten die MOs in dieser Konzentration keinen Effekt auslösen?

Denkbar wäre aber auch die Alternative, dass hier ein weiteres, bisher unbekanntes PSA-Substrat vorkommt. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre zPCAM mit seinen zwei konservierten N-Glykosylierungsstellen in der fünften Ig-Domäne, wie sie auch in zNCAM vorkommen.

4. Überprüfung des zNCAM-Knockdowns auf seine Wirkung

4.1 zNCAM/ zPCAM-D3-Kontrolle

In Kapitel IV.3 wurde gezeigt, dass nach der Injektion der zNCAM-Morpholinos noch immer PSA im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisbar war. Um zu kontrollieren, ob mit den verwendeten MOs tatsächlich ein Knockdown von zNCAM induziert werden kann, kam der monoklonale NCAM-Antikörper D3 zur Anwendung (Schlosshauer, 1989; Bastmeyer et al., 1990). Zuvor musste allerdings dessen Spezifität für NCAM überprüft werden. Hierfür wurde die Expression von zNCAM und zPCAM mittels ihrer jeweiligen 5'UTR-MOs inhibiert, die in einer

Konzentration von 1,25 ng/ nl zum Einsatz kamen. Anschließend wurden die Embryonen mit dem erwähnten Antikörper gefärbt und die NCAM-Expressionsmuster verglichen.

Es zeigte sich, dass der zNCAM 5'UTR-MO in dieser benutzten Konzentration offensichtlich doch die Expression von zNCAM inhibieren kann, da eine Markierung des Rückenmarks und der Motoraxone komplett fehlte. Im Vergleich dazu war die Situation nach zPCAM-Knockdown mit der der Kontrolle vergleichbar. In beiden Fällen war eine deutliche Markierung des Rückenmarks mit floor plate und der Axone der Motoneurone zu erkennen (Abb. 36). Somit war auch nachgewiesen, dass der Antikörper D3 tatsächlich spezifisch für NCAM ist.

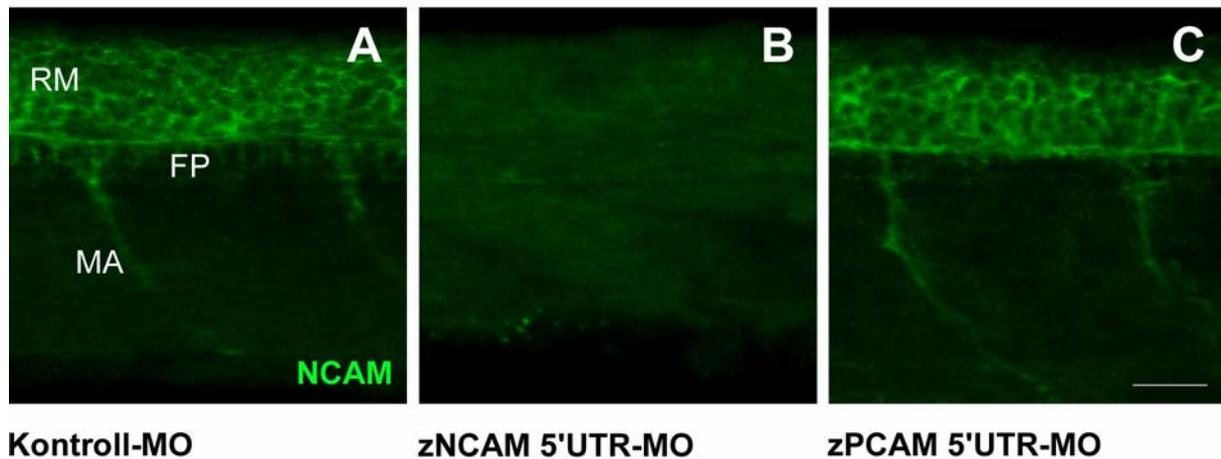


Abb. 36: zNCAM/ zPCAM-D3-Kontrolle

Die Abbildungen A-C zeigen die Spezifität des D3-Antikörpers für NCAM. Nach der Injektion des zNCAM 5'UTR-Morpholinos ließ sich kein NCAM mehr im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisen, wohingegen nach der Injektion des zPCAM 5'UTR-MOs weiterhin zNCAM vorhanden war. FP – floor plate, MA – Motoraxon, RM- Rückenmark; Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

4.2 zNCAM-Knockdown mit einer Morpholino-Konzentration von 1,25 ng/ nl

Der Nachweis der Spezifität des D3-Antikörpers für NCAM lässt vermuten, dass eine Inhibition der zNCAM-Expression bereits doch mit einer MO-Konzentration von 1,25 ng/ nl möglich ist. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden alle zNCAM-MOs mit dieser Konzentration injiziert und auf ihre Auswirkungen bezüglich der zNCAM-Verteilung hin untersucht und ausgewertet.

4.2.1 Entwicklungsfähigkeit und Überlebensraten der Embryonen

Wie bereits in Kapitel IV.3.1 beschrieben wurde, hatten die Morpholinos in dieser Konzentration keinen Einfluss auf die Entwicklung der injizierten Embryonen. Auch in diesem Experiment nahmen die Überlebensraten nach Injektion insgesamt ab. In allen vier Fällen unterschieden sie sich aber nicht signifikant voneinander.

4.2.2 zNCAM-Expression nach Knockdown

Alle überlebenden Embryonen wurden für die anschließende D3-Färbung weiter verwandt, um so die aus der Morpholino-Injektion resultierenden Veränderungen in der zNCAM-Expression zu untersuchen und zu quantifizieren. Abbildung 37 veranschaulicht deutlich, wie das NCAM-Muster nach MO-Injektion aussieht. Zu erkennen sind in den Abbildungen A, C und D die NCAM-positiven Zellkörper im Rückenmark, sowie die Axone der Motoneurone nach Kontroll- zNCAM 3'UTR- und zNCAM CPE-MO-Injektion. Nach der Inhibition der zNCAM-Expression mittels des 5'UTR-MOs lässt sich kein NCAM mehr nachweisen (Abb. 37B).

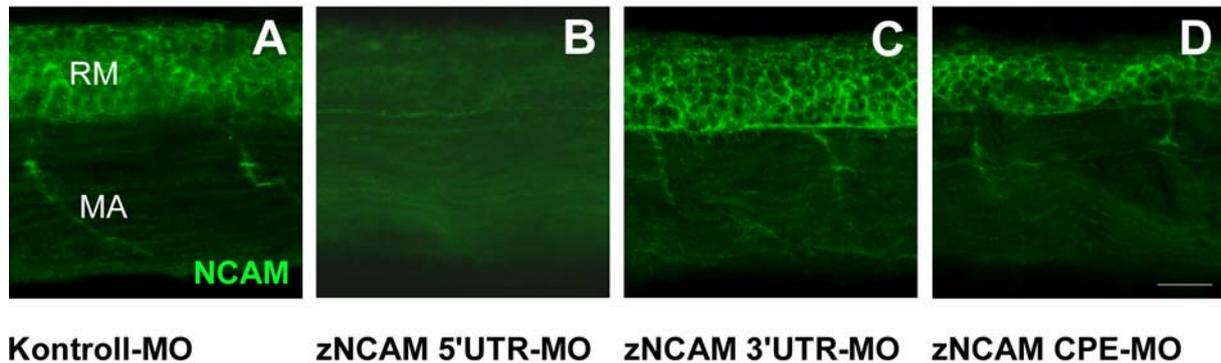


Abb. 37: D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)

Die Abbildungen A-D zeigen die D3- und damit die NCAM-Reaktivität im Schwanz von 36 hpf alten Embryonen nach MO-Injektion. Nach der Injektion von Kontroll-, zNCAM 3'UTR- und zNCAM CPE-Morpholinos war weiterhin NCAM im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisbar. Im Fall des zNCAM 5'UTR-MOs ließ sich kein NCAM mehr nachweisen. Der rote Kasten in der Abbildung über A zeigt den für diese Auswertung untersuchten Schwanzbereich der Embryonen. MA – Motoraxon, RM – Rückenmark; Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Nach Auswertung des Experiments war in 100 % der Kontroll- und zNCAM CPE-MO, sowie in 98,6 % der zNCAM 3'UTR-MO injizierten Embryonen NCAM im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisbar. Offensichtlich konnte keiner dieser Morpholinos die Expression von NCAM inhibieren oder stören. Im Fall des CPE-Morpholinos war NCAM noch immer auf den Axonen der Motoneurone zu finden.

Erst nach Applikation des zNCAM 5'UTR-Morpholinos konnte die zNCAM-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen nahezu vollständig inhibiert werden. Hier war lediglich nur noch in 5 % aller Fälle NCAM nachweisbar (Abb. 38).

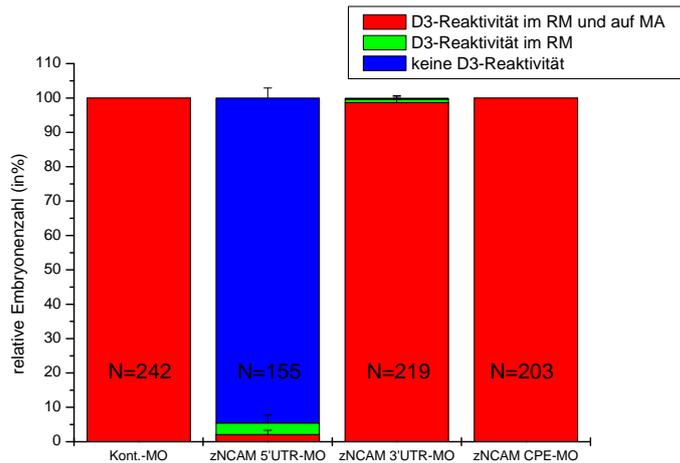


Abb. 38: Statistische Darstellung der D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)

Nach Auswertung von vier unabhängigen Injektionen bzw. 3 Injektionen im Falle des zNCAM 5'UTR-MOs zeigte sich, dass 100 % aller Kontroll-MO und zNCAM CPE-MO injizierten Embryonen im Rückenmark und auf den Motoraxonen D3 positiv, d.h. NCAM positiv waren. Ebenso waren 98,6 % aller zNCAM 3'UTR-MO injizierten Embryonen D3 positiv. Nach der Injektion des zNCAM 5'UTR-MOs war diese D3-Reaktivität in 94,8 % der Fälle verschwunden. Weder im Rückenmark, noch auf den Motoraxonen war NCAM nachweisbar. N = Gesamtembryonenzahl

Eine MO-Konzentration von 1,25 ng/ nl reicht also offensichtlich aus, um die Expression von zNCAM zu inhibieren. Allerdings traten bei dieser Konzentration nicht die erwarteten Veränderungen hinsichtlich der zNCAM-Expression auf den Axonen der Motoneurone nach CPE-MO-Injektion auf. Möglicherweise kann dieser Effekt mit einer höheren MO-Konzentration induziert werden. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen einer höheren MO-Konzentration untersucht.

4.3 zNCAM-Knockdown mit einer Morpholino-Konzentration von 2 ng/ nl

Im vorangegangenen Kapitel wurde nachgewiesen, dass nach der Injektion des zNCAM 5'UTR-MOs mit einer Konzentration von 1,25 ng/ nl die zNCAM-Expression erfolgreich inhibiert werden kann. Die Injektion des zNCAM-CPE-MOs in derselben Konzentration zeigte hingegen keine Veränderungen in der NCAM-Expression. Immer noch ließ NCAM im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisen. Die Vermutung war, dass in diesem Fall die Konzentration des CPE-MOs nicht ausreicht hat, um die zNCAM-Expression auf den Axonen der Motoneurone zu inhibieren. Deswegen wurde im nachfolgenden Experiment eine höhere Morpholino-Konzentration verwendet und ihre Auswirkungen auf die zNCAM-Expression untersucht.

4.3.1 Entwicklungsfähigkeit und Überlebensraten der Embryonen

Die Injektion von zNCAM-Morpholinos in einer höheren Konzentration hatte ebenfalls keinen offensichtlichen Effekt auf die Überlebensraten und die Entwicklung der Embryonen. In allen vier Fällen wiesen sie einen normalen Phänotyp auf (Abb. 39).

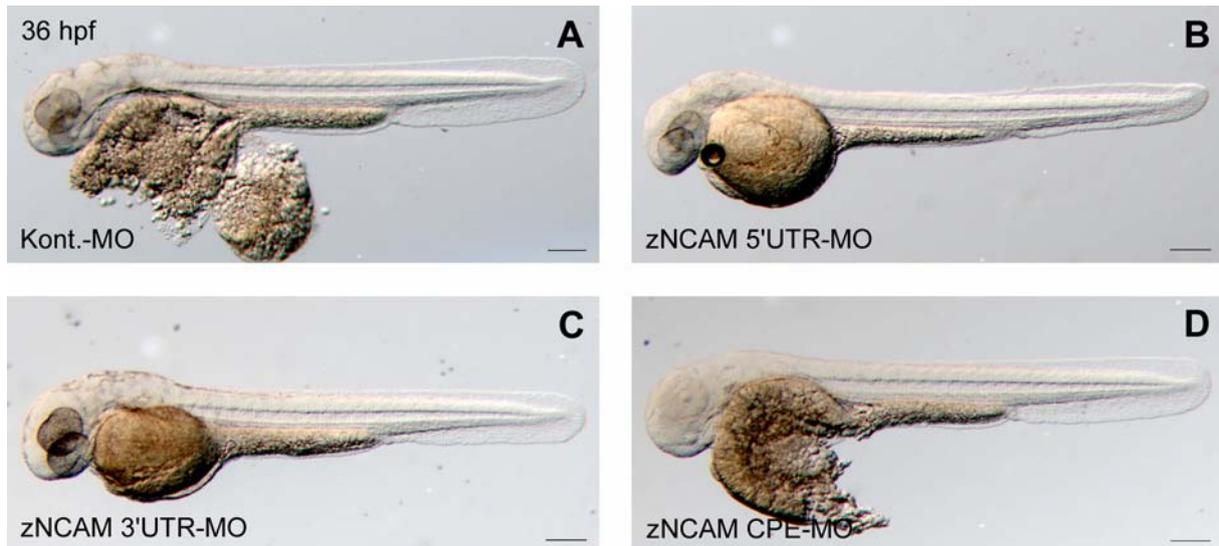


Abb. 39: Phänotyp nach zNCAM-MO-Injektion (2 ng/ nl) im Alter von 36 hpf

Die Abbildungen A-D zeigen die Phänotypen von Kontroll-MO-, zNCAM 5'UTR-MO-, zNCAM 3'UTR-MO und zNCAM CPE-MO-injizierten Embryonen. In allen Fällen ist der Phänotyp unverändert, die verschiedenen Morpholinos haben offensichtlich auch in höherer Konzentration keinen Effekt auf die Entwicklung der Embryonen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

4.3.2 zNCAM-Expression nach Morpholino-Injektion mit 2ng/ nl

Wie bereits für eine MO-Konzentration von 1,25 ng/ nl gezeigt, lässt sich lediglich nach der Applikation des zNCAM 5'UTR-MOs kein NCAM mehr im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisen (Abb. 40B). Auffällig ist, dass auch die höhere Konzentration des CPE-MOs keinen Effekt auf die NCAM-Reaktivität in den Axonen der Motoneurone induzieren konnte. Immer noch ist hier NCAM nachweisbar (Abb. 40D).

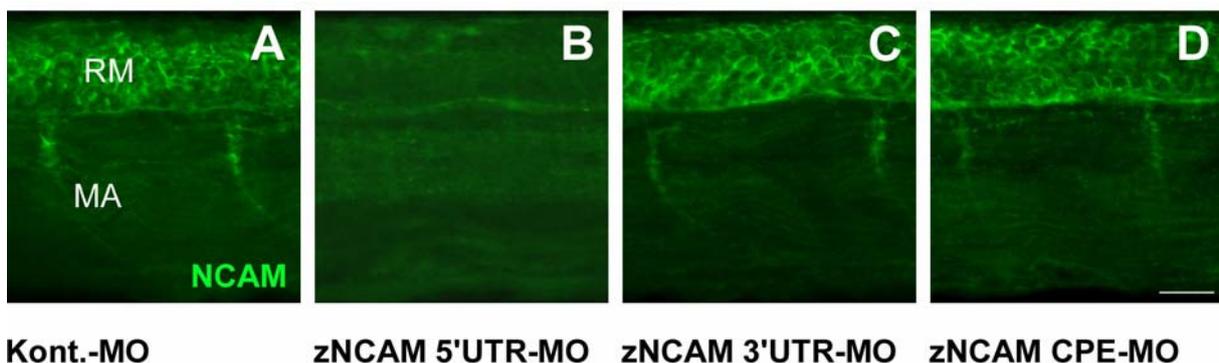


Abb. 40: D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (2 ng/ nl)

Die Abbildungen A-D zeigen die D3- und damit die NCAM-Reaktivität im Schwanz von 36 hpf alten Embryonen nach MO-Injektion. Nach der Injektion von Kontroll-, zNCAM 3'UTR- und zNCAM CPE-MOs war weiterhin NCAM im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisbar. Im Fall des zNCAM 5'UTR-MOs ließ sich kein NCAM mehr nachweisen. MA – Motoraxon, RM – Rückenmark, Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm

Die statistische Auswertung der zNCAM-Expression ergab auch in diesem Fall, dass eine signifikante Reduktion von NCAM nur durch die Injektion des 5'UTR-Morpholinos erreicht werden kann. Lediglich in 6,4 % der überlebenden Embryonen ließ sich NCAM im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisen. Im Fall der übrigen drei Morpholinos, Kontrolle, zNCAM 3'UTR und zNCAM CPE, war die Expression von zNCAM im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone nur minimal reduziert und lag in diesen Fällen im Bereich von 76,5 – 93,4 % (Abb. 41).

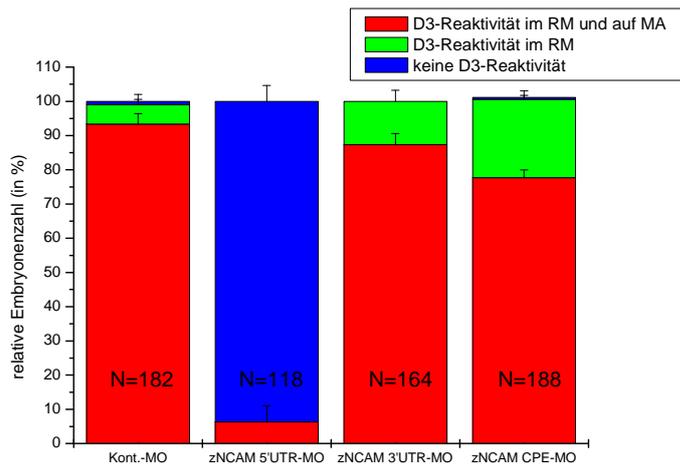


Abb. 41: Statistische Darstellung der D3-Reaktivität im Schwanz nach zNCAM-MO-Injektion (2 ng/ nl)

Nach Auswertung von mindestens vier unabhängigen Injektionen zeigte sich, dass 93,37 % aller Kontroll-MO und 87,36 % der zNCAM 3'UTR-MO injizierten Embryonen im Rückenmark und auf den Motoraxonen D3 positiv, d.h. NCAM positiv waren. Ebenso waren 76,51 % aller zNCAM CPE-MO injizierten Embryonen D3 positiv. Nach der Injektion des zNCAM 5'UTR-MOs war diese D3-Reaktivität in 93,65 % der Fälle verschwunden. Weder im Rückenmark, noch auf den Motoraxonen war NCAM nachweisbar. N = Gesamtembryonenzahl

Die Untersuchung der zNCAM-MO-Injektionen mit verschiedenen Konzentrationen hatte ergeben, dass bereits 1,25 ng/ nl ausreichen um die zNCAM-Expression erfolgreich zu inhibieren. Allerdings konnte die Vermutung des CPE-vermittelten zNCAM-mRNA-Transports nicht bestätigt werden. Unabhängig von der injizierten MO-Konzentration traten keine Veränderungen auf den Motoraxonen auf, was die Verteilung von zNCAM angeht.

5. Weitere Analyse des zNCAM- und zPCAM-Knockdowns

Nachdem die Untersuchung der PSA-Expression nach zNCAM-Knockdown zPCAM als zweiten PSA-Akzeptor im Zebrafisch vermuten lässt, sollte diese Vermutung mittels eines weiteren Antikörpers abgesichert werden.

Zur Anwendung kam eine Kombination aus dem bereits beschriebenen monoklonalen NCAM-Antikörper D3 und dem polyklonalen NCAM-Antikörper 704 (Marx, 2002). Dieser wurde durch

Immunisierung eines Kaninchens mit Goldfischgehirnextrakten gewonnen. Vor der Immunisierung wurden diese Extrakte über eine Affinitätschromatographiesäule aufgereinigt, die den PSA-spezifischen Antikörper m735 enthielt. Die Säule hatte so alle bis dahin bekannten (NCAM) und auch unbekannt PSA-Akzeptoren gebunden. Diese wurden anschließend eluiert und das Kaninchen mit diesem Eluat immunisiert.

Die Auswertung der Doppelfärbung zeigte, dass nach dem Knockdown von NCAM immer noch eine Reaktivität im Rückenmark und auf den Motoraxonen vorhanden war (Abb. 42E). Den vorangegangenen Erkenntnissen aus ISH und zNCAM-MO-Injektionen nach handelt es sich dabei um zPCAM.

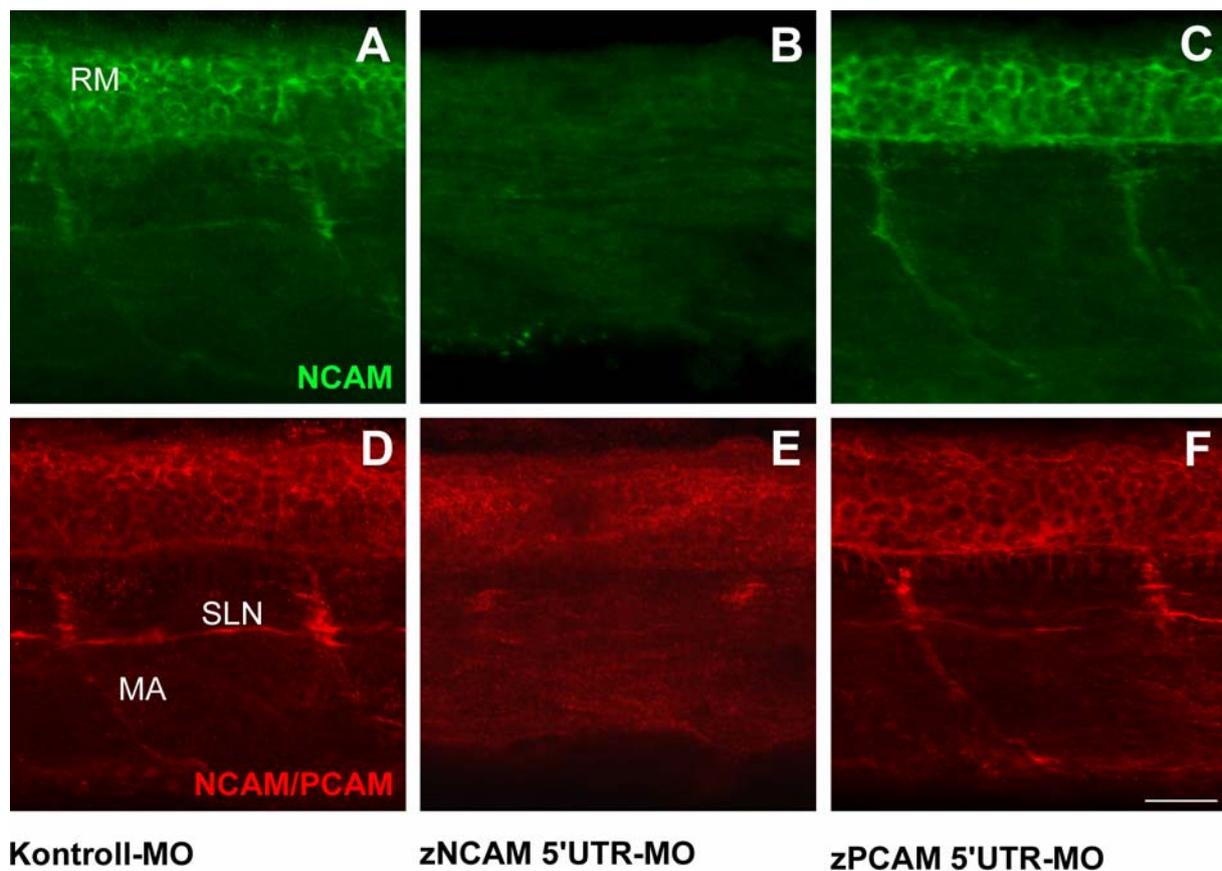


Abb. 42: Expression von zNCAM und zPCAM im peripheren Nervensystem

Die Abbildungen A-C zeigen immungefärbte Schwanzabschnitte mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper D3 zur Analyse der Expression von NCAM nach der Injektion von Kontroll-, zNCAM 5'UTR- und zPCAM 5'UTR-Morpholino. Die Abbildungen D-F zeigen die Gegenfärbung der selben Abschnitte mit dem polyklonalen NCAM-Antikörper 704, der auch PCAM erkennt. Die Kontrolle erscheint normal NCAM- und NCAM/PCAM-positiv. Nach zNCAM-Knockdown ist die D3-Reaktivität erwartungsgemäß verschwunden, mit dem polyklonalen Antikörper lässt sich aber noch PCAM im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisen. Wurde die zPCAM-Expression inhibiert, war die D3-Reaktivität erwartungsgemäß wieder hergestellt und der Antikörper 704 zeigte im Vergleich zur Kontrolle ein etwas schwächeres Signal im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone. MA – Motoraxone, RM – Rückenmark, SLN – Seitenliniennerv; Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Die Immunfärbung mit dem polyklonalen NCAM-Antikörper 704 zeigte, dass der zPCAM 5'UTR-Morpholino das Fluoreszenzsignal nicht in dem gleichen Maße verringern konnte wie der

vergleichbare zNCAM-MO. Werden zNCAM und zPCAM im peripheren Nervensystem also unterschiedlich stark exprimiert?

Da bis zum heutigen Zeitpunkt keine Antikörper gegen zPCAM zur Verfügung stehen, konnten keine eingehenderen Untersuchungen von zPCAM durchgeführt werden.

Um nun die Vermutung eines weiteren, bisher unbekanntes PSA-Akzeptors zu untersuchen, wurden die entsprechenden Morpholinos gegen zPCAM injiziert.

6. Analyse der PSA-Expression nach zPCAM-Knockdown

In diesem Experiment wurde der Einfluss von Kontroll-, zPCAM 5'UTR- und zPCAM CPE-Morpholinos auf die Expression von PSA in den oben beschriebenen Strukturen untersucht (vgl. Kapitel IV.3.2).

6.1 Entwicklungsfähigkeit und Überlebensraten der Embryonen

Auch hier wurde zu aller erst wieder ein möglicher Effekt der injizierten zPCAM-Morpholinos auf die Entwicklungsfähigkeit und Überlebensraten der damit behandelten Embryonen untersucht. Wie auch die jeweiligen zNCAM-MOs hatten die injizierten zPCAM-MOs keine Auswirkungen auf die Entwicklung der Embryonen. Sie alle entwickelten sich normal und zeigten einen unauffälligen Phänotyp (Abb. 43).

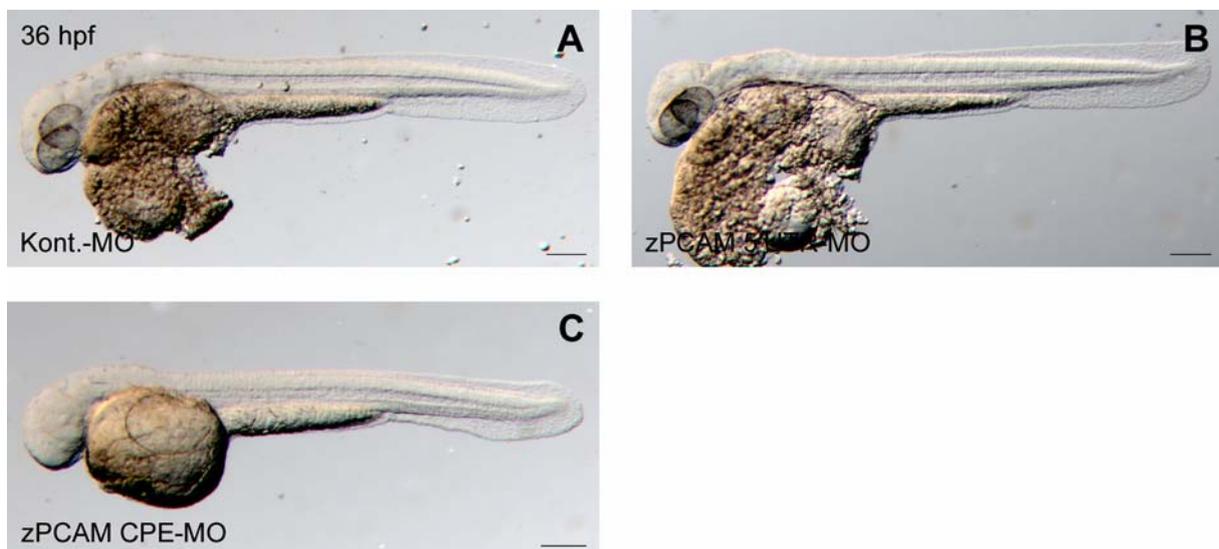


Abb. 43: Phänotyp nach zPCAM-MO-Injektion im Alter von 36 hpf

Die Abbildungen A-D zeigen die Phänotypen der überlebenden Kontroll-MO-, zPCAM 5'UTR-MO- und zPCAM CPE-MO-injizierten Embryonen. In allen Fällen war der Phänotyp unverändert. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m.

Die Auswertung und statistische Analyse von wiederum 5 Einzelexperimenten ergab, dass die Embryonensterblichkeit nach der Applikation von zPCAM 5'UTR- bzw. CPE-Morpholinos im

Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert ist (Abb. 44). 67,9 % der Kontrollmorpholone überlebten, aber nur 47,4 % der zPCAM 5'UTR-MO und 41,9 % der zPCAM CPE-MO injizierten Embryonen.

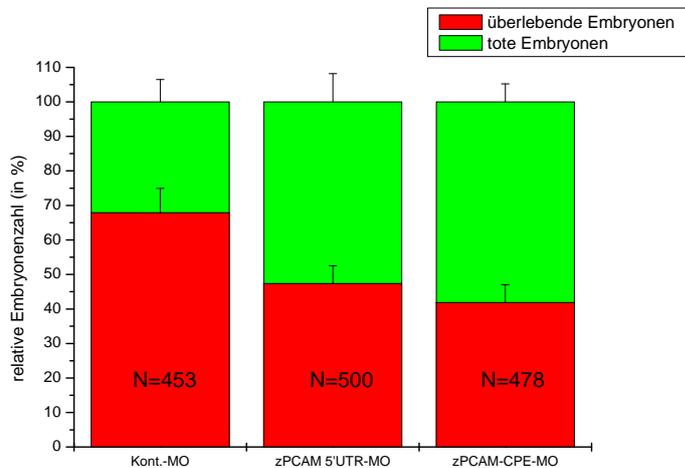


Abb. 44: Überlebensraten nach zPCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)

Nach der Auswertung von fünf unabhängigen Injektionsexperimenten zeigte sich, dass 67,9 % aller Kontroll-Morpholino injizierten, 47,37 % der zPCAM 5'UTR-MO-, und 41,87 % der zPCAM CPE-MO injizierten Embryonen überlebten. N = Gesamtembryonenzahl

6.2 PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen

Wie bereits für den Knockdown von zNCAM unter Kapitel IV.3.2 beschrieben, wurde hier die PSA-Expression im Schwanz nach zPCAM-Morpholino-Injektion analysiert (Abb. 45).

In der Kontrolle war PSA auf den Zellkörpern des Rückenmarks, den Axonen der Motoneurone und dem Seitenliniennerv nachweisbar und erschien dabei in der Menge normal. Gleiches gilt für die Situation nach der Injektion des zPCAM CPE-Morpholinos.

Wie im Fall des zNCAM 5'UTR-Morpholinos war auch nach zPCAM 5'UTR-Gabe immer noch PSA im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisbar. In der Menge erschien sie auch reduziert, war aber nicht in dem selben Maße reduziert wie in der zNCAM-Situation. Aufgefallen ist in diesem Versuch auch, dass einige Motoraxone nach Morpholino-Injektion mitunter fehlerhaft auswuchsen und Knicke und Seitenäste aufwiesen (Abb. 45C/ F).

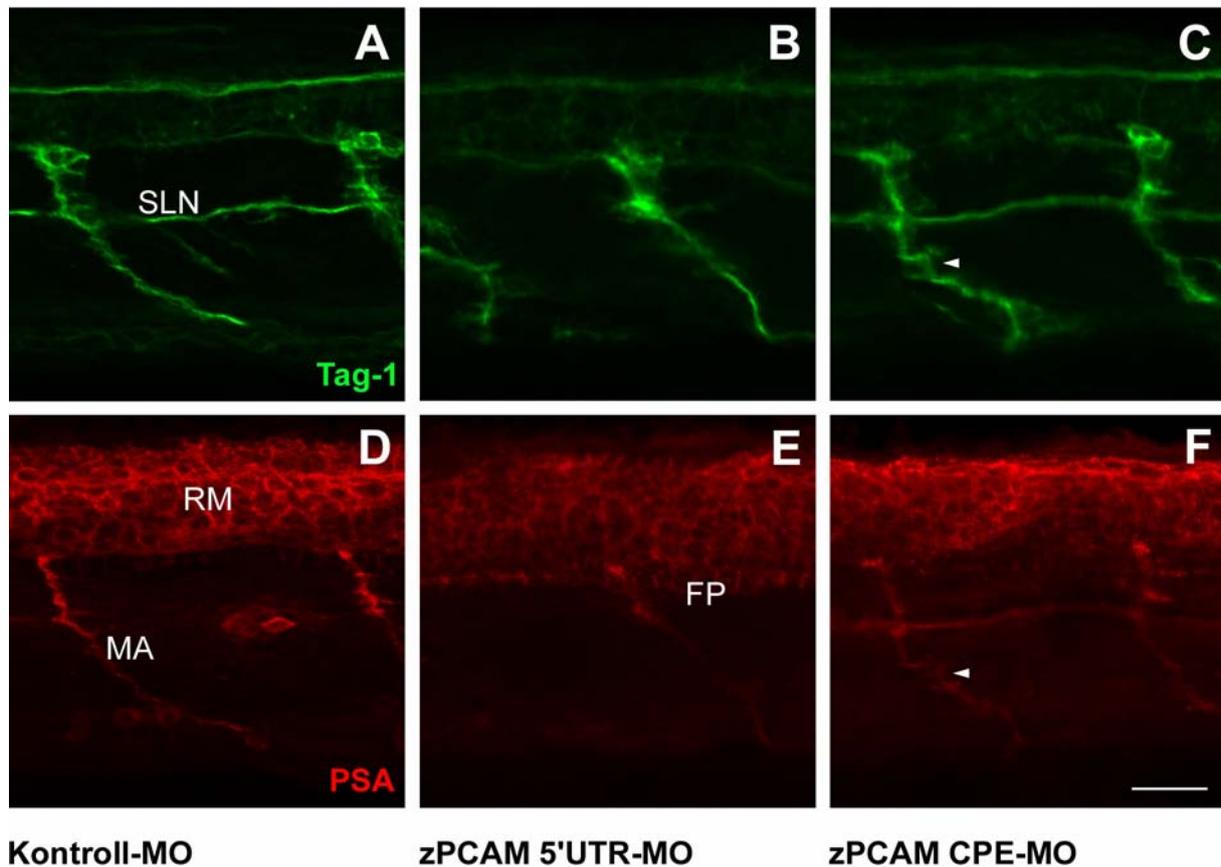


Abb. 45: PSA-Verteilung im Schwanz nach zPCAM-MO-Injektion

Die Abbildungen A-C zeigen Ausschnitte aus den untersuchten Schwanzabschnitten mit einer Immunfärbung gegen Tag-1. Abbildungen D-F zeigen die PSA-Gegenfärbung mit m735 in den entsprechenden Abschnitten. Die Kontrollsituation zeigt PSA auf den Zellkörpern im Rückenmark und den Axonen der Motoneurone, die in ihrem Wachstumsmuster unverändert sind. Die Injektion des zPCAM 5'UTR-MOs veränderte das Wachstumsmuster der Motoraxone nicht. Allerdings war noch immer, wenn auch reduziert, PSA auf den Zellkörpern des Rückenmarks und den Motoraxonen zu finden. Ähnlich wie in der Kontrolle stellte sich die Situation nach zPCAM CPE-MO-Injektion dar. Die PSA-Menge erschien ebenfalls unverändert, allerdings wuchsen die Motoraxone leicht gestört aus. MA – Motoraxone, RM – Rückenmark, SLN – Seitenliniennerv, Pfeilspitzen zeigen Knicke beim Auswachsen der Motoraxone; Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Die statistische Auswertung dieses Experiments ergab, dass in allen drei Gruppen immer noch in mindestens ca. 90 % der Embryonen PSA auf den Zellkörpern im Rückenmark, den Axonen der Motoneurone und des Seitenliniennervs zu finden ist. Nach der Injektion von Kontroll- und zPCAM CPE-Morpholinos erscheint die PSA-Menge normal und unverändert, wohingegen sie nach der Applikation des 5'UTR-Morpholinos leicht verringert ist; allerdings nicht in dem Maße wie beim zNCAM 5'UTR-MO (Abb. 46).

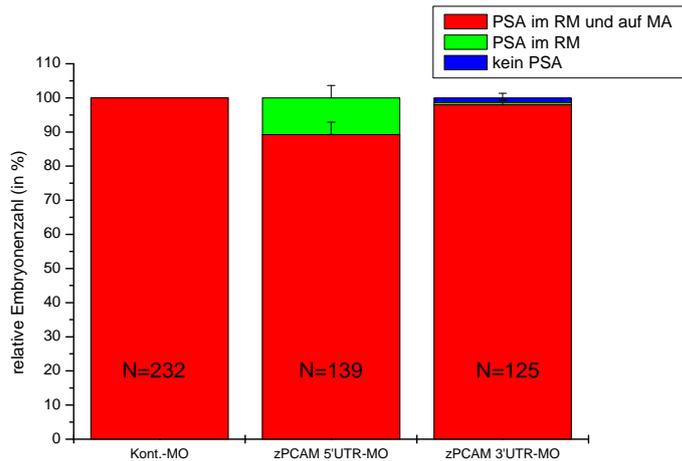


Abb. 46: Statistische Darstellung der PSA-Expression im Schwanz nach zPCAM-MO-Injektion (1,25 ng/ nl)

Nach der Auswertung von fünf unabhängigen Injektionen zeigte sich, dass in allen drei Injektionsansätzen 100 % der Kontrollembryonen, 89,25 % der zPCAM 5'UTR-MO und 97,98 % der zPCAM CPE-MO injizierten Embryonen PSA-positiv für die Zellkörper des Rückenmarks und den Axonen der Motoneurone waren. N = Gesamtembryonenzahl

Der in diesem Versuch durchgeführte Knockdown von zPCAM führte zu einem ähnlichen Befund wie der von zNCAM: Nach der Inhibition der Proteinexpression mit dem 5'UTR-Morpholino war noch immer PSA im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone zu finden. Zwar war die Menge augenscheinlich etwas reduziert, doch hatte sich an dem generellen PSA-Muster nichts geändert.

Ein ähnliches Bild wie der zNCAM-CPE-Morpholino lieferte der entsprechende zPCAM-MO. Eine fehlende PSA-Expression auf den Motoraxonen nach Inhibition des vermuteten CPE-vermittelten zPCAM-mRNA-Transports war nicht festzustellen.

Die Kombination der Ergebnisse nach der Injektion der zNCAM- und zPCAM-Morpholinos führte an diesem Punkt zu den folgenden Schlüssen:

- Neben zNCAM ist zPCAM offenbar ein zweiter, bisher unbekannter Akzeptor der PSA.
- Ein CPE-vermittelter Transport der zNCAM- bzw. zPCAM-mRNA ließ sich mit den angewandten Methoden nicht nachweisen und bleibt vorerst unklar.

Um die Vermutung einer Glykosylierung von zPCAM mit PSA zu bestätigen und die bisherigen Ergebnisse zu untermauern, sollte ein Doppelknockdown von zNCAM und zPCAM durchgeführt werden. Die Vermutung war, dass beim Fehlen beider PSA-Substrate kein PSA-Nachweis im Rückenmark und auf den Motoraxonen mehr möglich ist.

7. Doppelknockdown von zNCAM und zPCAM

Die Endkonzentration des jeweiligen Morpholinos im Gemisch betrug auch in diesem Fall wieder 1,25 ng/ nl.

7.1. Überlebensraten

Die Injektion der jeweiligen Morpholinogemische führte zu einer dramatischen Verminderung der Überlebensrate aller injizierten Embryonen. Lag sie im Fall der Kontrollembryonen noch bei 72,5 %, sank sie nach Applikation des 5'UTR-Morpholinogemisches auf etwa 20 % und im Fall der CPE-Oligonukleotide auf ca. 37 %. Der Doppelknockdown von zNCAM und zPCAM war also offenbar letal und führte zu einem Absterben der Embryonen zum Ende der Gastrulation (10 hpf) bzw. dem Beginn der Neurulation und dem damit verbundenen Expressionsbeginn von zNCAM und zPCAM im Alter von 11-12 hpf (Abb. 47). Warum die Überlebensrate nach der Injektion des CPE-Gemischs ebenfalls so dramatisch gesunken ist, bleibt bis hier hin unklar. Womöglich haben die beiden CPE-Morpholinos doch einen Effekt.

Aufgrund der wenigen überlebenden Embryonen wurden diese in den nachfolgenden Kapiteln nur statistisch ausgewertet, da hier davon auszugehen war, dass die Morpholino-Injektion in diesen Fällen nicht erfolgreich war.

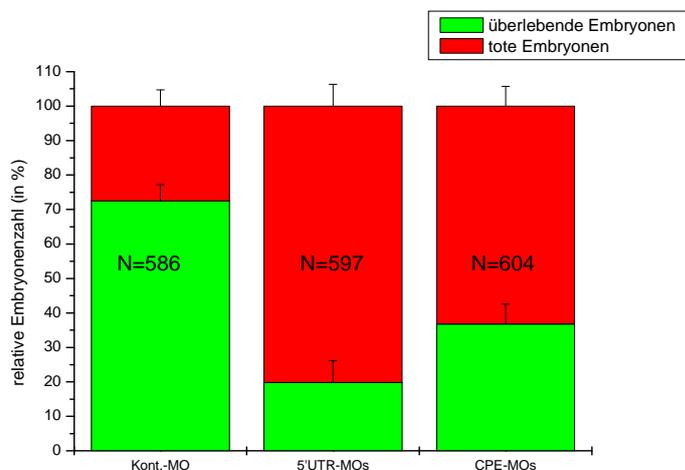


Abb. 47: Überlebensraten nach Morpholinogemisch-Injektion (je 1,25 ng/ nl)

Nach der Auswertung von fünf unabhängigen Injektionsexperimenten zeigte sich, dass noch 72,51% aller Kontrollembryonen überlebten. Nachdem das 5'UTR-MO-Gemisch injiziert wurde, überlebten nur noch 19,82 % bis ins Alter von 36 hpf und nur noch 36,82 % des mit dem CPE-MO-Gemisch injizierten Embryonen. N = Gesamtembryonenzahl

7.2 PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen

Die Auswertung der PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen aller überlebenden Embryonen zeigte, dass ca. 99 % aller Kontrollembryonen noch PSA auf den Zellkörpern im Rückenmark und den Axonen der Motoneurone aufwiesen. Im Gegensatz dazu

trugen nur noch 11,1 % aller 5'UTR-Morpholino-injizierten Embryonen PSA auf den Zellkörpern und den Motoraxonen, weitere 68,3 % zeigten PSA lediglich auf den Zellkörpern des Rückenmarks und in weiteren 20,6 % der Embryonen war kein PSA mehr nachweisbar. Diese Embryonen ohne PSA zeigten zwar das erwartete Ergebnis dieses Experiments, doch waren sie zum größten Teil so stark deformiert, dass sie zu keinen weiteren Untersuchungen herangezogen werden konnten. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse darf allerdings die geringe Anzahl überlebender Embryonen, die in die Auswertung der PSA-Expression eingingen, nicht außer Acht gelassen werden. So waren lediglich 13 von 63 überlebenden Embryonen PSA-negativ.

Die PSA-Expression nach der Injektion des CPE-Morpholinogemischs ähnelte nahezu der Kontrollsituation. Hier war in 95,2 % der Embryonen noch PSA auf den Zellkörpern und den Axonen der Motoneurone nachweisbar (Abb. 48).

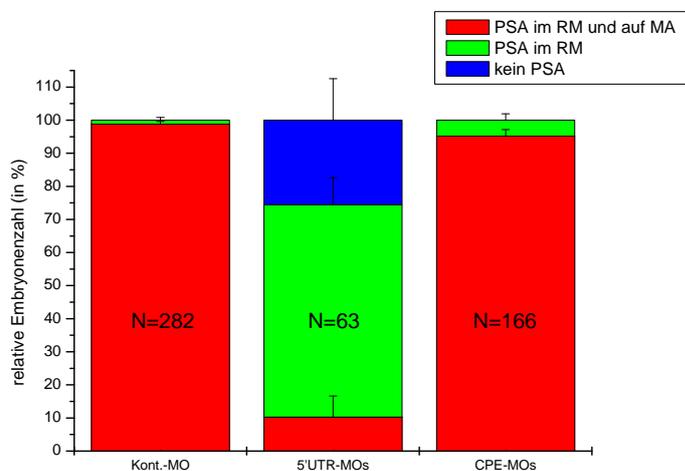


Abb. 48: Statistische Darstellung der PSA-Expression im Schwanz nach MO-Gemisch-Injektion (je 1,25 ng/ nl)

Nach der Auswertung von fünf unabhängigen Injektionen zeigte sich, dass in allen drei Injektionsansätzen 98,79 % der Kontrollembryonen, aber nur noch 10,26 % der 5'UTR-MO-Gemisch und 95,18 % der CPE-MO-Gemisch injizierten Embryonen PSA-positiv für die Zellkörper des Rückenmarks und den Axonen der Motoneurone waren.

N = Gesamtembryonenzahl

Der in diesem Kapitel beschriebene Doppelknockdown von zNCAM und zPCAM führte zu zwei, teils überraschenden, Ergebnissen:

- Ein Fehlen von zNCAM und zPCAM während der Zebrafiscentwicklung ist letal. Im Verlauf der im Alter von 11/ 12 hpf einsetzenden Neurulation sterben die allermeisten Embryonen.
- Wie die einzelne Injektion des zPCAM-CPE-MOs wirkte auch das Gemisch aus beiden CPE-MOs letal.

Zur Aufklärung des letalen Effekts des zPCAM-CPE-MOs und des CPE-MO-Gemischs sollten die Morpholinos nochmals im Gemisch, aber mit verschiedenen Konzentrationen injiziert werden, da der Verdacht bestand, dass die Gesamtmorpholinokonzentration von 2,5 ng/ nl zu groß war und diesen Effekt verursacht hat.

Möglich ist aber auch, dass der zPCAM-CPE-MO unspezifisch gebunden und somit Einfluss auf die Entwicklung genommen hat.

8. Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des CPE-MO-Gemischs

Im ersten Versuchsteil wurden beide Morpholinos in einer Konzentration von 0,5 ng/ nl eingesetzt, was einer Gesamtkonzentration Morpholino von 1 ng/ nl entspricht. Dagegen betrug die einzelne Morpholinokonzentration im zweiten Versuchsansatz 0,75 ng/ nl und ergab folglich in der Summe 1,5 ng/ nl. Um noch eine im Vergleich zu Kapitel IV.6 höhere Konzentration zu injizieren, wurden beide Morpholinos mit 1,75 ng/ nl eingesetzt. Daraus ergab sich eine Gesamtmorpholinokonzentration von 3,5 ng/ nl.

Die Auswertung dieses Experimentes ergab, dass die Überlebensraten unabhängig von der injizierten CPE-MO-Konzentration sanken. In allen drei Gruppen überlebten ca. 49 % aller Kontrollembryonen. Von den Embryonen, die mit einer jeweiligen Einzel-MO-Konzentration von 0,5 ng/ nl behandelt wurden, überlebten im Mittel ca. 24 %. Von den mit 0,75 ng/ nl bzw. 1,75 ng/ nl injizierten Embryonen erreichten ca. 15 % bzw. ca. 12 % der Embryonen das Alter von 36 hpf. Damit unterschieden sich alle drei Gruppen, denen das CPE-MO-Gemisch in unterschiedlichen Konzentrationen injiziert wurde, signifikant von ihren jeweiligen Kontrollen (Abb. 49). Das führte zu der Schlussfolgerung, dass die Abnahme der Überlebensraten nicht durch eine zu Morpholinokonzentration induziert wurde, sondern dass der zPCAM-MO offensichtlich weitere mRNAs unspezifisch gebunden und somit einen unbekanntem Einfluss auf die Entwicklung der Zebrafischembryonen genommen hatte.

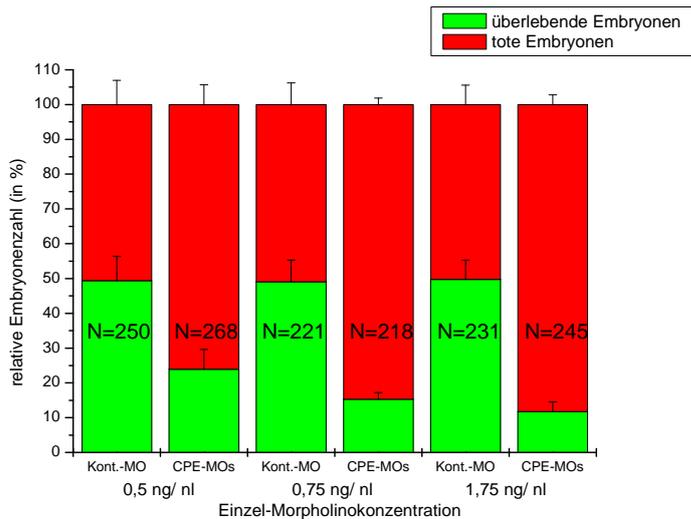


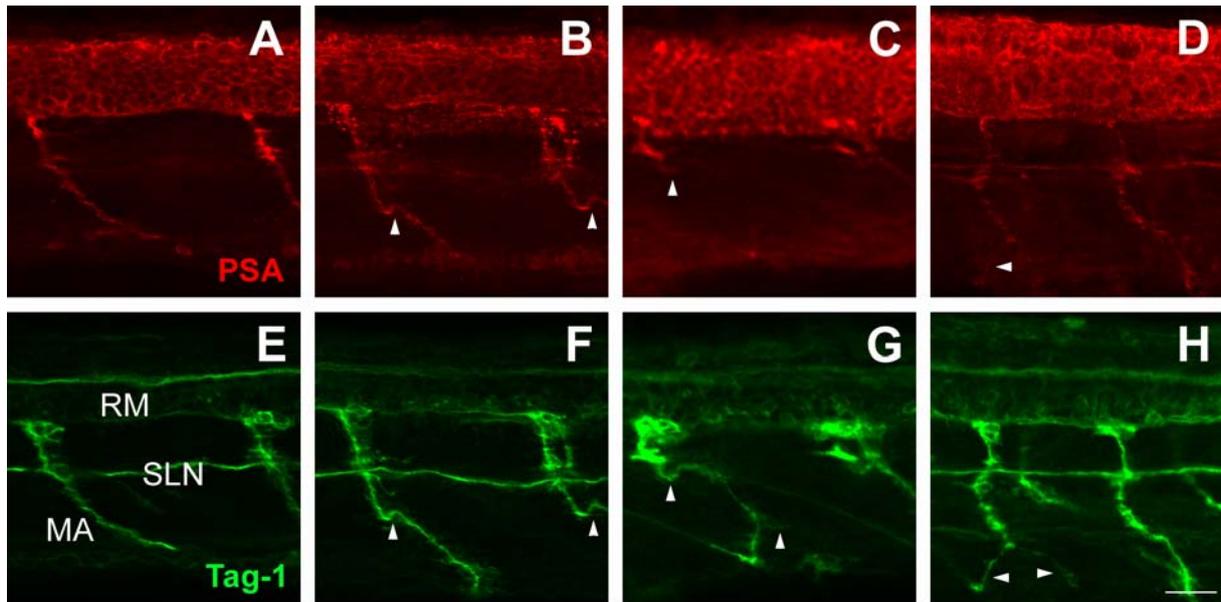
Abb. 49. Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des CPE-MO-Gemischs

Nach der Auswertung von drei unabhängigen Injektionen zeigte sich eine konzentrationsunabhängige Abnahme der Überlebensraten. Es überlebten im Mittel nur noch 23,93 % der mit einer Einzel-MO-Konz. von 0,5 ng/ nl behandelten Embryonen. Von den mit 0,75 ng/ nl bzw. 1,75 ng/ nl behandelten Embryonen überlebten nur 15,33 % bzw. 11,73 %. Damit unterschieden sich alle drei Gruppen signifikant von ihren jeweiligen Kontrollen. N = Gesamtembryonenzahl

9. Fehlerverteilung der Motoraxone nach Morpholino-Injektion

Während der Auswertung der PSA-Expression nach zPCAM-MO-Injektion fielen Motoneurone auf, deren Axone Fehler im Projektionsmuster aufwiesen (Abb. 50). Hier traten gehäuft Knicke und Seitenäste auf (vgl. Kapitel IV.6.2, Abb. 45). Knicke fanden sich hauptsächlich unterhalb des Seitenliniennervs (Abb. 50B/ F), Seitenäste dagegen im Bereich der Terminationsgebiete der Motoraxone (Abb. 50G und D/ H). Auf allen Axonen war aber noch PSA vorhanden. Mitunter wuchsen sie so filigran aus, dass die Menge gebundener PSA an der Nachweisgrenze lag. Deshalb war PSA meist nur im Bereich des relativ dicken Axonschafts zu sehen, aber kaum noch auf den Terminalien der Axone (Abb. 50C).

In keinem Fall korrelierten die Fehler mit dem durch ISH nachgewiesenen Expressionsmuster von zNCAM oder zPCAM in einem 36 hpf alten Zebrafischembryo (vgl. Kapitel IV.2.1). Um trotzdem die Möglichkeit eines Einflusses von zPCAM, aber auch zNCAM, auf das Auswachsen der Motoneurone aufzuklären, wurden sämtliche injizierten Embryonen auf ihr Motoneuronenmuster hin untersucht und quantifiziert. Als normal ausgewachsene Motoneurone wurden solche betrachtet, deren Axone in einem leichten Bogen nach caudal wuchsen und keine der oben beschriebenen Fehler aufwiesen.



normale MA

MA mit fehlerhaftem Wachstum

Abb. 50: Auswuchsverhalten der Motoraxone

Die Abbildungen A-D zeigen beispielhaft die PSA-Expression auf den Motoraxonen, die teilweise mit Fehlern ausgewachsen sind. E-H zeigen Tag-1 markierte Motoraxone. A und E zeigen zum Vergleich ein normal ausgewachsenes Motoraxon. Die restlichen Abbildungen hingegen zeigen beispielhaft verschiedene Wachstumsfehler in Gestalt von Knicken und Seitenästen (Pfeilspitzen). Mitunter wachsen die Motoraxone so fein aus, dass die Menge gebundene PSA an der Nachweisgrenze liegt und nur durch überproportionale Bildnachbearbeitung sichtbar wird (Abb. C und D). MA – Motoraxon, RM – Rückenmark, SLN – Seitenliniennerv; Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

9.1 Auswuchsverhalten nach zNCAM-Morpholino-Injektion

Die Auswertung des Wachstums der Motoraxone im oben beschriebenen Schwanzabschnitt konnte ein anfangs subjektiv empfundenes, fehlerhaftes Auswachsen in den Somiten nach zNCAM-MO-Injektion nicht bestätigen. Die statistische Auswertung aller fünf Einzelexperimente zeigte, dass die Motoraxone in 81 bis 87 % aller Embryonen normal auswachsen (Abb. 51)

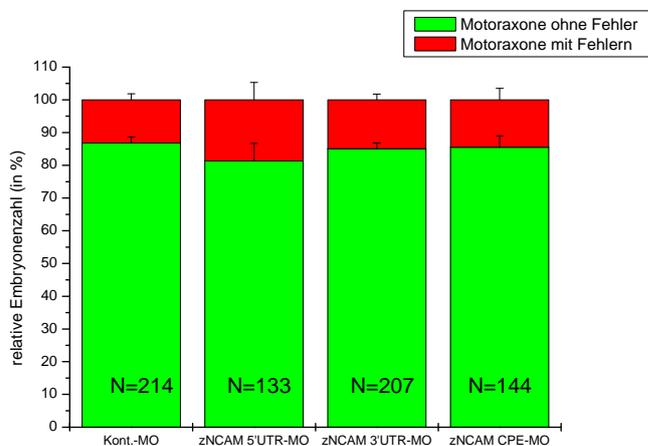


Abb. 51: Fehlerverteilung der Motoraxone nach zNCAM-MO-Injektion

Nach fünf unabhängigen Injektionen zeigt sich, dass 86,82 % der Kontrollembryonen, 81,33 % der zNCAM 5'UTR-MO, 85,1 % der zNCAM 3'UTR-MO und 85,51 % aller zNCAM CPE-MO injizierten Embryonen normal ausgewachsene Motoraxone aufwiesen. N = Gesamtembryonenzahl

9.2 Auswuchsverhalten nach zPCAM-MO-Injektion

Auch im Fall der zPCAM-Morpholino-Injektionen wurden alle Embryonen auf etwaige Fehler beim Auswachsen der Motoneuronenaxone hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Injektion des 5'UTR-Oligonukleotids die Fehlerrate signifikant auf etwa 70 % erhöhte. Motoraxone, die nach der Applikation von Kontroll- bzw. CPE-Morpholinos auswuchsen, wiesen nur eine leicht erhöhte Fehlerrate zwischen 30 und 55 % auf (Abb. 52).

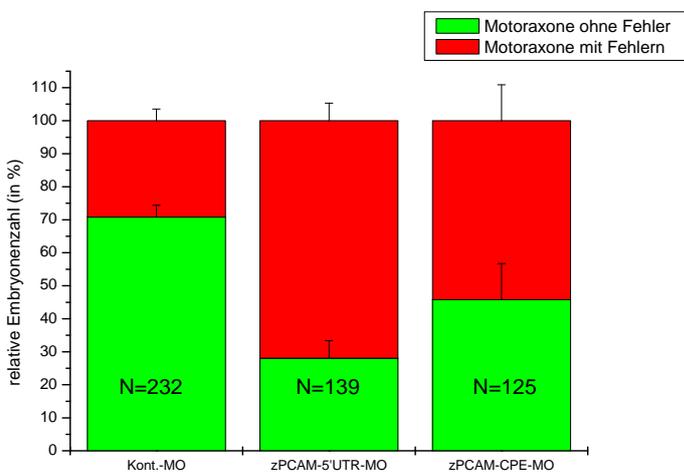


Abb. 52: Fehlerverteilung der Motoraxone nach zPCAM-MO-Injektion

Nach fünf unabhängigen Injektionen zeigt sich, dass 70,81 % der Kontrollembryonen, aber nur noch 28,06 % der zPCAM 5'UTR-MO und 45,82 % aller zPCAM CPE-MO injizierten Embryonen normal ausgewachsene Motoraxone aufwiesen. N = Gesamtembryonenzahl

9.3 Auswuchsverhalten nach MO-Gemisch-Injektion

Insgesamt stellte sich die Situation nach der Injektion der Morpholinogemische ähnlich wie nach einzelner zPCAM 5'UTR-Morpholino-Injektion dar. Kontroll- und CPE-Morpholinogruppe erschienen nicht deutlich von einander verschieden und wiesen in mindestens 60 % aller Fälle keine Fehler auf, wohingegen die Motoraxone nach Applikation des 5'UTR-Gemisches mit einer größeren Fehlerrate auswuchsen. Lediglich 39,7 % aller Embryonen zeigten normal ausgewachsene Motoraxone. Der Rest der Gruppe wies Wachstumsfehler auf (Abb. 53).

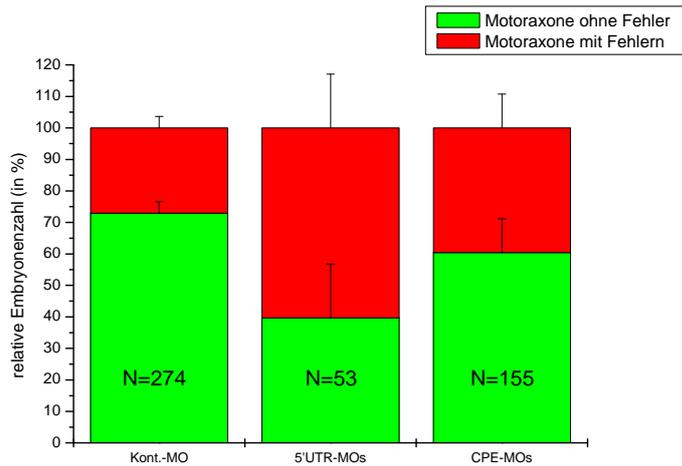


Abb. 53: Fehlerverteilung der Motoraxone nach Morpholinogemisch-Injektion

Nach fünf unabhängigen Injektionen zeigt sich, dass 72,95 % der Kontrollembryonen, aber nur noch 39,71 % der 5'UTR-MO-Gemisch und 60,42 % aller CPE-MO-Gemisch injizierten Embryonen normal ausgewachsene Motoraxone aufwiesen. N = Gesamtzahl der Embryonen

Zusammenfassend lässt sich nach der Auswertung des Motoraxonwachstums sagen, dass zNCAM offenbar keinen Einfluss auf das Projektionsmuster der Motoneurone hat. Nach seinem Knockdown kam es zu keiner Häufung von Wachstumsfehlern. Der CPE-MO zeigte auch hier wiederum keinen Effekt.

Wurde hingegen die Expression von zPCAM inhibiert, kam es zu einer deutlichen Zunahme dieser Fehler, was darauf schließen lässt, dass zPCAM womöglich einen bisher unbekannt Einfluss auf das Auswachsen von Motoneuronen hat.

Die Kombination beider 5'UTR-MOs führte ebenfalls zu einer Steigerung der Fehlerrate, was sich mit einem, dem zPCAM-Knockdown ähnlichen Effekt erklären ließe. Allerdings darf hierbei nicht die geringe Anzahl überlebender Embryonen in diesem Experiment aus den Augen gelassen werden.

10. Gegenüberstellung der PSA-Mengen nach 5'UTR-Morpholino-Injektion

Wie unter Kapitel IV.3.2 und 6.2 bereits beschrieben, führte lediglich die Injektion der 5'UTR-MOs zu einer augenscheinlichen Verminderung der PSA-Menge im Rückenmark und auf den Motoraxonen. Bei der Auswertung der Präparate am Konfokalmikroskop fiel auf, dass die PSA-Menge, im Vergleich zur Kontrollsituation, nach zNCAM-Knockdown stärker reduziert erschien als nach Inhibition der zPCAM-Expression (Abb. 54).

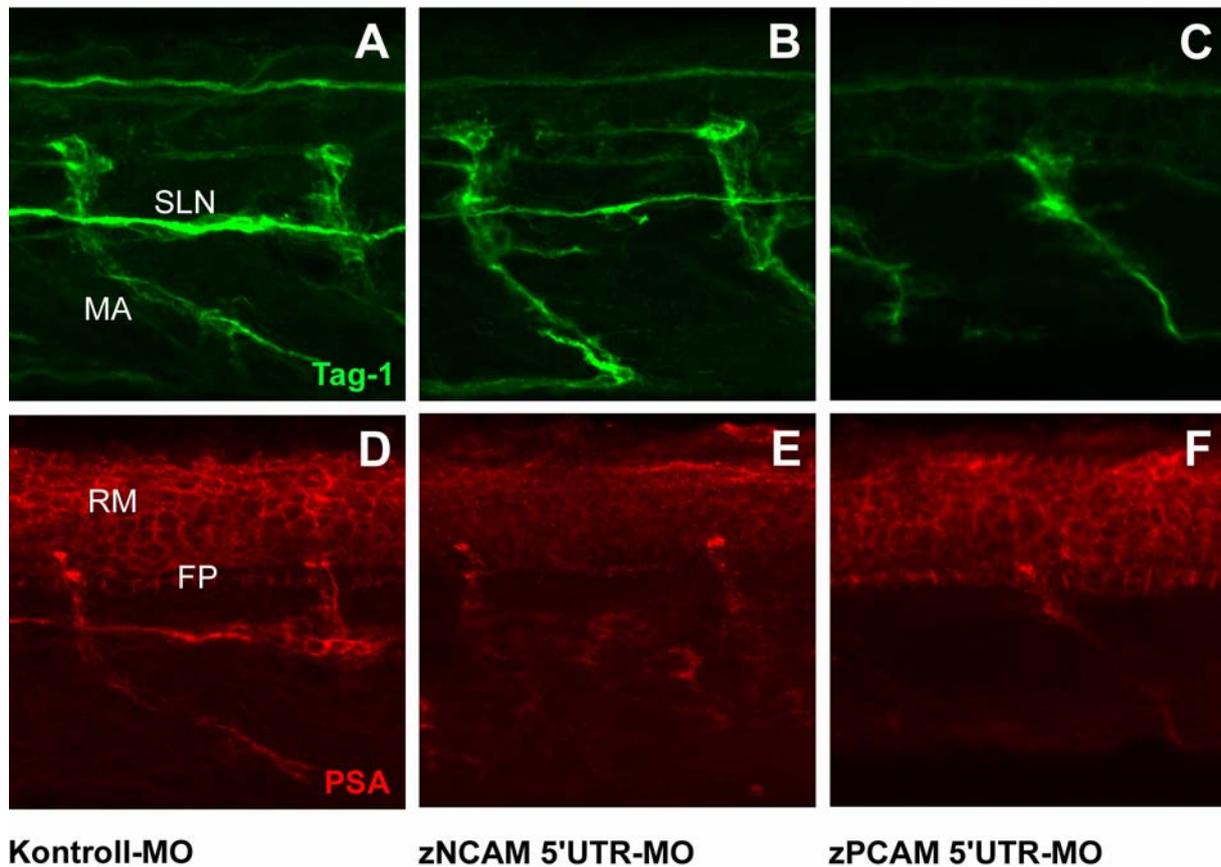


Abb. 54: Gegenüberstellung der PSA-Mengen nach 5'UTR-MO-Injektion

Die Abbildungen A-C zeigen Ausschnitte aus den untersuchten Schwanzabschnitten mit einer Immunfärbung gegen Tag-1. Abbildungen D-F zeigen die PSA-Gegenfärbung mit m735 in den entsprechenden Abschnitten. Die Kontrollsituation zeigt eine normale PSA-Menge auf den Zellkörpern im Rückenmark und den Axonen der Motoneurone. Im Vergleich dazu erscheint die PSA-Menge nach Injektion des zNCAM 5'UTR-MOs deutlich reduziert. PSA scheint auch nach Applikation des zPCAM 5'UTR-MOs reduziert – allerdings nicht im selben Maß wie nach zNCAM-Knockdown. FP – floor plate, MA – Motoraxone, RM – Rückenmark, SLN – Seitenliniennerv; Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

10.1 Quantifizierung der PSA-Menge mittels Endo:GFP-Fusionsprotein

Um die beschriebene Beobachtung der PSA-Reduktion im Rückenmark und auf den Motoraxonen (vgl. Kapitel IV.3.2 und 6.2) direkt und ohne Umwege über eine zweistufige Immunfärbung sichtbar zu machen, kam eine Endosialidase aus einem *E. coli* K1-spezifischem Bakteriophagen zum Einsatz. Dieses PSA-spaltende Enzym ist durch eine Punktmutation in der katalytischen Domäne funktionell inaktiv, kann aber noch an PSA binden. Durch die Fusion mit GFP steht einem ein Werkzeug für den direkten PSA-Nachweis zur Verfügung (Jokilampi et al., 2004). Auf diese Weise war es möglich den tatsächlichen *in vivo*-Status darzustellen und eine unkontrollierte Potenzierung des PSA-Signals zu umgehen, wie sie mit einer zweistufigen Immunfärbung (Primär- und farbstoffgekoppelter Sekundärantikörper), einhergeht.

Mit Kontroll-, zNCAM 5'UTR- und zPCAM 5'UTR-MOs injizierte Embryonen wurden im Alter von 36 hpf mit diesem Fusionsprotein gefärbt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils

fünf Embryonen ausgewählt, am Konfokalmikroskop gescannt und ausgewertet. Da die Endo:GFP-Färbung die Motoraxone nur relativ schwach markiert hatte, war eine Bestimmung der veränderten Fluoreszenzintensitäten nur im Rückenmark möglich (Abb. 55).

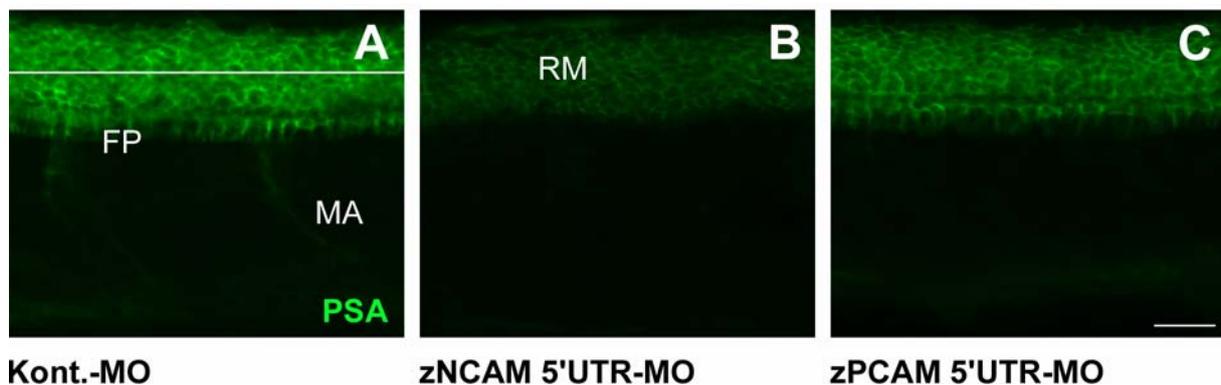


Abb. 55: Quantifizierung der PSA-Menge mittels Endo:GFP-Fusionsprotein

Die Abbildungen A-C zeigen die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten Endo:GFP gefärbter Schwanzabschnitte nach MO-Injektion. Abbildung A gibt die Intensität nach Kontroll-MO-Injektion wieder, Abbildung B nach zNCAM 5'UTR-MO und Abbildung C nach zPCAM 5'UTR-MO-Injektion. Entlang der weißen Linie wurde jeweils der Verlauf der Fluoreszenzintensitäten gemessen. FP – floor plate, MA – Motoraxon, RM – Rückenmark; Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten entsprechen den Graustufen in einem mit 12 Bit Datentiefe aufgenommenen Konfokalbild und sind ohne Einheiten. Tabelle 7 gibt die gemessenen Intensitäten wieder.

Morpholino	Fluoreszenz-intensität Experiment 1 n = 5	Fluoreszenz-intensität Experiment 2 n = 5	Fluoreszenz-intensität Experiment 3 n = 5	Gemittelte Fluoreszenz-intensität n = 15
Kontroll-MO	1855,21 \pm 54,88	2412,41 \pm 86,07	2089,85 \pm 40,41	<u>2119,15 \pm 69,82</u>
zNCAM 5'UTR-MO	1022,94 \pm 54,41	762,74 \pm 81,82	884,57 \pm 70,51	<u>890,08 \pm 46,91</u>
zPCAM 5'UTR-MO	1732,21 \pm 169,11	1490,00 \pm 136,41	1211,13 \pm 145,25	<u>1477,78 \pm 98,7</u>

Tabelle 7: Unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten nach MO-Injektion

Setzt man nun die gemittelte Fluoreszenzintensität der Kontrolle 100 %, kann man die Reduktion der PSA-Menge nach der jeweiligen Morpholino-Injektion abschätzen. Die jeweiligen Intensitäten entsprechen dann:

Kontroll-MO: 2119,15 = 100%

zNCAM 5'UTR- MO: 890,08 = 42,0%

zPCAM 5'UTR- MO: 1477,78 = 69,73 %

Die Injektion des zNCAM 5'UTR- MOs verringert die Menge an PSA im Rückenmark also um ca. 58 % und die des zPCAM-MOs um 30,27 %.

11. Weitere Analyse PSA-exprimierender Strukturen

Die Untersuchung der zNCAM- und zPCAM-Expression mittels *in situ*-Hybridisierung hatte ergeben, dass zPCAM unter anderem auch im otischen Vesikel vorkommt, zNCAM hingegen nicht. In diesem Kapitel soll der Einfluss der Morpholino-Injektionen auf diese Struktur aufgeklärt werden, wofür die vorangegangenen Experimente ausgewertet wurden.

11.1 PSA-Expression im otischen Vesikel nach zNCAM-MO-Injektion

Die Abbildungen 56E-H zeigen eine unveränderte PSA-Expression nach zNCAM-MO-Injektion im otischen Vesikel. Unabhängig davon, welcher Morpholino injiziert wurde, blieb die PSA-Menge gleich. Abbildung 56F zeigt gleichzeitig die deutliche, aber nicht vollständige Reduktion von PSA im Gehirn nach zNCAM 5'UTR-MO-Injektion, wie sie bereits im Rückenmark beobachtet wurde. Die Gegenfärbung dieses Hinterhirnareals mit dem Tag-1-spezifischen Antikörper zeigt keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Auswachsens des Seitenliniennervs und der Cranialnerven V und VII. Auch scheinen kommissurale Axone ohne Fehler auf die entsprechende kontralaterale Seite im Hinterhirn zu projizieren.

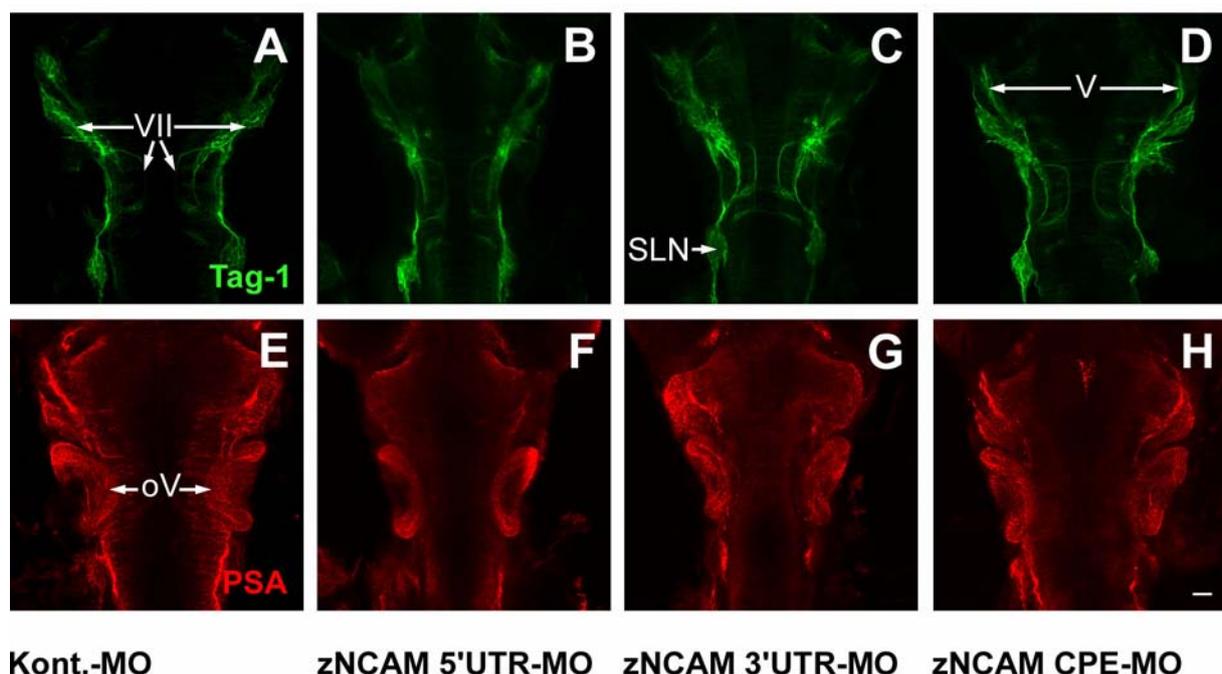


Abb. 56: PSA-Expression im otischen Vesikel nach zNCAM-MO-Injektion

Die Abbildungen A-D zeigen eine Dorsalansicht des Hinterhirns im Bereich der otischen Vesikel mit einer Immunfärbung gegen Tag-1. Abbildungen E-H zeigen die selben Bereiche mit der Gegenfärbung gegen PSA. Hier zeigte sich, dass die PSA-Mengen im otischen Vesikel in allen vier Fällen unverändert waren. Auch zeigten sich in diesem Bereich keine Anormalitäten, was z.B. das Auswachsen des Seitenliniennervs und der Cranialnerven 5 und 7 (V, VII) angeht. Au – Auge, SLN – Kerngebiet des Seitenliniennervs, oV – otischer Vesikel, V – 5. Cranialnerv (*Nervus trigeminus*), VII – 7. Cranialnerv (*Nervus facialis*); Der Maßstabsbalken entspricht 20 µm.

Statistisch ausgewertet wurde deutlich, dass nach fünf unabhängigen Injektionen keines der injizierten Oligonukleotide eine signifikante Verringerung der PSA-Menge im otischen Vesikel induzieren konnte. In allen vier Fällen war in mindestens 89 % aller untersuchten Embryonen die PSA-Menge im otischen Vesikel normal (Abb. 57).

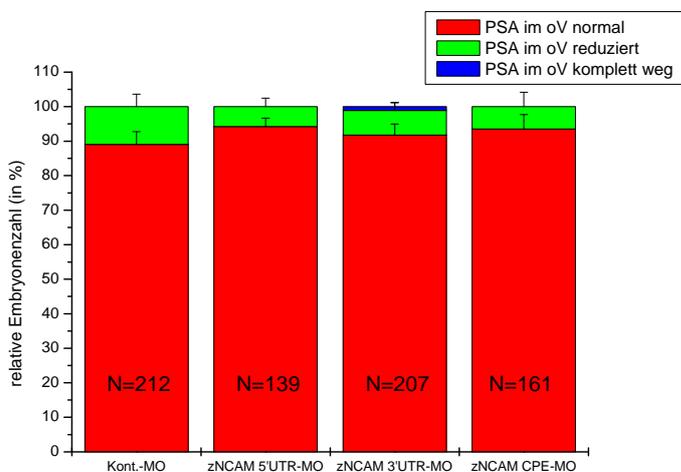


Abb. 57: Statistische Darstellung der PSA-Expression im otischen Vesikel nach zNCAM-MO-Injektion

Nach Auswertung von fünf unabhängigen Injektionen zeigte sich, dass die PSA-Menge im otischen Vesikel nahezu unverändert blieb. 89,07 % aller Kontrollenembryonen wiesen normale PSA-Mengen auf. 94,24 % der 5'UTR-MO, 91,78 % der 3'UTR MO und 93,52 % der CPE-MO injizierten Embryonen zeigten keine Veränderungen in der PSA-Menge. oV – otischer Vesikel; N = Gesamtembryonenzahl

11.2 PSA-Expression im otischen Vesikel nach zPCAM-MO-Injektion

Die vorangegangenen Experimente hatten bereits gezeigt, dass zPCAM ebenfalls glykosyliert ist und PSA gebunden hat. Im otischen Vesikel war deshalb PSA mit Hilfe des PSA-spezifischen Antikörpers m735 nachweisbar.

Nach zPCAM-MO-Injektion trat eine veränderte PSA-Expression im otischen Vesikel auf (Abb. 58). Die Menge an nachweisbarer PSA ist nach der zPCAM-5'UTR-MO-Applikation deutlich verringert, wohingegen sie nach der entsprechenden CPE-MO-Gabe im Vergleich zur Kontrolle leicht reduziert erscheint. Die Gegenfärbung von Tag-1 zeigte keine Anormalitäten im Wachstumsmuster der Cranialnerven V und VII, sowie des Seitenliniennervs.

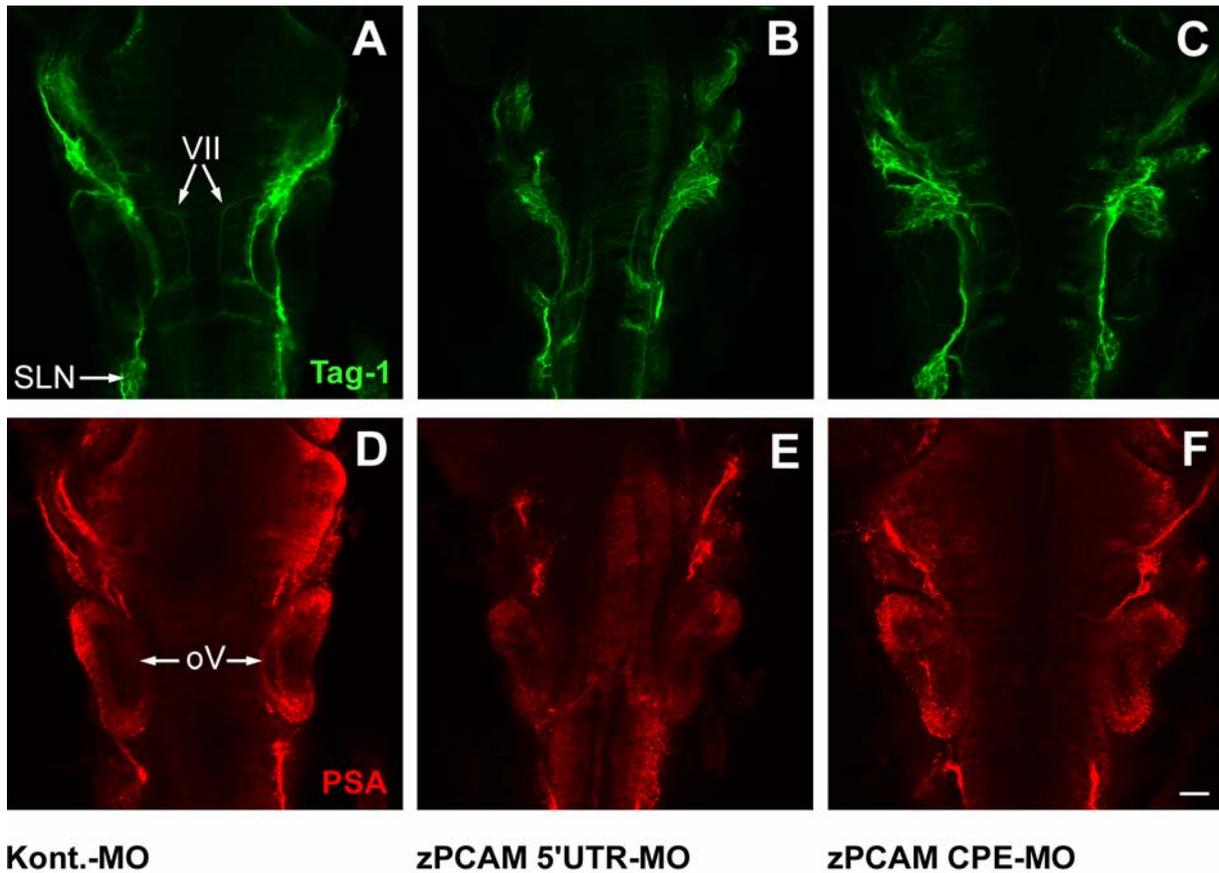


Abb. 58: PSA-Expression im otischen Vesikel nach zPCAM-MO-Injektion

Die Abbildungen A-C zeigen eine Dorsalansicht des Hinterhirns im Bereich der otischen Vesikel mit einer Immunfärbung gegen Tag-1. Abbildungen D-F zeigen die selben Bereiche mit der Gegenfärbung von PSA. Hier zeigte sich, dass die PSA-Menge im otischen Vesikel nach zPCAM 5'UTR-MO deutlich und nach zPCAM CPE-MO-Injektion im Vergleich zur Kontrolle nur leicht reduziert war. Trotz allem zeigten sich in diesem Bereich keine Anormalitäten, was z.B. das Auswachsen der Cranialnerven 5 und 7 angeht. In den Abbildungen D und E ist deutlich zu erkennen, dass Cranialnerven PSA-positiv sind. oV – otischer Vesikel, SLN – Kerngebiet des Seitenliniennervs, VII – 7. Cranialnerv (*Nervus facialis*); Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Der Knockdown mittels 5'UTR-Morpholino reduzierte die PSA-Menge im otischen Vesikel in 78,87 % aller untersuchten Embryonen signifikant bzw. konnte er sie komplett vermindern. Dagegen war sie lediglich in 34,8 % der Kontrollen reduziert. Im Fall des CPE-MOs war in 64,62 % der Fälle PSA reduziert bzw. vollständig verschwunden (Abb. 59). Dieses Ergebnis fiel unerwartet aus, da bereits gezeigt wurde, dass der CPE-Morpholino das PSA-Muster auf den Motoraxonen unbeeinflusst lässt (vgl. Kapitel IV.6.2). Aus diesem Grund kann über die Ursachen für dieses Ergebnis nur spekuliert werden. Handelt es sich dabei um ein Artefakt der Immunfärbung oder bindet und blockiert der zPCAM-CPE-MO andere mRNAs, was sich auf die Expression von PSA im otischen Vesikel auswirkt?

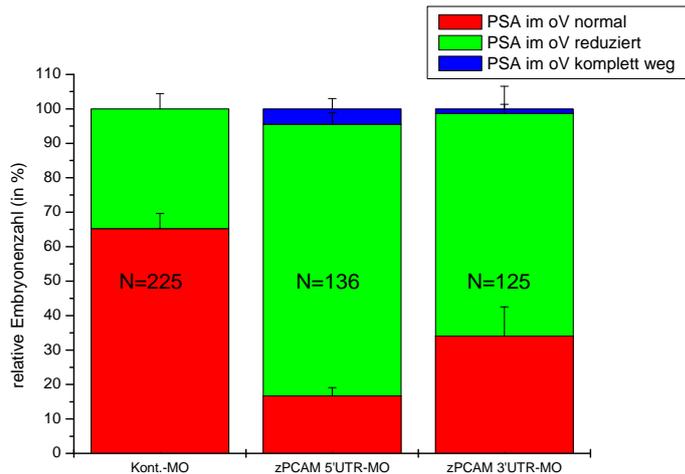


Abb. 59: Statistische Darstellung der PSA-Expression im otischen Vesikel nach zPCAM-MO-Injektion

Nach Auswertung von 5 unabhängigen Injektionen zeigte sich, dass die PSA-Menge im otischen Vesikel in 65,22 % aller Kontrollenembryonen normal war. Im Gegensatz dazu wiesen nur noch 16,65 % der 5'UTR-MO und 34,05 % der CPE-MO injizierten Embryonen keine Veränderungen in der PSA-Menge auf. In den restlichen Fällen war PSA reduziert bzw. komplett verschwunden. N = Gesamtembryonenzahl

11.3 PSA-Expression im otischen Vesikel nach MO-Gemisch-Injektion

Zur Auswertung der PSA-Expression standen wieder nur die überlebenden Embryonen der MO-Gemisch-Injektionen zu Verfügung, weswegen die statistische Auswertung dieses Experiments wenig aussagekräftig ist.

Ähnlich wie die PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen stellte sich die Situation im otischen Vesikel dar. In der Kontrollgruppe war die PSA-Menge in 78,6 % aller Embryonen normal und im Rest der Gruppe reduziert. Im Gegensatz dazu war eine signifikante Reduktion nach Injektion des 5'UTR-Morpholinogemisches feststellbar. Lediglich in 15,4 % aller Embryonen schien die PSA-Menge normal. Im Fall der restlichen 70,6 % war die PSA-Menge im otischen Vesikel zumindest reduziert.

Auch in diesem Versuchsabschnitt erschien die Situation nach der Injektion des CPE-Morpholinogemisches ähnlich wie in der Kontrolle; ca. 49 % der Embryonen wiesen im otischen Vesikel eine unveränderte PSA-Menge auf, im Rest der Gruppe war sie reduziert (Abb. 60). Das lässt darauf schließen, dass es sich bei der Reduktion der PSA im otischen Vesikel nach Injektion des zPCAM-CPE-MOs offensichtlich nur um ein Artefakt der Immunfärbung handelt.

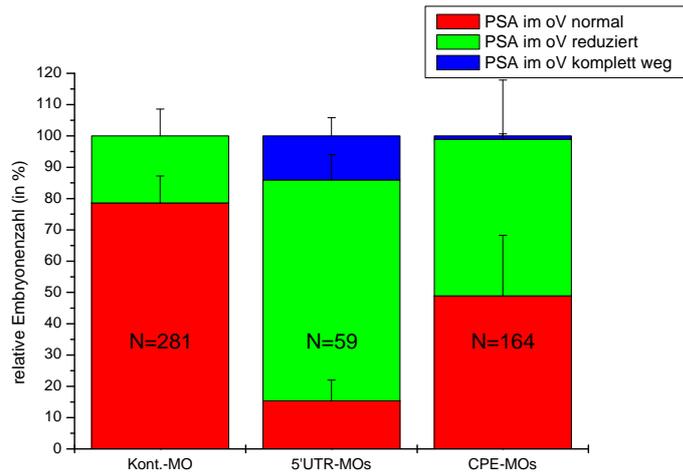


Abb. 60: Statistische Darstellung der PSA-Expression im otischen Vesikel nach MO-Gemisch-Injektion

Nach Auswertung von fünf unabhängigen Injektionen zeigte sich, dass die PSA-Menge im otischen Vesikel in 78,62 % aller Kontrollenembryonen normal war. Im Gegensatz dazu wiesen nur noch 15,37 % der 5'UTR-MO-Gemisch und 48,88 % der CPE-MO-Gemisch injizierten Embryonen keine Veränderungen in der PSA-Menge auf. In den restlichen Fällen war PSA zumindest reduziert bzw. komplett verschwunden. N = Gesamtembryonenzahl

Die Auswertung der PSA-Expression im otischen Vesikel hat die bisherigen Ergebnisse gefestigt.

- ZPCAM ist, neben zNCAM, ein zweiter Akzeptor für PSA.
- Die Funktion der beiden CPEs bleibt hingegen unklar.

V. Diskussion

Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, ein propagiertes Modell zum Transport von zNCAM-, zOCAM- und zPCAM-mRNA in den Motoneuronen des Zebrafisches zu überprüfen. Dieses Modell beruhte auf Befunden zur Glykosyltransferase STX, deren mRNA-Transport durch Blockade ihres in der 3' untranslatierten Region (UTR) enthaltenen cytoplasmatischen Polyadenylierungselementes (CPE) inhibiert werden kann. Die STX-mRNA wird in diesem Fall unter Kontrolle des CPEs aus dem Soma der Motoneurone in die jeweiligen Axone transportiert und erst dort translatiert. Es sollte überprüft werden, ob die drei potentiellen Akzeptoren des von der STX übertragenen Kohlenhydratepitops PSA, zNCAM, zOCAM und zPCAM, ebenfalls ein CPE in ihrer 3'UTR enthalten und ihre mRNA in diesem Fall aus dem Soma in die Axone der Motoneurone transportiert wird.

1. Klonierung der 3'UTRs der drei Zebrafisch-CAMs

Die Klonierung und Sequenzierung der 3' untranslatierten Regionen der zNCAM- und zPCAM-mRNA hatte ergeben, dass beide CAMs ein cytoplasmatisches Polyadenylierungselement (CPE) enthalten. Beide Male weist es die Sequenz UUUUUUAU auf. Im Fall von zNCAM ist das CPE 472 Basen nach dem Stopcodon lokalisiert. Weitere 160 Basen nach dem CPE findet man das Poly(A)-Signal AAUAAA, wie es unter anderem von Mendez und Richter (2001) und Dickson et al. (2001) publiziert wurde. Wie bereits unter Kapitel II.4. beschrieben, sind diese beiden Sequenzmotive an der lokalen Aktivierung von mRNA beteiligt.

CPE und Poly(A)-Signal liegen laut Mendez und Richter zwischen 20 und 30 Basen auseinander. In der zNCAM-mRNA befinden sich beide Motive aber 160 Nukleotide voneinander entfernt. Wenn die zNCAM-Translation tatsächlich CPE-vermittelt reguliert wird, müssten beide Sequenzmotive in eine räumliche Nähe gebracht werden, damit die daran bindenden Faktoren, CPEB und CPSF, ebenfalls in Kontakt zueinander treten könnten. So wäre gewährleistet, dass sie interagieren und die Elongation des Poly(A)-Schwanzes induzieren könnten. Um diesen Aktivierungsschritt zu initiieren, wäre es denkbar, dass hierfür eine potentielle Sekundärstruktur der zNCAM-mRNA, z.B. eine Haarnadelstruktur, diese Distanzüberbrückung zwischen CPE und Poly(A)-Signal schafft. Ermöglicht würde solch eine Haarnadel durch den Umstand, dass CPE-Sequenz (UUUUUUAU), Poly(A)-Signal (AAUAAA) und die sie flankierenden Nukleotide in einem gewissen Grad zu einander komplementär sind. Die Vorhersage möglicher Sekundärstrukturen mit der DNASTar-Software bestätigte diese Vermutung. Die zNCAM 3'UTR kann also eine Haarnadelschleife bilden, wodurch CPEB und CPSF in räumliche Nähe zueinander gebracht würden, was eine Aktivierung der zNCAM-mRNA mit allen daran benötigten Prozessen bewirken würde.

Eine CPE-abhängige Aktivierung der zPCAM-mRNA scheint mit Kenntnis der vorliegenden 3'UTR-Sequenz nicht möglich. Die klonierte UTR enthält zwar 364 Nukleotide downstream vom

Stop-Codon ein CPE, doch kein Poly(A)-Signal. Das kann zwei verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit wäre, dass durch die Klonierung nicht die komplette UTR erfasst wurde. Dafür würde sprechen, dass sich diese 3'UTR nicht so problemlos klonieren ließ, wie die der zNCAM-mRNA. So ergaben nicht alle möglichen Primerkombinationen saubere PCR-Produkte. Entweder es entstanden keine Fragmente oder nur solche mit unterschiedlichen Längen, sodass sich die entsprechenden Produkte im Agarosegel als Schmier darstellten. Die zweite mögliche Erklärung ist, dass die zPCAM 3'UTR zwar vollständig kloniert wurde, aber kein Poly(A)-Signal enthält. In der von Mizuno et al. (2001) publizierten mRNA-Sequenz findet sich bereits das CPE. Doch auch in der durch Klonierung um weitere 229 Nukleotide verlängerten 3'UTR-Sequenz ließ sich kein Poly(A)-Signal nachweisen. Insgesamt schlossen sich 290 Basen an das CPE an, ein Bereich, in dem sich innerhalb der zNCAM 3'UTR bereits das Poly(A)-Motiv finden lässt. Das bedeutet, dass die zPCAM 3'UTR nicht vom CPSF-Komplex gebunden und in der Folge die zPCAM-mRNA nicht durch diesen bekannten Mechanismus aktiviert werden kann.

In diesem Fall erfolgt entweder kein mRNA-Transport in verschiedene Zellkompartimente, oder die zPCAM-Translation wird nicht CPE-abhängig kontrolliert. Eventuell wird sie stattdessen durch einen anderen, bisher unbekanntes Mechanismus reguliert.

Die mRNA von zOCAM, dem dritten Mitglied der NCAM-Familie im Zebrafisch enthält in ihrer 3'UTR lediglich zwei Poly(A)-Signale, die 1257 und 1362 Nukleotide nach dem Stop-Codon lokalisiert sind. Vor keinem der beiden Hexanukleotide befindet sich ein CPE. Daraus kann man schließen, dass eine zOCAM-Translation nicht CPE-vermittelt reguliert wird. Während der frühen Embryonalentwicklung bis etwa 48 hpf wird zOCAM nur in den Kerngebieten der olfaktorischen Plakode exprimiert. Offensichtlich spielt eine lokale Translationskontrolle bei der Entwicklung der olfaktorischen Projektionen keine Rolle. Ebenso scheint auch die ab 48 hpf einsetzende zOCAM-Expression im Gehirn nicht CPE-vermittelt zu erfolgen. Die Klonierung der 3'UTR aus cDNA adulter Gehirne und ihre anschließende Sequenzierung ergab das gleiche Ergebnis wie die Klonierung aus embryonaler cDNA: Die zOCAM-mRNA enthält kein CPE. Eine zOCAM-Expression wird also auch während der späteren Embryonalentwicklung nicht CPE-abhängig kontrolliert. Das schließt die Existenz einer adulten, CPE-enthaltenden zOCAM-Isoform aus, wie sie z.B. durch alternatives Spleißen entstehen könnte.

Während der Klonierung der zNCAM 3'UTR traten wiederholt Doppelbanden bei der Auswertung der entsprechenden PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese auf. Die Sequenzierung dieser Doppelbanden hatte ergeben, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Fragmente von zNCAM handelt, von denen die größere von beiden ein alternatives Exon mit 423 Basen Länge enthielt. Die weitere Analyse dieses Exons ergab, dass es zwischen den beiden letzten Exons (Exon 15 und 16) der zNCAM-mRNA inseriert. Im Rahmen der Sequenzierung des Zebrafischgenoms durch das Sanger-Institut wurde diese Sequenz bereits 2006 von Murnane als Teil eines Sequenzierungsklons unter der Accession-Nr. CR388411 publiziert. Alle weiteren Abgleiche dieser Sequenz mit Datenbanken (PubMed und Ensembl) führten zu keinen zusätzlichen Resultaten.

Da entweder die Amplifizierung oder auch die Sequenzierung dieses Exons nicht zu 100% korrekt verlief, wies die Sequenz des alternativen Exons einen Fehler im Leseraster auf. Dadurch war es nicht möglich, die mRNA-Sequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz zu übersetzen, wodurch sich weitere Möglichkeiten der Analyse ergeben hätten. Fest steht daher nur, dass das Ende von Exon 15, an das sich das alternative Exon anschließt, der Aminosäure 797 entspricht. Folglich codiert das alternative Exon für einen Teil der intrazellulären Domäne von zNCAM. Es bleibt aber unklar, ob es sich dabei um den Teil des Proteins handelt, der NCAM180 von seiner kleineren Isoform 140 unterscheidet. Die Möglichkeit kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Denkbar wäre in diesem Fall auch, dass dieses alternative Exon für einen Teil der cytoplasmatischen Domäne codiert, der eine zusätzliche Funktion während der Signaltransduktion in das Innere der Zelle übernimmt. Möglicherweise wird so eine weitere Bindungsstelle für Komponenten des Cytoskeletts, z.B. Spektrin, geschaffen, unter dessen Vermittlung NCAM mit Rezeptoren einen Komplex bilden kann (Maness und Schachner, 2007). So würden eventuell zwei verschiedene Signalwege angeschaltet werden: der erste Weg über die kürzere cytoplasmatische Domäne und der zweite über den um das alternative Exon längeren C-Terminus.

2. Analyse der CAM-Expressionsmuster mittels *in situ*-Hybridisierung

Die Auswertung der Expressionsmuster von zNCAM und zPCAM hatte ergeben, dass beide überlappend exprimiert werden. Bei beiden setzt die Synthese ihrer mRNA zu Beginn der Neurulation im Alter von etwa 12 hpf ein, was auf eine entscheidende Funktion beider CAMs für die Neuralentwicklung im Zebrafisch schließen lässt. Da beide Proteine zu 65% homolog zueinander sind, eine ähnliche Struktur und konservierte N-Glykosylierungsstellen aufweisen, kann man davon ausgehen, dass sich beide CAMs im Zebrafisch aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben und funktionelle Gemeinsamkeiten haben.

Während die Expression von zNCAM im Vorderhirn beginnt und sich während der weiteren Embryonalentwicklung über Mittel- und Hinterhirn bis ins Rückenmark ausdehnt, beginnt die zPCAM-Expression im Rückenmark und breitet sich von dort ausgehend nach rostral bis ins Gehirn aus.

Ein entscheidender Unterschied zu zNCAM ist aber die zPCAM-Expression im otischen Vesikel, die besonders deutlich in frühen Stadien (18 bis 24 hpf) wird. Offenbar übernimmt zPCAM eine Funktion bei der Entwicklung des Ohres aus der otischen Plakode, die im Zebrafisch im Alter von 16 hpf einsetzt (Schibler und Malicki, 2007). Für die Induktion der otischen Plakode sind unter anderem FGF3 und FGF8 (fibroblast growth factor) notwendig. Eine Misexpression von beiden führt zur Induktion von ektopischem otischen Gewebe (Phillips et al., 2004). Von NCAM weiß man bereits, dass es heterophile Bindungen mit dem FGF-Rezeptor eingehen und ihn auf diese

Weise aktivieren kann (Kiselyov et al., 2005). Deswegen wäre es durchaus denkbar, dass zPCAM im otischen Vesikel ebenfalls solch eine Funktion übernehmen kann und auf diese Weise als Co-Faktor bei der Entstehung der otischen Plakode fungiert.

Im Alter von etwa 30 hpf erreicht die Co-Expression beider CAMs in Gehirn und Rückenmark ihr Maximum. Dieses ähnliche Expressionsmuster während der frühen Neuralentwicklung unterstreicht nochmals die Vermutung funktioneller Gemeinsamkeiten von zNCAM und zPCAM. Offensichtlich können beide CAMs in gewissem Maße das Fehlen des jeweils anderen kompensieren. Diese Vermutung wurde durch die Knockdown-Experimente mit beiden Zelladhäsionsmolekülen bestätigt und werden in Kapitel V.3 diskutiert.

Nach 30 hpf wird die Expression von zNCAM und zPCAM reduziert. In beiden Fällen sinkt die Menge nachweisbarer mRNA im Rückenmark und ist im Alter von 72 hpf nicht mehr nachweisbar. Lediglich im Gehirn bleibt die Menge von zNCAM- und zPCAM mRNA hoch. Offensichtlich ist nach 30 hpf die Bildung und Etablierung neuraler Projektionen aus und in das Rückenmark bereits abgeschlossen. Die ersten primären Motoneurone (CaP, MiP, RoP) wachsen ab 17 hpf aus, gefolgt von den sekundären Motoneuronen, die ca. fünf Stunden später ihre Axone entlang der primären Motoraxone in ihr jeweiliges Zielgebiet aussenden (Myers et al., 1986; Eisen, 1991). Bis 30 hpf hat sich so ein erstes Gerüst spinaler Projektionen ausgebildet, das offenbar keiner weiteren Plastizität unterliegt und somit keiner intensiven zNCAM- oder zPCAM-Expression mehr bedarf. Entweder wird in diesem Alter die Expression beider CAMs im Rückenmark vollständig eingestellt oder sie bleibt in so kleinen Mengen erhalten, die sich mittels *in situ*-Hybridisierung nicht mehr detektieren lassen. Durch diese geringe Proteinmenge könnte beispielsweise der ständige Auf- und Abbau ("turnover") von zNCAM und zPCAM in den Membranen von Neuronen aufrechterhalten werden. Auf diese Weise wäre gewährleistet, dass die bereits ausgebildeten Trajektorien in ihrer bestehenden Form erhalten blieben. Benachbarte Axone könnten nicht defaszikulieren, da sie von zNCAM oder zPCAM zusammengehalten würden.

Das hohe Expressionslevel beider CAMs in 3 dpf alten Gehirnen steht der Situation im Rückenmark entgegen. Im Vergleich zum Expressionsmaximum nach 30 hpf ist die Menge nachweisbarer zNCAM- oder zPCAM-mRNA im Gehirn nur minimal verringert. Das lässt auf ein hohes Maß an neuronaler Plastizität schließen. Bereits im Alter von 48 hpf sind zwar die wichtigsten elf Trakte und die sieben sie verbindenden Kommissuren im Gehirn angelegt (Wullmann et al., 1996), aber möglicherweise handelt es sich dabei nur um ein relativ grobes Gerüst neuronaler Verschaltungen, das einer weiteren Verfeinerung bedarf. In diesem Fall käme es zu Verstärkung und Umbau synaptischer Verschaltungen, die zNCAM- und wohl auch zPCAM-abhängig verlaufen (Persohn et al., 1989; Cremer et al., 1997; Bruses und Rutishauser, 2001). Synapsen würden durch die Bindungen beider CAMs stabilisiert. Für diese Vermutung würde auch die ubiquitäre Expression beider Zelladhäsionsmoleküle in 3 dpf alten Gehirnen sprechen. Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung ließen sich keine einzelnen Trakte oder

Kommissuren nachweisen. Vielmehr wurden zNCAM und zPCAM weiträumig im Gehirn exprimiert.

Bisher war lediglich bekannt, dass OCAM in frühen Stadien während der Entwicklung olfaktorischer Projektionen exprimiert wird und sich auch nur auf Neuronen dieses Areals finden lässt. Durch die Bildung homophiler Bindungen in *trans* moduliert es das Auswachsen von Axonen aus dem Riechepithel in den *Bulbus olfactorius* der Maus (Yoshihara et al., 1997; Hamlin et al. 2004). Über eine Rolle von OCAM in späteren Phasen der Neuralentwicklung weiß man bisher nichts. Aus diesem Grund lässt sich deshalb nur über eine mögliche Funktion von zOCAM während der späten Zebrafiscentwicklung spekulieren. Die spät einsetzende (48 hpf) und danach relativ ubiquitäre Expression im Gehirn 3 dpf alter Embryonen lässt auf eine ebenso wichtige Rolle von OCAM während der Entwicklung des Nervensystems zwischen 48 und 72 hpf schließen. Eventuell moduliert es während dieser Phase der neuronalen Entwicklung nicht nur im Bulbus, sondern auch in großen Teilen des Gehirns, das Auswachsen von Neuronen, indem es z.B. deren Migration vermittelt.

Eine andere mögliche Funktion könnte die Stabilisierung von synaptischen Verschaltungen sein, wie sie bereits von NCAM aus Regionen mit hoher neuronaler Plastizität bekannt ist (Persohn et al., 1989; Cremer et al., 1997; Bruses und Rutishauser, 2001). Zwar sind im Alter von 48 hpf mit elf Trakten und sieben, die sie verbindenden Kommissuren, die meisten und wichtigsten Verschaltungen im Gehirn angelegt (Wullimann et al., 1996), aber es ist denkbar, dass zOCAM ebenfalls an der Feinabstimmung dieses neuralen Grundgerüsts beteiligt ist. Dafür würde die ubiquitäre Expression von zOCAM sprechen, die sich nicht nur auf einzelne Trakte und Kommissuren beschränkt.

Die Verteilung der alternativen zNCAM-Exon-mRNA zeigte ein ähnliches Muster wie die der zNCAM-Expression. Der einzige Unterschied zu zNCAM besteht darin, dass das alternative Exon erst ab etwa 18 h exprimiert und das Expressionsmaximum im Alter von 42 hpf erreicht wird; zNCAM hingegen wird bereits ab etwa 12 hpf exprimiert und erreicht 30 hpf seine größte Intensität. Ansonsten gleichen sich beide zNCAM-Isoformen in der Verteilung ihrer mRNA, werden also co-exprimiert.

Die ISH-Sonden für beide Isoformen sind in verschiedenen Abschnitten des zNCAM-Gens lokalisiert. Während die Sonde gegen das alternative Exon spezifisch für sie ist, bindet die Sonde für zNCAM in einer Gen-Region, die für einen Teil der extrazellulären Domäne codiert und die beide Spleißvarianten gemeinsam haben. Folglich wird mit der zNCAM-Sonde das Gemisch aus beiden mRNA-Spleißvarianten nachgewiesen.

Wie bereits in den Kapiteln IV.1.4 und V.1 gezeigt wurde, inseriert das alternative Exon zwischen Exon 15 und 16 der zNCAM-mRNA und codiert so für einen Teil der cytoplasmatischen Domäne. Es bleibt aber unklar, ob es sich dabei um ein Fragment der NCAM180-Isoform handelt. Die etwas später einsetzende Expression lässt das zumindest vermuten. Persohn et al. (1989) haben gezeigt, dass NCAM180 in postsynaptischen Bereichen und Arealen mit Zellkontakten reifer

Neurone vorkommt. Möglicherweise codiert dieses Exon für einen Teil von zNCAM, der für einen alternativen Weg der Signaltransduktion benötigt wird. Dieser Weg könnte womöglich erst später während der Zebrafischneurogenese, z.B. bei der Reifung von Synapsen, benötigt werden. Demzufolge wird seine Expression auch dementsprechend verzögert aktiviert, was bei Auswertung der *in situ*-Hybridisierung sichtbar wird.

3. PSA-Expression im Rückenmark und den Motoneuronen nach MO-Injektion

Der Knockdown von zNCAM und die anschließende Auswertung der PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen führten zu einem unerwarteten Ergebnis. Ausgehend von der Kenntnis, dass NCAM das einzige Protein ist, das mit PSA glykosyliert ist (Finne et al., 1983), war es überraschend zu sehen, dass nach der Inhibition der zNCAM-Expression immer noch PSA im Rückenmark und auf den Motoraxonen zu finden war. An dieser Stelle war die Überlegung, ob der Knockdown von zNCAM vollständig verlaufen war. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Zebrafischembryonen nach der zNCAM 5'UTR-MO-Injektion mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper D3 gefärbt (Schlosshauer, 1989; Bastmeyer et al., 1990). Mit dessen Hilfe konnte gezeigt werden, dass die zNCAM-Expression bereits mit einer MO-Konzentration von 1,25 ng/ nl inhibiert werden kann. Weder im Rückenmark noch auf den Axonen der Motoneurone ließ sich NCAM nachweisen. Trotz fehlendem zNCAM wiesen alle injizierten Embryonen einen unauffälligen Phänotyp auf.

Von der Maus ist bekannt, dass NCAM-knockout-Mutanten nur einen milden Phänotyp zeigen. Hier sind lediglich die olfaktorischen Bulbi verkleinert und Subventrikulärzone sowie rostral migratory stream durch Akkumulation nicht ausgewanderter Neuronen vergrößert (Weinhold et al., 2005).

Diese Auffälligkeiten waren in den Zebrafischembryonen nicht zu sehen, was sich aber mit dem hier untersuchten Alter von 36 hpf erklären lässt. Zwar sind die olfaktorischen Bulbi in diesem Stadium schon angelegt, doch noch nicht soweit entwickelt, dass man Aussagen über ein verringertes Wachstum treffen könnte.

Ältere Stadien wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

Ebenfalls zeigte die posteriore Kommissur keine Veränderungen in ihrem Projektionsmuster. Bei ihr handelt es sich um eine der wenigen Strukturen im ZNS von Zebrafischen, deren Axone PSA-positiv sind. Wird diese PSA durch die Injektion von EndoN, einem PSA-spaltenden Enzym, entfernt oder deren Synthese durch die Inhibition der STX-Expression gehemmt (Marx et al., 2001; 2007), stoppten die Axone der posterioren Kommissur an der Mittellinie, kreuzten sie nicht und waren defaszikuliert. Auch solch eine Veränderung war nach dem Knockdown von zNCAM nicht zu beobachten. Folglich musste es für die immer noch vorhandene PSA-Expression und den normalen Phänotyp nach zNCAM-Knockdown eine andere Erklärung geben. Offensichtlich

gibt es im Zebrafisch ein Molekül, das den Verlust von zNCAM und damit auch den von PSA kompensieren kann, wodurch ein normaler Phänotyp gerettet werden kann.

Bei diesem Molekül handelt es sich um zPCAM, dem dritten Mitglied der NCAM-Familie im Zebrafisch (Mizuno et al., 2001); dessen Expressionsmuster und struktureller Bau dem von zNCAM ähnelt.

Dass zNCAM und zPCAM tatsächlich im ZNS und PNS co-exprimiert werden, konnte mit Hilfe des polyklonalen NCAM-Antikörpers 704 in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper D3 gezeigt werden. Nach der Inhibition der zNCAM-Expression durch den entsprechenden Morpholino, ließ sich mit dem D3-AK kein zNCAM mehr im Rückenmark und auf den Motoraxonen nachweisen. Die Gegenfärbung mit 704 hatte in diesen Strukturen aber eine immer noch vorhandene Reaktivität gezeigt, bei der es sich um die von zPCAM handelte. Dieser 704-AK wurde einst unter der Annahme von zNCAM als einzigem Akzeptor für PSA hergestellt, indem Homogenate eines Goldfischgehirns mit dem PSA-AK m735 über eine Säule aufgereinigt wurden. Das daraus gewonnene Eluat enthielt folglich alle mit PSA glykosylierten Proteine des Goldfischgehirns. Im weiteren Verlauf wurde mit diesem Eluat ein Kaninchen immunisiert. Der so gewonnene Antikörper 704 erkannte also NCAM und ungewollt auch PCAM (Marx, 2002).

Wurde die Expression von zPCAM mit dem entsprechenden 5'UTR-MO inhibiert, ließ sich mit dem D3-AK wieder NCAM im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone nachweisen. Die Gegenfärbung mit 704 zeigte dasselbe Muster wie die Färbung mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper. Allerdings war sie im Vergleich zur Färbung nach zNCAM-Knockdown stärker, was eine unterschiedliche starke Expression beider CAMs vermuten ließ. Auf Proteinebene konnte mit diesen beiden Antikörpern eine Co-Lokalisation von zNCAM und zPCAM im Nervensystem des Zebrafischs gezeigt werden. Das sich daraus ergebende Glykosylierungsmuster von zPCAM wurde wiederum mit dem PSA-Antikörper m735 untersucht.

Die PSA-Expression nach zPCAM-Knockdown zeigte ein ähnliches Muster wie nach der Inhibition von zNCAM: Wieder war PSA auf den Zellkörpern des Rückenmarks und den Axonen der Motoneurone zu finden. Die unbeeinflusste Expression von zNCAM hatte also das PSA-Muster gerettet und zPCAM als zweiten Akzeptor von PSA identifiziert.

Ein Unterschied im Knockdown beider CAMs bestand in einer augenscheinlich unterschiedlich starken Reduktion der PSA-Menge, was die Vermutung einer verschieden starken Expression beider CAMs unterstrich. Nach zNCAM-Knockdown war die PSA-Menge im Rückenmark und auf den Motoraxonen augenscheinlich stärker reduziert als nach dem Knockdown von zPCAM.

Ein weiterer Unterschied zum zNCAM-Knockdown bestand in einer deutlichen Reduktion der Überlebensraten nach Inhibition der zPCAM-Expression. Im Vergleich zur Kontroll-MO injizierten Gruppe sank hier die Zahl der überlebenden Embryonen signifikant. Allem Anschein nach hat zPCAM einen Einfluss auf die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen und scheint ein wichtiges Molekül während der Ontogenese zu sein. Da es bisher keine weiteren Kenntnisse zu PCAM gibt, lässt sich über dessen Wert für die Entwicklung nur spekulieren. Wie bereits diskutiert

wurde, könnte zPCAM wie auch zNCAM Wachstumsfaktoren wie BDNF (Vutskis et al., 2001), FGF3 und FGF8 binden oder als Co-Rezeptor fungieren.

Befunde aus der Maus zeigen einen Einfluss von FGF8 auf die Entwicklung des Mittel- und Hinterhirns im Bereich des Isthmus (Echevarria et al., 2005). Fehlt FGF8 während der Entwicklung der frühen Neuralplatte, führt das zu einem intensiven Zellsterben im Bereich des Mittel- und Hinterhirns und endet im Verlust des Mittelhirns und des Cerebellums. FGF8 wirkt in diesem Fall als Aktivator des MAP-Kinase-Wegs und beeinflusst so Zellteilung, -differenzierung und -tod.

Überlebende Zebrafischembryonen, wiesen nach zPCAM-Knockdown zwar keine solchen Defekte auf, doch könnte diese Tatsache damit erklärt werden, dass in dem Fall die Inhibition der zPCAM-Expression nicht vollständig verlaufen ist und noch eine Restaktivität die normale Entwicklung gerettet hat. Möglich wäre aber auch, dass der zPCAM-Knockdown tatsächlich vollständig war, aber das noch vorhandene zNCAM diesen Verlust kompensiert hat. Dass NCAM den FGF-Rezeptor binden und ihn aktivieren kann, wurde bereits gezeigt (Kiselyov et al., 2005).

Der einzelne Knockdown von zNCAM bzw. zPCAM konnte die PSA-Expression im Rückenmark und auf den Motoraxonen nicht wie erwartet verhindern. Vielmehr konnte das jeweils übrig bleibende Adhäsionsmolekül den Verlust des anderen kompensieren und so das PSA-Muster in diesen Strukturen retten.

Auf Grund dieser Befunde, war die Überlegung, dass ein Doppelknockdown beider CAMs die zwei potentiellen PSA-Akzeptoren im Zebrafischembryo entfernt. Folglich sollte nach der zeitgleichen Inhibition der zNCAM- und zPCAM-Expression keine oder zumindest nur noch wenig PSA nachweisbar sein. Die Ergebnisse dieses Experimentes fielen aber nicht wie erwartet aus.

Statt einer fehlenden PSA-Expression führte der Doppelknockdown zu einer dramatischen Erhöhung der Letalität der injizierten Embryonen. Lediglich ca. 20% aller Embryonen erreichten das Alter von 36 hpf. Alle anderen starben im Verlauf der Neurulation, die im Alter von etwa 12 hpf einsetzt.

Alle überlebenden Fische waren so stark fehlgebildet, dass sie außer zur Untersuchung des PSA-Musters zu keiner weiteren, intensiveren Analyse herangezogen werden konnten. So wiesen ca. 10% dieser Embryonen noch PSA im Rückenmark und auf den Motoraxonen auf. In diesen Fällen verlief der Knockdown wahrscheinlich nicht vollständig, so dass immer noch eine Restaktivität einzelner oder auch beider CAMs vorhanden war. Im Gegensatz dazu war in ca. 25% aller Fälle kein PSA mehr in diesen Strukturen nachweisbar. Hier war der Knockdown offensichtlich vollständig, führte aber zu schweren Fehlbildungen während der Entwicklung.

Diese Resultate führten zu dem Schluss, dass zNCAM und zPCAM zusammen für die Neuralentwicklung essentiell sind. Ohne diese beiden Zelladhäsionsmoleküle ist offenbar keine Zellmigration möglich oder diese in einem solchen Maß gestört, dass Neuronen nicht korrekt in ihr Zielgebiet auswandern können. Durch das Fehlen von zNCAM und zPCAM können in diesem

Fall wohl keine Moleküle der extrazellulären Matrix wie Heparan- und Chondroitinsulfatproteoglykane (HSPGs und CSPGs) (Cole et al., 1985, Cole und Glaser 1986) und Kollagen (Probstmeier et al., 1989) gebunden werden. Auf Grund dieser fehlenden Bindungen mit den für das Auswachsen notwendigen Substraten, z.B. Kollagen, und fehlenden Signalen, die womöglich von den HSPGs und CSPGs ausgehen, wird so die Zellmigration gestört.

Eine weitere wichtige Funktion wird offenbar ebenfalls durch das Fehlen beider CAMs verhindert. Dabei handelt es sich um die Ausbildung von Gewebeverbänden während der Neurogenese im ZNS, wie sie durch die Ausbildung homophiler Bindungen mit benachbarten Zellen entstehen. Denkbar ist hier, dass die frühen Neurone zwar entstehen, sich aber nicht zu einem zusammenhängenden Gewebe verbinden können, weil Bindungen mit anderen Neuronen nicht möglich sind. Auf diese Weise könnten womöglich in *trans* wirkende Neurotrophine nicht auf die Rezeptoren benachbarter Zellen übertragen werden, wodurch für die Differenzierung des Nervensystems notwendige Signale fehlen. Auch spielen hier eventuell die schon mehrfach erwähnte Bindung des FGF-Rezeptors (Kiselyov et al., 2005), die Bindung von BDNF (Vutskits et al., 2001) sowie die von FGF3 und FGF8 (Schibler und Malicki, 2007) eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems.

Ebenfalls möglich ist eine gestörte oder gar verhinderte Faszikulation von Neuriten, wie sie z.B. bei der Entstehung von Projektionen im Hippocampus der Maus beobachtet wurden (Rutishauser et al., 1988; Cremer et al., 1997; Bruses und Rutishauser, 2001). Auf diese Weise wird wahrscheinlich die Bildung von Axontrakten und Kommissuren gestört, wodurch falsche oder gar keine neuronalen Verschaltungen im Gehirn entstehen.

Womöglich führen diese Fehlbildungen während der Entwicklung letztendlich zum Absterben der Embryonen.

Durch Injektion von Morpholinos, die spezifisch die in der zNCAM- und zPCAM-mRNA vorkommenden CPEs maskieren, sollte das Modell eines Transports mit anschließender lokaler Translation der zNCAM und zPCAM-mRNA in den Axonen der Motoneurone untersucht werden. Die Hypothese dieses Modells propagierte, dass nach der Blockade des zNCAM-mRNA-Transports mittels des CPE-MOs keine PSA mehr auf den Motoraxonen nachzuweisen ist, da deren Translation in den Axonen inhibiert wurde. Die gleiche Vermutung galt für die Translation der zPCAM-mRNA, nachdem durch Klonierung und Sequenzierung ihrer 3'UTR ein CPE in dieser Region nachgewiesen werden konnte.

Nach der Injektion des zNCAM-CPE-MOs waren die Zellkörper des Rückenmarks, wie erwartet, PSA-positiv. Entgegen der Erwartung wies die PSA-Verteilung auf den Motoraxonen keine Veränderungen auf. Hier war noch immer PSA vorhanden und zeigte keine Veränderungen in ihrer Intensität. Auch unterschieden sich die Überlebensrate und der Phänotyp der Embryonen nicht von der Kontrollgruppe.

Für das unveränderte PSA-Muster sind zwei Erklärungen denkbar: Entweder es erfolgt trotz eines vorhandenen CPE und eines Poly(A)-Signals kein Transport und keine lokale Translation der zNCAM-mRNA in den Axonen der Motoneurone oder aber der Transport erfolgt doch und konnte durch den zNCAM-CPE-Morpholino inhibiert werden. In diesem Fall hätte womöglich das ungehindert exprimierte zPCAM den Verlust von zNCAM auf den Axonen kompensiert. Gegen diese Vermutung spricht aber die Tatsache, dass die PSA-Menge auf den Motoraxonen nach Blockade des zNCAM-mRNA-Transports augenscheinlich unverändert erschien.

Als interne Kontrolle für Veränderungen nach Manipulation der 3'UTR diene ein Morpholino, der direkt nach dem Stop-Codon an die zNCAM-mRNA band. Seine Injektion führte zu keinen offensichtlichen Veränderungen: Die Sterblichkeit der injizierten Embryonen war mit der der Kontrollgruppe vergleichbar und auch das PSA-Muster im Rückenmark und auf den Motoraxonen war unverändert.

Ein ähnliches Bild ergab sich nach der Injektion des zPCAM-CPE-MOs und damit der vermuteten Blockade des zPCAM-mRNA-Transports. Auch hier war das PSA-Muster im Rückenmark, wie erwartet, unverändert, doch auch auf den Axonen der Motoneurone war noch immer PSA zu finden.

Wie auch für die Situation nach Injektion des zNCAM-CPE-MOs gelten hier die gleichen möglichen Erklärungen, nachdem durch die Inhibition der zNCAM- bzw. zPCAM-Expression zPCAM als zweiter PSA-Akzeptor identifiziert werden konnte: Entweder es erfolgt kein mRNA-Transport oder der Verlust von zPCAM auf den Axonen konnte vom unverändert exprimierten zNCAM kompensiert werden und hat so die PSA-Expression gerettet.

Der einzige Unterschied zur zNCAM-CPE-MO-Injektion bestand darin, dass der zPCAM-CPE-MO die Letalität der injizierten Embryonen im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht hat. Nur noch etwa 42% der Embryonen überlebten bis ins Alter von 36 hpf, in der Kontrollgruppe waren es ca. 78%. Vermutlich hatte der zPCAM-CPE-Morpholino unspezifisch an andere mRNAs gebunden und so unbekannte Auswirkungen auf die Entwicklung, die zur Erhöhung der Sterblichkeit führten. Für diese Vermutung spricht, dass das zPCAM-CPE in einer äußerst AT-reichen Region der 3'UTR der mRNA liegt und somit theoretisch in dazu komplementären Sequenzabschnitten anderer mRNAs binden könnte. Während des Morpholinosignals wurden zahlreiche potentielle CPE-MO-Sequenzen auf mögliche Dimerbildungen und Haarnadelstrukturen hin untersucht. Die Sequenz des hier verwendeten Morpholinos erschien von allen Kandidaten am geeignetsten, da für sie die wenigsten Dimere und Haarnadeln vorhergesagt wurden. Trotzdem konnte dieser MO das zPCAM-CPE noch vollständig maskieren. Ein Vergleich dieser Sequenz mit der Ensembl-Datenbank führte aber nicht zur Vorhersage möglicher weiterer Bindungsstellen im Zebrafischgenom.

Nicht auszuschließen ist aber auch der Verdacht, dass der Transport und die Translation der zPCAM-mRNA erfolgreich inhibiert werden konnten und die Embryonen auf Grund der fehlenden zPCAM-Expression auf den Motoraxonen starben. Wie schon in der Diskussion des kompletten

Knockdowns ausgeführt, bindet zPCAM eventuell Faktoren, die für die Neurogenese essentiell sind.

Die einzelne Blockade des CPE-vermittelten mRNA-Transports beider CAMs führte zu keinen eindeutigen Ergebnissen, weil vermutlich das jeweils unmanipulierte Adhäsionsmolekül den Verlust des anderen kompensieren und damit das PSA-Muster auf den Axonen retten konnte. Um diesem Verdacht nachzugehen, sollte durch eine zeitgleiche Blockade beider CPEs die vermutete lokale Translation in den Axonen der Motoneurone inhibiert werden. Die Vermutung war, dass eine PSA-Expression auf den Motoraxonen verhindert werden kann, wenn beide CPEs gleichzeitig mittels des entsprechenden Morpholinogemischs blockiert werden.

Wurden beide MOs im Gemisch mit einer Konzentration von jeweils 1,25 ng/ nl injiziert, erhöhte das die Letalität der behandelten Embryonen im Vergleich zur Kontrolle deutlich. Lediglich 37 % aller Fische entwickelten sich bis ins Alter von 36 hpf, wohingegen ca. 73 % aller Kontrollembryonen überlebten. Von diesen überlebenden, mit dem CPE-MO-Gemisch behandelten Embryonen zeigten ca. 95 % ein unverändertes PSA-Muster. Hier war PSA im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone zu finden. Lediglich in den restlichen 5 % ließ sich kein PSA mehr auf den Axonen nachweisen.

Wie auch schon nach der Injektion des zPCAM-CPE-MOs vermutet, hatte dieser vermutlich unspezifisch an andere mRNAs gebunden und so Einfluss auf die Entwicklung der Embryonen genommen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die hier eingesetzten MO-Konzentrationen zu hoch waren und die Embryonen deshalb starben. Um das zu überprüfen wurde das CPE-MO-Gemisch zusätzlich in drei verschiedenen Konzentrationen injiziert.

Die Injektion von verschiedenen konzentrierten CPE-MO-Gemischen (MO-Konzentration jeweils 0,5 ng/ nl; 0,75 ng/ nl und 1,75 ng/ nl) hat keine Unterschiede im Vergleich zur Injektion des zuvor betrachteten CPE-MO-Gemischs gezeigt (Konzentration 1,25 ng/ nl). Unabhängig von der Einzelkonzentration eines jeweiligen CPE-MOs war die Letalität nach Injektion des MO-Gemischs im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Somit hat sich die Vermutung einer unspezifischen Bindung der CPE-MOs bestätigt. Die nochmals gesteigerte Sterberate der mit dem CPE-MO-Gemisch behandelten Embryonen im Vergleich zur einzelnen Injektion des zPCAM-CPE-MOs bleibt spekulativ.

Denkbar ist, dass sich zNCAM- und zPCAM-CPE-MOs zu verschiedenen langen Heterodimeren zusammengelagert haben, wodurch die unspezifische Bindung von unbekanntem mRNAs durch den einzelnen zPCAM-CPE-MO potenziert wurde. Diese Dimere könnten beispielsweise Haarnadelstrukturen gebildet haben, die die ungebundenen und damit freien Nukleotide in räumliche Nähe zueinander gebracht haben. Das könnte wiederum dazu geführt haben, dass ungewollt weitere unbekanntem mRNAs gebunden und manipuliert wurden, was zu dem beobachteten letalen Effekt der CPE-MOs geführt hat.

Dass die gesteigerte Letalität durch die tatsächliche Morpholinokonzentration verursacht wurde, kann an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Die niedrigste injizierte

Gesamtmorpholinokonzentration der CPE-Gemische betrug 1 ng/ nl. In allen vorhergehend beschriebenen Experimenten wurde mindestens eine Konzentration von 1,25 ng/ nl appliziert, was mit Ausnahme der bereits diskutierten zPCAM-Experimente nicht zu einer Steigerung der Sterberate geführt hatte.

4. PSA-Expression im otischen Vesikel nach MO-Injektion

Die Analyse der Expressionsmuster von zNCAM und zPCAM hat eine starke Expression von zPCAM im otischen Vesikel (oV) der Zebrafische gezeigt. Nachdem durch die vorhergehend beschriebenen und diskutierten Experimente zPCAM als zweiter Akzeptor von PSA identifiziert werden konnte, sollten die Auswirkungen der MO-Injektionen auf die PSA-Expression im otischen Vesikel untersucht werden.

Wie erwartet, zeigten sich nach der Injektion der zNCAM-MOs keine Veränderungen im PSA-Muster. Weder der 5', noch der 3'UTR-MO sowie der CPE-MO führten zu einer Reduktion der PSA-Menge. Erst nach der Injektion der zPCAM-MOs waren Veränderungen sichtbar. Erwartungsgemäß war die PSA-Menge nach Inhibition der zPCAM-Expression deutlich vermindert oder gar vollständig reduziert. Lediglich ca. 17 % aller Embryonen wiesen eine unveränderte PSA-Menge auf. In den restlichen 83 % war die Menge deutlich reduziert bzw. PSA komplett verschwunden. Die nur unvollständige Inhibition der PSA-Expression im otischen Vesikel lässt sich durch zwei verschiedene Theorien erklären. Entweder verlief der zPCAM-Knockdown nicht vollständig und es wurde trotz der MO-Injektion noch zPCAM im oV translatiert oder aber der Morpholino wurde durch die kapselartige Struktur des Vesikels daran gehindert frei zu diffundieren und konnte nicht ohne weiteres in ihn eindringen.

Über eine Rolle von zPCAM als Co-Rezeptor für FGF3 und FGF8 (Schibler und Malicki, 2007) und Bindungspartner für den FGF-Rezeptor (Kiselyov et al., 2005) wurde bereits hinlänglich spekuliert. Das an zPCAM gebundene PSA moduliert in diesen Fall womöglich auf Grund seiner sterischen Eigenschaften die Dimerisierung von zPCAM durch Ausbildung homophiler Bindungen in *cis* und verhindert so eine Bindung des FGF-Rezeptors und so eventuell dessen Aktivierung.

Dieses Experiment hatte gezeigt, dass PSA im otischen Vesikel allein an zPCAM gebunden vorliegt und so nochmals bestätigt, dass zPCAM neben zNCAM ein zweiter Akzeptor von PSA im ist.

Für die Auswertung der PSA-Expression im otischen Vesikel nach dem Doppelknockdown von zNCAM und zPCAM standen lediglich die wenigen überlebenden Embryonen zur Verfügung, die das gewünschte Alter von 36 hpf erreicht hatten. Die Ergebnisse dieses Experiments waren mit denen des zPCAM-Knockdowns vergleichbar und lassen sich mit dessen Auswirkungen erklären. Von den auswertbaren Embryonen nach Doppelknockdown war in lediglich 15 % der Fälle die PSA-Menge im otischen Vesikel normal. In allen anderen Fällen war PSA komplett weg oder zumindest reduziert.

Die Injektion des zNCAM-CPE-Morpholinos führte zu keinen Veränderungen der PSA-Menge im otischen Vesikel. Nach der Blockade des vermuteten mRNA-Transports erschien das Muster normal und mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar.

Nachdem der zPCAM-CPE-MO das PSA-Muster auf den Motoraxonen unbeeinflusst gelassen hat, war zu erwarten, dass auch im otischen Vesikel keine Veränderungen in der PSA-Expression auftreten. Überraschenderweise kam es aber doch zur Reduktion der nachweisbaren PSA-Menge. In 34% der injizierten Embryonen war die Menge unverändert, im Rest der Gruppe aber reduziert. Hierbei handelte es sich aber offenbar um ein Artefakt, denn nach der Applikation des CPE-MO-Gemischs unterschied sich der Anteil der Embryonen in denen die PSA-Menge normal war nicht von dem der Kontrollgruppe.

Die Blockade der CPEs von zNCAM und zPCAM mit Hilfe ihrer jeweiligen Morpholinos konnte also wiederholt keinen Effekt auf den vermuteten Transport der jeweiligen CAM-mRNAs auslösen. Dadurch wurde die Vermutung einer CPE-unabhängigen Translationskontrolle weiter verstärkt.

5. Auswirkungen der MO-Injektionen auf die Motoraxone

Während der Auswertung der PSA-Expression auf den Axonen der Motoneurone nach Morpholino-Injektion fielen vermehrt Axone auf, deren Projektionsmuster augenscheinlich verändert war. Motoraxone aus Embryonen der Kontrollgruppe wuchsen in der Regel in einem leichten Bogen nach caudal aus. Im Gegensatz dazu wiesen Embryonen, denen die zNCAM- bzw. zPCAM-MOs injiziert wurden, teilweise Knicke oder zusätzliche Seitenäste auf.

Die statistische Auswertung dieser Experimente ergab, dass die Injektion sämtlicher zNCAM-Morpholinos zu keiner signifikanten Erhöhung der Fehlerrate der Motoraxone führte. Wie bereits gezeigt wurde, hatten der zNCAM 3'UTR- und der zNCAM-CPE-MO keinen Einfluss auf die PSA-Expression auf den Axonen der Motoneurone. Lediglich nach Inhibition der zNCAM-Expression war die PSA-Menge deutlich reduziert, aber trotzdem nicht vollständig verschwunden.

Ein entscheidender Beitrag von NCAM zur Neurogenese ist sein Anteil an der Faszikulierung auswachsender Axonen. Durch Ausbildung homophiler NCAM-Bindungen, die durch die sterischen Eigenschaften der PSA moduliert werden, können Axone in zusammenhängenden Faszikeln auswachsen und bilden auf diese Weise unterschiedlich dicke Bündel. Da nach dem Knockdown von zNCAM keine Defaszikulierung der Motoraxone festzustellen war und auch sonst keine Auffälligkeiten auftraten, hat offenbar zPCAM in Kombination mit PSA den Verlust von zNCAM kompensiert und auf diese Weise für eine normale, fehlerfreie Faszikulierung der Axone gesorgt.

Es wurde bereits darüber spekuliert, dass zPCAM neben der Faszikulierung von Axonen womöglich noch andere Funktionen hat. Mit solchen zusätzlichen Funktionen, der Bindung weiterer Faktoren oder deren Rezeptoren, ließe sich die markante Erhöhung der Fehlerrate der

Motoneurone nach dem Knockdown von zPCAM erklären. Lediglich 28 % der zPCAM-negativen Embryonen wiesen Motoraxone ohne Fehler auf, wohingegen 71 % der Kontrollembryonen fehlerfreie Axone hatten.

Anscheinend ist zPCAM in der Lage, Faktoren aus der Umgebung der Motoraxone zu erkennen, zu binden und für ein normales, fehlerfreies Wachstum der Axone zu sorgen. Dabei könnte es sich einerseits um Moleküle der extrazellulären Matrix handeln, wie z.B. HSPGs, CSPGs, Kollagen oder Fibronectin, mit denen auswachsende Axone am Untergrund verankert werden. Oder aber zPCAM kann, wie bereits diskutiert, Lenkungsmoleküle und Wachstumsfaktoren binden, die als Signale während der Neurogenese wirken. Nicht auszuschließen ist ebenso die Vermutung, dass zPCAM als Co-Faktor während des Auswachsens von Neuronen dient, indem es eventuell Rezeptoren, z.B. FGFR, dimerisiert und so erst deren Signaltransduktion ermöglicht. Denkbar ist auch, dass zPCAM mit seiner intrazellulären Domäne Elemente des Cytoskeletts und der Zellkontakte, z.B. Mikrotubuli, Aktinfilamente, Paxilin, Spektrin und Actinin binden kann und damit an deren Umbau- und Reorganisationsprozessen, wie sie beim Auswachsen von Neuronen auftreten, beteiligt ist.

Die Auswertung der zPCAM-CPE-MO-Injektion zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Fehlerrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein ähnliches Resultat wurde durch die Injektion des CPE-MO-Gemischs erreicht. Auch in diesem Fall hatte die Blockade des vermuteten CPE-abhängigen mRNA-Transports keine Auswirkungen auf das Auswachsen der Motoneurone.

Die Rolle der CPEs in der mRNA von zNCAM und zPCAM bleibt somit weiterhin unklar.

6. Betrachtung evolutionärer Aspekte von zNCAM und zPCAM

Die Auswertung und Diskussion der vorhergehend beschriebenen Experimente hatte den Verdacht nahe gelegt, dass es sich bei zNCAM und zPCAM um evolutionär und funktionell nahe verwandte Zelladhäsionsmoleküle im Zebrafisch handelt. Die ähnliche Expression beider Moleküle im Gehirn und Rückenmark, wie sie mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen wurde, sowie die Rolle ihrer Glykosylierung mit PSA, wie sie durch Injektion der verschiedenen Morpholinos gezeigt wurde, lassen darauf schließen.

Vergleicht man die Sequenzen beider CAMs auf mRNA- und Proteinebene (vgl. Kapitel VII.6), zeigt sich, dass es sich bei beiden um paraloge Gene handelt. Ihre mRNA- und Proteinsequenzen sind zu ca. 65 % identisch. Im Verlauf der Evolution sind beide Gene also offensichtlich durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden und haben sich nebeneinander weiter entwickelt. Da aber in höheren Vertebraten kein zPCAM vorkommt, kann man daraus schließen, dass sich dieses Adhäsionsmolekül im Lauf der Evolution nicht durchgesetzt hat und wieder verloren gegangen ist. Lediglich im Kugelfisch *Tetraodon nigroviridis*, einem evolutionär weniger weit entwickelten Knochenfisch, findet sich noch ein zPCAM-ähnliches Gen, das aber bisher nicht näher beschrieben wurde.

Während der Evolution des Zebrafischs haben zahlreiche Genduplikation stattgefunden, wie die Sequenzierung des Genoms zeigt. So finden sich neben zNCAM und zPCAM noch weitere duplizierte Gene. Ein Beispiel hierfür ist das Zelladhäsionsmolekül L1, ein weiteres Mitglied der Ig-Superfamilie. Seine extrazelluläre Domäne besteht, im Gegensatz zur NCAM-Familie, aus sechs Ig- und vier Fibronectin III-Domänen und beeinflusst ebenfalls Axonwachstum und synaptische Plastizität (Haspel und Grumet, 2003). Von ihm kommen im Zebrafisch ebenfalls zwei Paraloge, L1.1 und L1.2, vor, die mit dem Maus L1-Gen nahe verwandt sind (Tongiorgi et al., 1995). Beide werden erst von postmitotischen Neuronen exprimiert und modulieren das Auswachsen ihrer Axone. Ein Vergleich der Proteinsequenzen beider Gene hat hier aber lediglich eine Sequenzhomologie von 47,2 % ergeben. L1.1 und L1.2 haben sich im Zebrafisch offensichtlich stärker auseinander entwickelt als zNCAM und zPCAM.

7. Quantifizierung der PSA-Menge mittels Endo:GFP-Fusionsprotein

Bei der Auswertung der PSA-Expression nach MO-Injektion fiel auf, dass die Blockade beider CPEs zu keinen sichtbaren Effekten und Veränderungen führte. Erst nach dem einzelnen Knockdown von zNCAM bzw. zPCAM kam es zu Veränderungen in der PSA-Expression im Rückenmark und auf den Axonen der Motoneurone. Zwar war immer noch PSA nachweisbar, doch war deren Menge unterschiedlich stark reduziert. Offensichtlich konnte das jeweils ungehindert exprimierte Adhäsionsmolekül den Verlust des anderen kompensieren und das Glykosylierungsmuster im Rückenmark und auf den Motoraxonen retten. So führte die Inhibition der zNCAM-Expression zu einer stärkeren PSA-Reduktion als der Knockdown von zPCAM. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass sich beide CAMs in ihrer tatsächlichen Proteinmenge im Rückenmark und auf den Motoraxonen unterscheiden.

Um diesem Verdacht nachzugehen, sollte die PSA-Expression direkt und in ihrem tatsächlichen *in vivo*-Status dargestellt werden. Hierfür kam ein Endo:GFP-Fusionsprotein zum Einsatz. Dabei handelte es sich um eine mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) markierte Endosialidase, die PSA zwar noch binden aber nicht mehr spalten kann (Jokilampi et al., 2004). Durch dieses Protein stand eine Affinitätssonde zur Verfügung, die die tatsächlich vorhandene PSA-Menge zeigen konnte, ohne das Signal wie in einer zweistufigen Immunfärbung unkontrolliert zu potenzieren.

Die so ermöglichte PSA-Quantifizierung im Rückenmark durch Messung der Fluoreszenzintensitäten ergab, dass ein Knockdown von zNCAM das PSA-Signal im Mittel um ca. 58 % verringerte und die Inhibition der zPCAM-Expression um ca. 30 %. Die Differenz (12 %) zu 100 % lässt sich dadurch erklären, dass wahrscheinlich nicht in allen Embryonen die CAM-Inhibition erfolgreich verlief.

Unter der Annahme, dass im Zebrafisch zNCAM und zPCAM vollständig mit PSA glykosyliert sind, bedeutet das, dass die tatsächlich vorhandene Proteinmenge von zNCAM im Rückenmark

etwa doppelt so groß ist wie die von zPCAM und auf eine wichtige Funktion von zNCAM im Nervensystem schließen lässt.

Es ist aber nicht auszuschließen, dass neben glykosyliertem zNCAM und zPCAM auch PSA-freie Formen beider CAMs auf den Neuronen vorkommen. Somit wäre eine Abschätzung der Proteinmenge auf Basis des Glykosylierungsmusters unmöglich.

Dieser große Unterschied in der Menge beider CAMs wurde auf diese Weise zum ersten Mal sichtbar gemacht. Der Nachweis der mRNA beider Adhäsionsmoleküle durch *in situ*-Hybridisierung konnte diese Besonderheit nicht zeigen, denn die Visualisierung Digoxigenin-markierter Uracilreste der ISH-Sonde erfolgte ebenfalls durch eine zweistufige Immunreaktion. Prinzipiell kann jeder Uracilrest von einem spezifischen Digoxigenin-Antikörper gebunden werden und wird durch eine Reaktion mit alkalischer Phosphatase sichtbar gemacht. Auf diese Weise erfolgt eine nicht kontrollierbare Potenzierung des Signals, was eine Quantifizierung unmöglich macht.

Trotz der durch die doppelte Proteinmenge implizierten enormen Bedeutung von zNCAM ließ sich diese durch die Inhibition der Expression nicht nachweisen, da sie zu keinen offensichtlichen Veränderungen in den so behandelten Embryonen führte. Das unverändert exprimierte zPCAM konnte den Verlust von zNCAM kompensieren und die augenscheinlich normale Entwicklung der Embryonen retten.

Erst wenn beide CAMs zur gleichen Zeit inhibiert wurden, war deren essentieller Beitrag für die Entwicklung zu erkennen und es kam zu den bereits beschriebenen Effekten.

- Durch die vorhergehend beschriebenen Experimente wurde zPCAM, neben zNCAM, als zweiter Akzeptor von PSA identifiziert.
- Die Funktion der CPEs und damit ein möglicher Transport der zNCAM- und zPCAM-mRNA in verschiedene Kompartimente der Motoneurone bleibt weiter unklar.

8. Die mögliche Rolle der CPEBs im Zebrafisch

Sofern ein CPE/ CPEB-vermittelter Mechanismus am Transport der zNCAM- bzw. zPCAM-mRNA beteiligt ist, müssten beide CAMs mit mindestens einem der vier im Zebrafisch vorkommenden CPEBs co-exprimiert werden (Huppert, 2006). Doch das ist nicht der Fall: CPEB1 wird nur maternal exprimiert, CPEB3 maternal und erst in Stadien > 20hpf in Somiten und Myosepten. Im Gegensatz dazu kommt CPEB4 zwar während der ganzen Embryonalentwicklung vor, konzentriert sich aber ab 20 hpf im Gehirn sowie den Rohan-Beard-Neuronen im Rückenmark. Das einzige CPEB, dessen Expressionsmuster sich, wenn auch nur ansatzweise, mit dem von zNCAM und zPCAM deckt, ist CPEB2. Im Alter von 15 hpf wird es, mit Ausnahme des otischen Vesikels, nur im Rückenmark von den primären Motoneuronen exprimiert (Abb. 61) (Huppert,

2006). Diese Phase der Entwicklung entspricht einem Stadium, in dem die primären Motoneurone kurz davor stehen auszuwandern und axonale Fortsätze auszubilden (Myers et al., 1986; Eisen, 1991). Es ist deshalb vorstellbar, dass eine Expression von zNCAM und zPCAM in diesem Alter doch vom CPE/ CPEB-Komplex kontrolliert wird, die Faszikulation der Motoneurone bewirkt und so das Auswachsen der Axone moduliert.

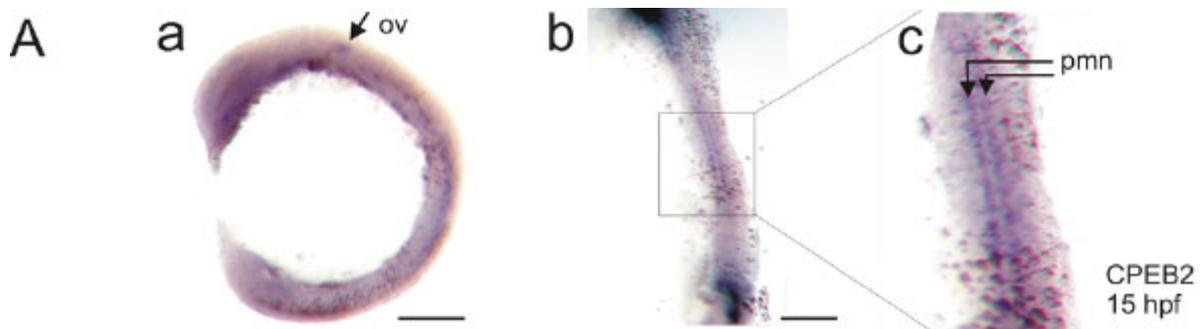


Abb. 61: CPEB2-Expression im Alter von 15 hpf (Huppert, 2006)

Die CPEB2-Expression beschränkt sich im Alter von 15 hpf lediglich auf den otischen Vesikel und primäre Motoneurone. a – Lateralansicht. b und c Dorsalansicht; ov – otischer Vesikel, pmn – primäre Motoneurone; Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

In älteren Stadien beschränkt sich die CPEB2-Expression hauptsächlich auf Regionen des Vorder-, Mittel- und Hinterhirns. Im Rückenmark lässt sich hingegen keine Expression mehr nachweisen (Abb. 62).

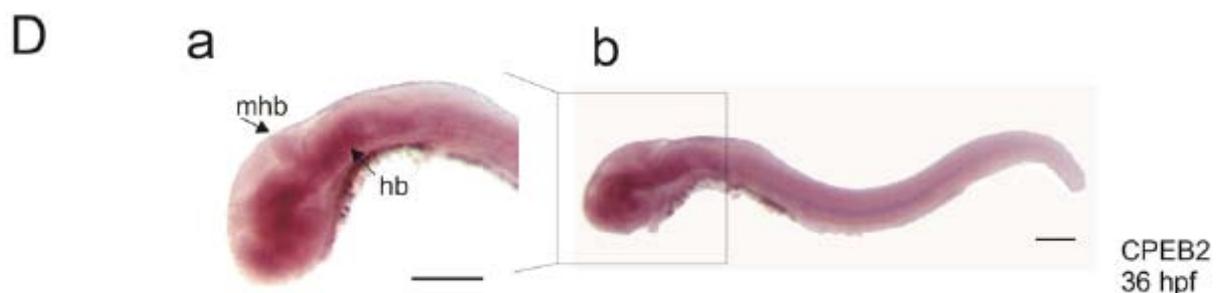


Abb. 62: CPEB2-Expression im Alter von 36 hpf (Huppert, 2006)

Die CPEB2-Expression erfolgt im Alter von 36 hpf lediglich in Teilen des Gehirns. mhb – Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze, hb-Hinterhirn; Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

Dieser hier diskutierten Expression der vier verschiedenen CPEBs im Zebrafisch steht das Expressionsmuster der Glykosyltransferase STX entgegen. Es ähnelt bis ins Alter von 40 hpf dem von zNCAM und zPCAM: STX wird im Gehirn und dem Rückenmark mit floor plate exprimiert (Marx et al., 2007). Trotzdem kann ein Transport der STX-mRNA in die Axone der Motoneurone durch Blockade des in der STX 3'UTR enthaltenen CPEs verhindert werden. Daraufhin lässt sich kein PSA mehr auf den Motoraxonen nachweisen (Marx, unpublizierte Daten).

Möglicherweise ist für diese Kontrolle der STX-Translation die in frühen Stadien der Neurogenese nachweisbare CPEB2-Expression in den primären Motoneuronen verantwortlich. Wenn CPEB2 in dieser Phase der Entwicklung vorkommt, in der die Motoneurone damit beginnen auszuwachsen, dann reicht die von der STX synthetisierte PSA offensichtlich aus um das Auswachsen der Motoraxone zu modulieren.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass PSA im Zebrafisch sowohl an zNCAM als auch an zPCAM gebunden vorliegt.

Es bleibt aber unklar, wie die Expression beider CAMs in den Axonen der Motoneurone reguliert wird:

- Werden beide als native Proteine in die Axone transportiert und erst dort prozessiert und mit PSA glykosyliert?
- Oder wird die mRNA beider Zelladhäsionsmoleküle doch in die Axone transportiert, erst dort translatiert und prozessiert?

Um zusätzliche Erkenntnisse über die Verteilung und Funktion von zPCAM zu gewinnen, sind weitere verschiedene Experimente vorstellbar. Denkbar wäre z.B. die Generierung eines Antikörpers gegen zPCAM, mit dessen Hilfe weitere Untersuchungen von zPCAM erfolgen könnten. Es wäre möglich das Vorkommen des Proteins zusätzlich zum Verteilungsmuster der mRNA im Zebrafisch zu analysieren und mit dem von zNCAM zu vergleichen. Zudem würde so der in dieser Arbeit nur indirekt erfolgte Nachweis von zPCAM über die PSA-Expression nach zNCAM-Knockdown verifiziert.

Um noch weitere Erkenntnisse zur Funktion von zPCAM, aber auch zNCAM zu gewinnen, wäre es denkbar Knockout-Mutanten beider Zelladhäsionsmoleküle zu erzeugen. Sofern Einzelknockouts keine sichtbaren Veränderungen zeigen, weil das jeweils noch vorhandene Molekül den Verlust des anderen kompensieren kann, könnte man durch Kreuzung beider Knockoutstämme Doppelmutanten erzeugen. Die in dieser Arbeit beobachtete Letalität des Doppelknockouts nach Inhibition der Proteinexpression würde so wahrscheinlich nochmals bestätigt, könnte aber durch verschiedene Rettungsexperimente, z.B. durch die Injektion von zNCAM- bzw. zPCAM-mRNAs gerettet werden.

Um nun die Funktion der CPEs in den 3'UTRs von zNCAM und zPCAM weiter aufzuklären, wäre es möglich transgene Zebrafischlinien mit GFP-markiertem zNCAM oder zPCAM herzustellen. Diese könnten nun nochmals auf das propagierte Modell des mRNA-Transports aus dem Soma in die Axone der Motoneurone hin untersucht werden. Vorstellbar wäre in diesem Fall abermals ein morpholinbasierender Versuchsansatz, der den vermuteten CPE-abhängigen mRNA-Transport unterbindet. Auf diese Weise könnte direkt verfolgt werden, ob die jeweilige mRNA in die Axone transportiert und dort translatiert wird.

Ein Experiment mit einem methodisch ähnlichen Ansatz wäre die Generierung einer transgenen STX-Linie. GFP-markierte STX könnte dem gleichen morpholinbasierendem Versuch unterzogen werden wie zNCAM und zPCAM und ihr mRNA-Transport so direkt sichtbar gemacht werden. Es wäre z.B. nach Etablierung einer solchen Zebrafischlinie möglich die STX-Expression durch Zeitrafferaufnahmen *in vivo* oder auch *in vitro* durch primäre Zellkulturen zu verfolgen und nachzuweisen.

Ein solcher Versuch wäre sehr Erfolg versprechend, da bereits gezeigt werden konnte, dass die STX-mRNA unter der Kontrolle ihres in der 3'UTR enthaltenen CPE transportiert und ihre Translation im Axon der Motoneurone reguliert wird.

VI. Literaturverzeichnis

1. Alenius, M., Bohm, S. (2003) "Differential function of RNCAM isoforms in precise target selection of olfactory sensory neurons" *Development* 130, 917-927
2. Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., Fukuda, M. (1997) "Human STX Polysialyltransferase Forms the Embryonic Form of the Neural Cell Adhesion Molecule. TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION, NEURITE OUTGROWTH, AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION IN COMPARISON WITH ANOTHER POLYSIALYLTRANSFERASE, PST" *J. Biol. Chem.* 272, 7182-7190
3. Angata, K., Fukuda, M. (2003) "Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule" *Biochimie* 85, 195-206
4. Atkins, C. M., Nozaki, N., Shigeri, Y., Soderling, T. R. (2004) "Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein-Dependent Protein Synthesis Is Regulated by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II" *J. Neurosci.* 24, 5193-5201
5. Bastmeyer, M., Schlosshauer, B., Stuermer, C. A. (1990) "The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by the monoclonal antibody D3" *Development* 108, 299-311
6. Becker, C. G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H., Schachner, M. (1996) "The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation" *J. Neurosci. Res.* 45, 143-152
7. Boisseau, S., Nedelec, J., Poirier, V., Rougon, G., Simonneau, M. (1991) "Analysis of high PSA N-CAM expression during mammalian spinal cord and peripheral nervous system development" *Development* 112, 69-82
8. Brittis, P. A.; Lu, Q.; Flanagan, J. G. (2002) "Axonal Protein Synthesis Provides a Mechanism for Localized Regulation at an Intermediate Target" *Cell* 110, 223-235
9. Bruses, J. L., Rutishauser, U. (2001) "Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development" *Biochimie* 83, 635-643
10. Cao, Q., Huang, Y. S., Kan, M. C., Richter, J. D. (2005) "Amyloid Precursor Proteins Anchor CPEB to Membranes and Promote Polyadenylation-Induced Translation" *Mol. Cell. Biol.* 25, 10930-10939
11. Cao, Q., Richter, J. D. (2002) "Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation" *EMBO J.* 21, 3852-3862
12. Cole G. J., Schubert, D., Glaser, L. (1985) Cell-substratum adhesion in chick neural retina depends upon protein-heparan sulfate interactions" *J. Cell Biol.* 100, 1192-1199

13. Cole, G. J., Glaser, L. (1986) "A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion" J. Cell Biol. 102, 403-412
14. Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., Represa, A. (1997) "NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus" Mol. Cell. Neurosci. 8, 323-335
15. Cremer, H., Chazal, G., Lledo, P. M., Rougon, G., Montaron, M. F., Mayo, W., Le Moal, M., Abrous, D. N. (2000) "PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity" Int. J. Dev. Neurosci. 18, 213-220
16. Dickson, K. S., Thompson, S. R., Gray, N. K., Wickens, M. (2001) "Poly(A) Polymerase and the Regulation of Cytoplasmic Polyadenylation" J. Biol. Chem. 276, 41810-41816
17. Dietzsch, M. (2004) „Verteilung und Funktion von Proteoglykanen im Zebrafisch, *Danio rerio*“ Diplomarbeit
18. Dulbecco, R., Vogt, M. (1954) "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses." J. Exp. Med. 99, 167-82
19. Echevarria, D., Belo, J. A., Martinez, S. (2005) "Modulation of Fgf8 activity during vertebrate brain development" Brain Res. Brain Res. Rev. 49, 150-157
20. Edelman, G. M. (1986) "Cell Adhesion Molecules in Neural Histogenesis" Annu. Rev. Physiol. 48, 417-430
21. Edelman, G. M., (1986) "Cell Adhesion Molecules in the Regulation of Animal Form and Tissue Pattern" Annu. Rev. Cell Biol. 2, 81-116
22. Eisen, J. S. (1991) "Motoneuronal development in the embryonic zebrafish" Development Suppl 2, 141-147
23. Eisen, J. S. (1991) "Determination of primary motoneuron identity in developing zebrafish embryos" Science 252, 569-572
24. Finne, J., Finne, U., Deagostini-Bazin, H., Goridis, C. (1983) "Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule" Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 482-487
25. Gascon, E., Vutskits, L., Jenny, B., Durbec, P., Kiss, J. Z. (2007) "PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival" Development 134, 1181-1190
26. Haffter, P. et al. (1996) "The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*." Development 123, 1-36
27. Hake, L. E., Mendez, R., Richter, J. D. (1998) "Specificity of RNA Binding by CPEB: Requirement for RNA Recognition Motifs and a Novel Zinc Finger" Mol. Cell. Biol. 18, 685-693

28. Hamlin, J. A., Fang, H., Schwob, J. E. (2004) "Differential expression of the mammalian homologue of fasciclin II during olfactory development in vivo and in vitro" *J. Comp. Neurol.* 474, 438-452
29. Haspel, J., Grumet, M. (2003) "The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes." *Front. Biosci.* 8, 1210-1225
30. Hildebrandt, H., Becker, C., Mürau, M., Gerardy-Schahn, R., Rahmann, H. (1998) "Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development" *J. Neurochem.* 71, 2339-2348
31. Hu, J. Y., Meng, X., Schacher, S. (2003) "Redistribution of Syntaxin mRNA in Neuronal Cell Bodies Regulates Protein Expression and Transport during Synapse Formation and Long-Term Synaptic Plasticity" *J. Neurosci.* 23, 1804-1815
32. Huang, Y. S., Carson, J. H., Barbarese, E., Richter, J. D. (2003) "Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB" *Genes Dev.* 17, 638-653
33. Huppert, J. (2006) „Klonierung und Expressionsmuster der RNA-Bindeproteine aus der Familie der CPEB-Proteine im Zebrafisch“ Diplomarbeit
34. Jokilammi, A., Ollikka, P., Korja, M., Jakobsson, E., Loimaranta, V., Haataja, S., Hirvonen, H., Finne, J. (2004) "Construction of antibody mimics from a noncatalytic enzyme-detection of polysialic acid" *J. Immunol. Methods* 295, 149-160
35. Jung, M.Y., Lorenz, L., Richter, J. D. (2006) "Translational Control by Neuroguidin, a Eukaryotic Initiation Factor 4E and CPEB Binding Protein" *Mol. Cell. Biol.* 26, 4277-4287
36. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995) "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev. Dyn.* 203, 253-310
37. Kiselyov, V. V., Soroka, V., Berezin, V., Bock, E. (2005) "Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR" *J. Neurochem.* 94, 1169-1179
38. Lang, D. M., Warren J. T. Jr, Klisa C., Stuermer C. A. (2001) „Topographic restriction of TAG-1 expression in the developing retinotectal pathway and target dependent reexpression during axon regeneration." *Mol. Cell. Neurosci.* 17, 398-414
39. Lledo, P. M., Lazarini, F. (2007) "Neuronal replacement in microcircuits of the adult olfactory system" *C. R. Biol.* 330, 510-520
40. Maness, P. F., Schachner, M. (2007) "Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration" *Nat. Neurosci.* 10, 19-26
41. Marx, M., Rutishauser, U., Bastmeyer, M. (2001) "Dual function of polysialic acid during zebrafish central nervous system development." *Development* 128, 4949-58.

42. Marx, M., Rivera-Milla, E., Stummeyer, K., Gerardy-Schahn, R., Bastmeyer, M. (2007) "Divergent evolution of the vertebrate polysialyltransferase Stx and Pst genes revealed by fish-to-mammal comparison" *Dev. Biol.* 306, 560-571
43. Marx, M. (2002) „Synthese, Expressionsmuster und Funktion von Polysialinsäure (PSA) während der Entwicklung des Nervensystems im Zebrafischembryo" Dissertation
44. Mendez, R.; Richter, J. D. (2001) "Translational Control by CPE: A Means to the End" *Nature* 2, 521-529
45. Mizuno, T.; Kawasaki, M.; Nakahira, M.; Kagamiyama, H.; Kikuchi, Y.; Okamoto, H.; Mori, K.; Yoshihara, Y. (2001) "Molecular Diversity in Zebrafish NCAM Family: Three Members with Different VASE Usage and Distinct Localization" *Mol. Cell. Neurosci.* 18, 119-130
46. Mohr, E.; Richter, D. (2000) "Axonal mRNAs: functional significance in vertebrates and invertebrates" *J. Neurocytol.* 29, 783-791
47. Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D., Stefan Kindler (2001) "Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA" *J. Neurochem.* 76, 155-165
48. Murray, B. A., Owens, G. C., Prediger, E. A., Crossin, K. L., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. (1986) "Cell surface modulation of the neural cell adhesion molecule resulting from alternative mRNA splicing in a tissue-specific developmental sequence" *J. Cell Biol.* 103, 1431-1439
49. Myers, P. Z., Eisen, J. S., Westerfield, M. (1986) "Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish" *J. Neurosci.* 6, 2278-2289
50. Persohn E., Pollerberg, G. E., Schachner, M. (1989) "Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes" *J. Comp. Neurol.* 288, 92-100
51. Phillips, B. T., Storch, E. M., Lekven, A. C., Riley, B. B. (2004) "A direct role for Fgf but not Wnt in otic placode induction" *Development* 131, 923-931
52. Probstmeier R., Kühn K., Schachner M. (1989) "Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix" *J. Neurochem.* 53, 1794-801
53. Richter, J. D. (2001) "Think globally, translate locally: what mitotic spindles and neuronal synapses have in common" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7069-7071
54. Richter, J. D. (2007) "CPEB: a life in translation" *Trends Biochem. Sci.* 32, 279-285
55. Rutishauser U., Acheson, A., Hall, A. K., Mann, D. M., Sunshine, J. (1988) "The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions" *Science* 240, 53-57

-
56. Rutishauser, U. (1996) "Polysialic acid and the regulation of cell interactions" *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 679-684
 57. Rutishauser, U., (1998) "Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity" *J. Cell. Biochem.* 70, 304-312
 58. Schibler, A., Malicki, J. (2007) "A screen for genetic defects of the zebrafish ear" *Mech. Dev.* 124, 592-604
 59. Schlosshauer, B. (1989) "Purification of neuronal cell surface proteins and generation of epitope-specific monoclonal antibodies against cell adhesion molecules" *J. Neurochem.* 52, 82-92
 60. Stebbins-Boaz, B.; Cao, Q.; de Moor, C. H.; Mendez, R.; Richter, J. D. "Maskin Is a CPEB-Associated Factor that Transiently Interacts with eIF-4E" *Molecular Cell* 4, 1017-1027
 61. Summerton, J., Weller, D. (1997) "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties" *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7, 187-195
 62. Tang, J., Landmesser, L., Rutishauser, U. (1992) "Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons" *Neuron.* 8, 1031-1044
 63. Tang, J., Rutishauser, U., Landmesser, L. (1994) "Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region" *Neuron* 13, 405-414
 64. Tongiorgi, E., Bernhardt, R. R., Schachner, M. (1995) "Zebrafish neurons express two L1-related molecules during early axonogenesis" *J. Neurosci Res.* 42, 547-561
 65. Vutskits, L.; Djebbara-Hannas, Z.; Zhang, H.; Paccaud, J.-P.; Durbec, P.; Rougon, G.; Muller, D.; Kiss, J. Z. (2001) "PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons" *Eur. J. Neurosci.* 13, 1391-1402
 66. Walz, A., Mombaerts, P., Greer, C. A., Treloar, H. B. (2006) "Disrupted compartmental organization of axons and dendrites within olfactory glomeruli of mice deficient in the olfactory cell adhesion molecule, OCAM" *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 1-14
 67. Weiland, U. (1995) "Expression des E587-Antigens in der frühen Entwicklung des Zebrafischarbings (*Danio rerio*)" Diplomarbeit
 68. Weinhold, B., Seidenfaden, R., Rockle, I., Muhlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., Marth, J. D., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. (2005) "Genetic Ablation of Polysialic Acid Causes Severe Neurodevelopmental Defects Rescued by Deletion of the Neural Cell Adhesion Molecule" *J. Biol. Chem.* 280, 42971-42977
 69. Wells, D. G.; Richter, J. D.; Fallon, J. R. (2000) "Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment" *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 132-137

70. Wells, D. G., Dong, X., Quinlan, E. M., Huang, Y. S., Bear, M. F., Richter, J. D., Fallon, J. R. (2001) "A Role for the Cytoplasmic Polyadenylation Element in NMDA Receptor-Regulated mRNA Translation in Neurons" *J. Neurosci.* 21, 9541-9548
71. Westerfield, M., McMurray, J. V., Eisen, J. S. (1986) "Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish" *J. Neurosci.* 6, 2267-2277
72. Westerfield, M. (1994) "The Zebrafish Book - A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*)"
73. Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S., Doherty, P. (1994) "Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin" *Neuron* 13, 583-594
74. Wullimann, M. F., Rupp, B., Reichert, H. (1996) "Neuroanatomy of the Zebrafish Brain – A Topological Atlas"
75. Yoshihara, Y., Kawasaki, M., Tamada, A., Fujita, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H., Mori, K. (1997) "OCAM: A New Member of the Neural Cell Adhesion Molecule Family Related to Zone-to-Zone Projection of Olfactory and Vomeronasal Axons" *J. Neurosci.* 17, 5830-5842

VII. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

(w/ v)	weight/ volume, Gewicht/ Volumen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpf	days post fertilization
g	Gramm
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
hPa	Hektopascal
hpf	hours post fertilization
IgG/ M	Immunglobulin G/ M
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
i.U	international Unit
kD	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)

mkl	monoklonal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MO	Morpholino
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
ON	über Nacht
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pkl	polyklonal
PNS	peripheres Nervensystem
PSA	Polysialinsäure
PTU	Phenylthioharnstoff
3'RACE	3' rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
Std	Stunde(n)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

zNCAM-mRNA-Sequenz

5' - TCAGCGGCTGAGGACCAATTCATGATATCACAGCGACCTG
 AAACAGGGACAAAGCATCGTAGTCATTTAAATTATATCTGAACCAACTCTACCTATTCTACACGGAAGCATACTTTGGAAAAAATTGCA
 ATGCTTCAAATACGGGATCTCATTTGGACATTGCTTTTCCTTGGTTATGCAGCTGCCTTGCAAGTGGAAATCACTCCGACCCAGGGAGAG 90
 M L Q I R D L I W T L L F L G Y A A A L Q V E I T P T Q G E
 ATCAGCGTTGGAGAGTCCAAATTCCTTCTGTGTGAAGTTGTTGGAGATGCTAAGGAAATAGACTGGTTTGCACCCAATGGGGAGAAGCTC 180
 I S V G E S K F F L C E V V G D A K E I D W F A P N G E K L
 TTGCCAGGAAGACCAGACATCAGCATCAGCAAGACTGACGAGTCATCGTCGACACTCACAATCTACAATGCTAATGTCGATCAGCGGGA 270
 L P G R P D I S I S K T D E S S S T L T I Y N A N V D H A G
 ATGTACAAGTGTGTGGCAAAAAGCGGAGAAAAGGAATTCAGGGCACCATTTCATTGTAATAATTTCCAGAAACTCACTTTTCAATATGCT 360
 M Y K C V A K S G E K E F R A P F I V K I F Q K L T F Q Y A
 CCATCGCCGAGGAGTTTAAAGGAGGTGATGATGCTGACATCATCTGTGATGTCTATTAGCTCACCACCCCAACTATCATCTGGAGGTAT 450
 P S P Q E F K E G D D A D I I C D V I S S P P P T I I W R Y
 AAAAAGATGAGAATCCAGCCTGAGACTGATGTCCGTCTCAAGGTCTTAAGCAACAACCCTCCAGATCCGCGGCATCAAAAAGACAGAT 540

K K M R I Q P E T D V R L K V L S N N H L Q I R G I K K T D
 GAGGGTACTACACCTGCGAGGGCCGCATCATGGCCCGAGGAGAAATCGACCTGAGGGTCATCAAGGTCATTGTCAATGTTCTGCCAAGC 630
 E G D Y T C E G R I M A R G E I D L R V I K V I V N V L P S
 ATCAGGACCCGCTACACTGAGCTTAATGCCACTGCAGACATCAACCAGGCCGTGACGCTGGCCTGTACGCAGATGGCTACCCAGAACCC 720
 I R T R Y T E L N A T A D I N Q A V T L A C H A D G Y P E P
 ACTGTCAAGTGGGCACGAGTAATACGGAGCTGGAATCAGATGAGAAGTACAGTCTAAATGAAGATGGGTCGGAGCTGACCATCAAAGAC 810
 T V K W A R G N T E L E S D E K Y S L N E D G S E L T I K D
 GTCAATAAGCTCGATGAGGAGATTACAAGTGCATCGCTAGAAAACAGGCTGGAGAGAGGAGTGAAGAAGTACGCTCAATGTGTTGTG 900
 V N K L D E G D Y K C I A R N K A G E R S E E V T L N V F V
 CAACCTAAGATCACCTTCTAGAAAACAGACGGCATCTGAGTTGGAGGAGCAGATCACGCTGACTTGTGAGGCGACGGGTGATCCAACA 990
 Q P K I T F L E N Q T A S E L E E Q I T L T C E A T G D P T
 CCTAACATCATCTGGAGCTTCCGCCGCGGTCTTCCACGAAAATGAACAGAGTCTGGATGGTAACTGGTGTGCGCAGTGTGCCCGC 1080
 P N I I W S F G R R V F T E N E Q S L D G N V V V R S D A R
 GTGTCCTCTGACTCTGAAGTACGTTTCAAGTTCACGGACGCCGCCAGTACCTTTGACCCGACGCAACTCCATCGGTGACGACATCCAG 1170
 V S S L T L K Y V Q F T D A G Q Y L C T A R N S I G Q D I Q
 AGCATGTACCTGGAAGTGCCTATGCTCCAAAGATCCAGGGCCCTCAGGCGGTGTTACCTGGGAGGGTAATCCAGCTAATATCACCTGC 1260
 S M Y L E V R Y A P K I Q G P Q A V F T W E G N P A N I T C
 GAGGCCCTCGCTCACCCGGGTGCCTCCGTTTGTGTGTTCCGGGATGGCCAGCAGCTGCCGAGCGCTAATACCACCAACGTCAGATCTAC 1350
 E A L A H P G A S V L W F R D G Q Q L P S A N T T N V K I Y
 AACACCCCCACAGTCAAGTTCCTGGAGGTCACTCCAGACTCCCAAAACGACTTTGGCAGTTACAACCTGCACAGCTACCAATGTATCGGC 1440
 N T P T V S F L E V T P D S Q N D F G S Y N C T A T N V I G
 ACAGAGTCAAAGGAATTCATTTTGGTTCAAGCAGATGTGCCTTCGGCCCTCTATCGAGCGTGTGGAGCCGTATTCCAGCACAGCAATG 1530
 T E S K E F I L V Q A D V P S A P S I E R V E P Y S S T A M
 ATAGAGTTTGAGGAGCCTGCTTCCAGTGGAGGAGTGCCTGTTCTCAAGTACAAAGCTGAATGGAGGATAGCAGGCCAAGACTGGACTGAC 1620
 I E F E E P A S S G G V P V L K Y K A E W R I A G Q D W T D
 CGAGAGTATGAACTTGAGGATGGTCTCAACCTGATCACCATTGTGGGGCTGAAGCCAGAGACCACATATGAAGTCAAGATATCGGCCATC 1710
 R E Y E L E D G L N L I T I V G L K P E T T Y E V K I S A I
 AACGGCAAAGTGAAGGAGAGAGCAGCGCCCGAGAAAGCTTTAAAACCCAGCCTGTTCCGGAACTAATCCCTCAAACCTGGAAGCTAAG 1800
 N G K G E G E S S A P E S F K T Q P V R E P N P P K L E A K
 CCACAGTCCACGGCAATGAGATGAAAGTGCACCTTTATCAAGCAGGACGATGGGGTCTCCCATCAAACACTATCTAGTGCCTACAGA 1890
 P Q S T G N E M K V H F I K Q D D G G S P I K H Y L V R Y R
 GCTAAGAACCAGGACTGGAAGCCTGAGATCCGTATGCTGATGCCAGCGATTACATAGTGTGCGGGCCCTAGACTGGAACACAGAA 1980
 A K N R Q D W K P E I R M P D A S D Y I V L R G L D W N T E
 TATGAAGTCTACGTCATTGCCGAAAACAGCGAGGACGATCTGAACCCGGCACCCTCTCCTTCAGGACCTTGCCAGAACCACCGCCATC 2070
 Y E V Y V I A E N Q R G R S E P G T L S F R T L P E P T A I
 CCGAAAACAAGCTCAGGTTTGGGCACTGGCGCGATCGTGGCATCCTCATTGTGGTCTTCATCTGCTCCTTTTGGCGTAGACGTCACT 2160
 P E T S S G L G T G A I V G I L I V V F I L L L F G V D V T
 TGCTACTTCTGAACAAGTGTGGCCTCCTCATGTGCATCGCTGTCAATTTCTGCGCAAGTCTGGGCCTTCAGCAGCCAAGAGCAAGGAT 2250
 C Y F L N K C G L L M C I A V N F C G K S G P S A A K S K D
 ATCAGGAGGGAAAAGCTGCCTTCACTAAGGATGAATCTAAGGAGCCTATTGTGGAGGTAAGAAGTGAAGAAGAGCGCACACCAAATCAC 2340
 I E E G K A A F T K D E S K E P I V E V R T E E E R T P N H
 GAGGGAGGAGGCCAACTGAACCCAACGAGACCACCCCTCTGACCGACCCCGAGGTAATAATCATTGTAGATGACAAAAGTAAAGCGCCG 2430
 E G G G P T E P N E T T P L T D P D G K I I V D D K S K A P
 GAGACGGAGGTTAAGAAAACCCCGGGAGGTGAAGACAGTCCCAATGAAGCCCGCAGGCGAACGCAACGAGAGCAAAGCATGA 2517
 E T E V K K P P A E V K T V P N E A P Q A N G N E S K A -
 TGGAAATCAGCACGACAGTCGACAGACAGACACCACACCACCACCTTCTCAGATACAAGGCTTTCAGTAACTGTGCTCTTTGA 2607
 GTTTCGCAGAACAAAACACATCTGTAGATGTATAGAGCACCTAAAGAGCTCGCACACTTGCCCTTTGATTTTGTACTTTTCATTTGTTATC 2697
 ACTATTGAAATGTCGTTTCTTTTCAAAAACGCAAGAAGAAAGATTCTTCACTCTAGCACAGTCTCCTTGACCTCTGTGAGTAAAGCCA 2787
 GCATCTTTCAAGTACACTCAGTTTTTTGTTTTTTGAGGAAGAGAAATTTTGCTTTTACACATTCAGCCCAGCGAGATGTTTCAGTTAAGT 2877
 CCCGCTTATAACATGCAGTATTGCCATCATTATTGCTGCCACATCTTATTCTTTTGGGAACATTTTAAATGTTTTACTTGTGTTTTAA 2967
 ATAATGTACAAAACAACCGCCTTTTATTTTTTTCATGATTTTAGCGCTAGATTTTAGCACGCTTGCTTTGCAGAAATGATT 3057
 CCAGCCCTGAGTATTCACAGCATTTTACTTTGATAAAAACCTGCTGTTTGCCTCACAGAAGATTACACAACTAAAGGCTGAACTAGTGG 3147
 TTAGGTTTGAATAAAAATCGCCACTTATTTTCTGTTTTACACATACTTTTCAATTTACAACACATGCCGTTTTCTGAGCCTCAGGGT 3237

TCCTTCCATTAGTTTTGGTTTTAGAGCAGGATTGAGAGTCAAATAGGTCTCCACAGTGATCTTTGCTTAAAAACGTCCCAGTCC 3327
 TTTAAAAAACATTAGGAACAACCTCGGAGCTCTTAGATATGGATCGAATGGCTCCTTGAGAGG - 3' 3390

Abb. 63: Sequenz der zNCAM-mRNA mit 3'UTR

Gezeigt ist hier die Sequenz der zNCAM-mRNA mit der klonierten 3'UTR. Unter der codierenden Sequenz ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode dargestellt. Die nicht unterstrichenen Bereiche entsprechen der zNCAM-Sequenz, wie sie von Mizuno et al. (2001) publiziert wurden. Der unterstrichene Bereich ist Ergebnis der Klonierung und enthält das CPE-Motiv (rot), sowie das Poly(A)-Signal (blau).

zPCAM-mRNA-Sequenz

5' - CTCAGCGCGACATATGGGCACGCGAATC
 TAAACCGCAACAATATCAATACAGTCCAAGCGTCGGGGATTCTCGTAAACAATCGCGTCCCCTCCAGAAAACCTTCGGGAAACCTTCTCGG
 GCATCATTTTACGGATTACGGATTCTTCGTTTCTAGCACGGAAGGCAAAAACAACAGTAAACACACTGTGTGTTTATAAAGGGAGTGCA
 ATGTTTCCGACCAAGGCGATAATCTTGGTGCTTCTTTCTTTGACAACGCAGTTTCTCTGCAGGTCGATATTACACTGCGCACGGCGAG 90
 M F P T K A I I L V L L F F D N A V S L Q V D I T P A H G E
 ATCAGCGTCGGAGAGTCTCGTCTCTTTTGTGTGAAGTTATTGGTGGGGCCAAGGAAATGATTGGTTTGCTCCAGCTGGGGAGAAAATT 180
 I S V G E S R F F L C E V I G G A K E I D W F A P A G E K I
 GAGCCTGGTCGACCGACATCAGTGTGATTGCAACGACGAGAGCTCTCCACTCTTACCATCTACAACGCAAAGGTCGACAATGCTGGA 270
 E P G R P D I S V I R N D E T S S T L T I Y N A K V D N A G
 ACATACAGATGTGTGGCCAGCAGTGGCGATCAGGATGCAGAAGCCACTGTCAATCTGAAGATATACCAAAAAATTACCTTTACAAATGTC 360
 T Y R C V A S S G D Q D A E A T V N L K I Y Q K I T F T N V
 CCATCACCTCAAGAGTTCACTGAAGGGGACAACGCATTATCGTGTGTGATGTCATAAGCTCACCTCCACCCACAGTCCCTGGAATAT 450
 P S P Q E F T E G D N A I I V C D V I S S P P P T V L W K Y
 AAAGTGCTAAGATCCAGTTTGATAAAGATGTTTCGTTTCAAGACTTTGAGTAAACAACCATCTCCAATCCGAGGGATCAGGAAGACTGAC 540
 K G A K I Q F D K D V R F K T L S N N H L Q I R G I R K T D
 GAGGGAGTGACTTGTGAGGGTCGTATTAAAGCCCGTGGAGAGGTTGACTTCCGAGCATTAAAGTGGTTGTGAACGTTCTACCCACT 630
 E G V Y T C E G R I K A R G E V D F R S I K V V V N V L P T
 ATAAGGATCCGTCAAGCGGAAACGAACGCCACTGCCGACATGGGTTTCTCAACTCTTCTGGCCTGTGATCCCTGATGGATTCCCTGAGCCC 720
 I R I R Q A E T N A T A D M G F S T L L A C D P D G F P E P
 ATAGTGACCTGGAGACGGAACAATGCTCCACTGGAGAGCGGAAACAATACAGCTTCAATGAAGACGGCTCAGAGATGACAGTACTAGAT 810
 I V T W R R N N A P L E S G N K Y S F N E D G S E M T V L D
 GTGACAAAGCTGGACGAGGAGATTACACATGCATTGCTAAGAACAAGCTGGGGAGAGCGAACAAGAAGCTTAGCCTTAAAGTCTTTGTA 900
 V T K L D E G D Y T C I A K N K A G E S E Q E L S L K V F V
 CAACCCAAAATCACATACTTGGAAAGCCAGACGACCACAGAAATGGACGAGCAGGTACATTAACATGCGAAGCCACTGGAGACCCCCACA 990
 Q P K I T Y L E S Q T T T E M D E Q V T L T C E A T G D P T
 CCCACCATTACATGGAGCTTCGGCACCCGAGTCTTACCAGGAGGAGCAGGCCTCTTGGACTCGGCCCGAACAGCACAGGGTCCCTGAT 1080
 P T I T W S F G T R V F T E G E Q A S W T R P E Q H K G P D
 GGTGAAGTGTGGTCCGAGTGTGCCCAGTGTGCTCCCTCACCTGAAGTATCCTCAATACAGACGCCGGGAGTATCTCTGCACT 1170
 G E V L V R S D A R V S S L T L K Y P Q Y T D A G Q Y L C T
 GCCCGCAATGCCATTGGAGAACTGTGCAACCCGTCAGTCTGGAAGTGCCTACGCCCCGAAAATCCTGGGCTCAGTAGCGGTGTACAG 1260
 A R N A I G E T V Q P V S L E V R Y A P K I L G S V A V Y T
 TGGGAGGGCAACCCGGCAACATCAGTGTGAAGTACTGGCTCACCCAGCGATGTGTCTATTACGTGGCTGCGAGACGGCTTCCAGCTG 1350
 W E G N P A N I S C E V L A H P S D V S I T W L R D G F Q L
 CCCAACGCTAACACCTCCAATATCAAGATCCACAACACGCCTTCCGCCAGTACCTGGAGGTCAATCCAGAGTCTCAGAGCGACTTTGGC 1440
 P N A N T S N I K I H N T P S A S Y L E V N P E S Q S D F G
 AACTACAACGTACTGCCTCAACGAGATCGGGACCGAATCCAGAGAGTTCATCATGATCCCAGCTGATGTGCCCTCGGGCCCGTCCATC 1530
 N Y N C T A S N E I G T E S R E F I M I P A D V P S A P S I
 GGTGAAGTGCAGCCGACTCCAGCACAGCTCAGGTGCTTTTCGAAGAGCCGAGTCCACTGGAGGAGTTCCTGTGCTCAAGTACCGAGCC 1620
 G E V Q P Y S S T A Q V L F E E P E S T G G V P V L K Y R A
 GAGTGGAGAGCCGTGGGCCGAGGAAATGGGTGCAGCGAGTCTATGAGGTGAAAGACGGACTGAGTTCAGTCACAGTCACTGGCCTTAAA 1710
 E W R A V G R G K W V Q R V Y E V K D G L S S V T V T G L K
 CCCGAAACCGATTACGAAGTCAAGATGTCTGCTATCAACGGCAAGGGCGAAGGCGACAGCAGCCGTCATGGTCTTCAAAACCGAGCAT 1800

P E T D Y E V K M S A I N G K G E G D S S P S M V F K T E H	
GTTCAAGGAGAGCCCAGTCCTCTATCTAGAAAGGACTCTACAACCCAAAGGCAATTCTCTCAAAGTCAAGTGGATCAAACAAGATGAC	1890
V Q G E P S P P I L E G T L Q P K G N S L K V K W I K Q D D	
GGAGGGTCACCAATCACCCATTACCTGGTCAGATACAAAGCTAGGGAAGACTCCGAGTGGAAACCTGAGATCCGTCTGCCAGTGGGAGT	1980
G G S P I T H Y L V R Y K A R E D S E W K P E I R L P S G S	
GAGTACGTAATGCTGATCGGTCTGGACTGGGACACCGAGTATGACGTGTTTGTGGTGGCAGAGAACCAACAGGGCAAGTCCAAGCCTGGC	2070
E Y V M L I G L D W D T E Y D V F V V A E N Q Q G K S K P G	
ACCCTGACCTTCAGGACCTCATCAGAGCCACAGCCACAGACTCAATGGAGGACGGGCCGGCCCTGAACACTGGTGTATTGTTGGT	2160
T L T F R T S S E P T A T T D S M E D G P G L N T G V I V G	
ATTCTTATCTGGTGTGTGTGCTCTTGTGATCGTGGACGCCACTGTGCTTCCTTAACAAGTGTGGCATCCTCATGTGCATCTGC	2250
I L I L V C V L L L L I V D A T C C F L N K C G I L M C I C	
GGTAAACCCGGGCAAAGCACCAAAGGCAAGGACATAGAGACCGCAAAGCTGCCTTTGTTCAGACGTGTCGAAAGAGCCCATTTGTGAA	2340
G K P G Q S T K G K D I E T G K A A F V Q D V S K E P I V E	
GTGAGGACTGAAGAAGAGGCCACAGCTAATCATGACGCAGAAGGACATCTTGGACCCAATGAGACCAGCCACTGACTGAACCAGAGCAA	2430
V R T E E E A T A N H D A E G H L E P N E T T P L T E P E Q	
GTGACGGAAATGCCCGCGGTGGTGGACTTGCCTCTTTCCGTGCCCACTAAGTCAAGACACAATCACTGACACTTTTGACCTTAGCCAG	2520
V T E T A A A V V D L P L S V P T N S D T I T D T F D L S Q	
AGCAGCCCGGTTAGCGAAAGCACGACCCCTCACCTCCAGCATCACAGCACCTCCCTCTGACCCCTATTAACCCCGTCCACATGACACCCCT	2610
S S P V S E S T T L T S S I T A P P S D P I N P V H M T P P	
GACAGCAGCACACCCAAACCCACAGCAGACCTTCCATCTCATCCTCCGACCCGCTAATGTTACTCTCCTGGTAGATCTGGCGGAGGTT	2700
D S S T P K T H S R P S I S S S D P A N V T L L V D L A E V	
TCTCCAGCCGTCATCAGAAAGACAGTCCAAAGTTCCTTCTCCCTACCAGTGTAGATCATCCTGGTACTATAATCTCAAAGTCACC	2790
S P A V P S E E P V Q V P S S P T S V D H P G T I I S K V T	
GAAAACGAGTCTGTTGAGAGTCCATCTCATGCCGCTTTAAATCCCATCAGCCACAGGGCGACATCGCTGTCCATTAGTGAATCATGAA	2880
E N E S V Q S P S H A A L N P I S P Q G D I A V P L V N H E	
CTTGAGATTGATGGAGAGCTCCCACTGGCTTCAGACACAGACGCCACGCAGGATGGGTACATGCTGGGGGTACAGCTGGCTCCAGTGGC	2970
L E I D G E L P L A S D T D A T Q D G S H A G G T A G S S G	
CCATCTGCTCCAGCACAGGACGAGAAAATTCTGGAGGATGAAAATGCAGAGCTGAAGAAAGTGGCACCCGATGCAGGATTGAACCCAAC	3060
P S A P A Q D E K I L E D E N A E L K K V A P D A G F E P N	
GCCGTCACGCAAACAACATTGAAAGTAAAGCATGA	3096
A V T Q T N I E S K A -	
AACCACCGATGGAGAAGAAAAGTGCATGATGACCATGAACGTGTTTGTAAATCAGTGCCTTAAAGATTTTTCTCAAACGAAACGGTGT	3186
ATATTTCTATACAGAAGTCTCATTATAATGTGCATTTTCCTTTTATTTTGGAGTAAAGATTCGAGTAAACTTCCAGAAGCTTCTATTTGA	3276
GGACTTAAATCAAATTCATTTAAAACAAAATGCTCTTGTAGAAACTCTTGTGTGTTTTTGTATTTTATTTTATTTCTTTTCTTTGATG	3366
ATCCAACAGGGCAAGCTATTACAGGAGAATTATATATTCAGTAATATGTTTTATTTCGCATAAAACATTGTTAAATGTAATGATTCTGA	3456
TATTTTATATCTTGGAGTGTGGAGGCTAGGTTTGGTTGTCTTTTATTAATTTTATCATATTGTTTAAATTACACGTAACGTTTGTG	3546
CCTCTTGGATGATATAATTACTCATGATGGCAGTTATGTAAACACAAAATATCTTAAGATATTTAACATACTGTTATGACCAAGGATCT	3636
GATAAAGATTTCAAGTTAGCCATTTGATTGGTTGAAGTCTTTATTAGATCAGTTTTTTACAGTTTGTGGTGTATTCTAATATCTGAGA	3726
TTTAATACTTTCAATCATTCTCCACGTGC - 3'	3757

Abb. 64: Sequenz der zPCAM-mRNA mit 3'UTR

Gezeigt ist hier die Sequenz der zPCAM-mRNA mit der klonierten 3'UTR. Unter der codierenden Sequenz ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode dargestellt. Die nicht unterstrichenen Bereiche entsprechen der zPCAM-Sequenz, wie sie von Mizuno et al. (2001) publiziert wurden und enthalten das CPE-Motiv (rot). Der unterstrichene Bereich ist Ergebnis der Klonierung.

zOCAM-mRNA-Sequenz

5' - TCAGCGTCCAGCGTCCGTTCAACTCACTTCGCGCACTGGCCGCTGTCCACCAGGACCCGCTCAAA	
ATGATTCGGACCGTCTCTGTTTCTCGGATGCTCGTGGTGGCAGTCAAGGTGCCCTCCAGGTGTCAATCTCGCTGAAAAAGGTGGAG	90
M I R T V L C F L G L L V G G S Q G A L Q V S I S L K K V E	

<u>GTTGCTTTGAGTCTTTGTATTATGAAGAGGTTTGATCTAAGCGGACAAGCGTCACAATTTTCTCTCGCTCTCATTCAGTCTTTCTCTGG</u>	2748
<u>AATCCGGCCGTTGCACTTTTTTCCAGTGTGGTTGCGCAAAACACGTCGTTGGAGGCCCTGCGACCCCTCTAAAAGAACATGCAAAGTGAGCCA</u>	2838
<u>CCCGGAGACCAATAGCAAGCAAACAACGAGAATACAAGCAAGAACACGCCAATCAATTGTAAGATCCTTTGTTAGAGACTCCTTGTCCG</u>	2928
<u>GGTGTGAGAAGAGGCCATGCGAAAACCTGCTTTTGTGAAACATTTTTCGAAGGTTGCCGCTCAACAGACAGGCTCCTGTTTATTTGTGCTT</u>	3018
<u>GTTCTCGCTTGTGTTTTCAGTCTTTAGTTTCTTCCCTTAAAGGCTTTGCTGTTGCTTTGAGTCTTTGTTATTTGAAGAGGTTTGATCTACGCG</u>	3108
<u>GACAAGCGTCACAATTTTCTCTCGCTCTCATTCAGTCTTTCTCTGGAATCCGGCCGTTGCACTTTTTTCCAGTGTGGTTGCGCAAAACAC</u>	3198
<u>GTCGCTTTTTAATACATCATTTTCACTCGAGATTAACCGGTGGAAACTCCCCACCTCTGTTTGAGTCCGTTGTTGTTTGGGTGACTG</u>	3288
<u>TTTGAGTAATGTGTTGGGTTTTTGTGTTTTTTTAAAGCCTTTTGGCACTGTGTCTCACCCAAATGTGAAGAATTTTTCGAATGCTC</u>	3378
<u>AATAGCAAAGCGAGGATCAACCACGCTTGACCCAGACTGAGTATGTTGGTGGTCCCGGTAACCTTTCGGATTGAACAATGAATAGATTAC</u>	3468
<u>AAGTGTTTTTGTGGATGAAAATATGCTCCTGTTTTCAACACTTTTGTTCATCACTCAAAGGAGCCCAATTGTGTCATGGATTCAATTGT</u>	3558
<u>TAAGATATTTTCGAAACAAAAGAGAACAAAAAAGTGCTTTTCTTTTCAAAGCGTCCGAGGAAAGTAGAGGTTGCCAAGTCTTGAAT</u>	3648
<u>AAATAAAGATTAGGAAAATATAAAGAAGAAAAAAGATTTTCCAGTGCACAGATGTAAATATAATTGTTATTTCTTTGGAGCATTTTC</u>	3738
<u>ACAAAAAGAAAAATAAATATGATTCACTACAAATCTGTCATATTACTGATAAGTTATTAATATTGGCAATCTTAAAGATTCAATAAA</u>	3828
<u>GAACTCATCAAGAGCTAAAGAAGGGC</u> - 3'	3854

Abb. 65: Sequenz der zOCAM-mRNA mit 3'UTR

Gezeigt ist hier die Sequenz der zOCAM-mRNA mit der klonierten 3'UTR und den beiden darin enthaltenen Poly(A)-Signalen (blau). Unter der codierenden Sequenz ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode dargestellt. Die nicht unterstrichenen Bereiche entsprechen der zOCAM-Sequenz, wie sie von Mizuno et al. (2001) publiziert wurden. Der unterstrichene Bereich ist Ergebnis der Klonierung. Beide Abschnitte enthalten kein CPE-Motiv.

codierende Sequenz von zNCAM mit dem alternativen Exon

<u>ATGCTTCAAATACGGGATCTCATTGGACATTGCTTTTCTTGGTTATGCAGCTGCCTTGAAGTGGAAATCACTCCGACCCAGGGAGAG</u>	90
M L Q I R D L I W T L L F L G Y A A A L Q V E I T P T Q G E	
<u>ATCAGCGTTGGAGAGTCCAAATCTTTCTGTGTGAAGTTGTTGGAGATGCTAAGGAAATAGACTGGTTTGCAACCAATGGGGAGAAGCTC</u>	180
I S V G E S K F F L C E V V G D A K E I D W F A P N G E K L	
<u>TTGCCAGGAAGACCAGACATCAGCATCAGCAAGACTGACGAGTCACTCGACACTCACAATCTACAATGCTAATGTGATCACGGGGA</u>	270
L P G R P D I S I S K T D E S S S T L T I Y N A N V D H A G	
<u>ATGTACAAGTGTGTGGCAAAAAGCGGAGAAAAGGAATTCAGGGCACCATTCAATTGTAATAATTTCCAGAAACTCACTTTTCAATATGCT</u>	360
M Y K C V A K S G E K E F R A P F I V K I F Q K L T F Q Y A	
<u>CCATCGCCGAGGAGTTTAAAGGAGGTGATGATGTGACATCATCTGTGATGTCAATAGCTCACCACCCCAACTATCATCTGGAGGTAT</u>	450
P S P Q E F K E G D D A D I I C D V I S S P P P T I I W R Y	
<u>AAAAAGATGAGAATCCAGCCTGAGACTGATGTCCTCAAGTCTTAAGCAACAACCCTCCAGATCCGCGGCATCAAAAAGACAGAT</u>	540
K K M R I Q P E T D V R L K V L S N N H L Q I R G I K K T D	
<u>GAGGGTACTACACTGCGAGGGCCGCATCATGGCCCGAGGAGAAATCGACTGAGGGTCAAGGTCATTGTCAATGTTCTGCCAAGC</u>	630
E G D Y T C E G R I M A R G E I D L R V I K V I V N V L P S	
<u>ATCAGGACCCGCTACACTGAGCTTAATGCCACTGCAGACATCAACCAGGCCGTGACGCTGGCCTGTACGCAGATGGCTACCCAGAACCC</u>	720
I R T R Y T E L N A T A D I N Q A V T L A C H A D G Y P E P	
<u>ACTGTCAAGTGGGCACGAGGTAATACGGAGCTGGAATCAGATGAGAAGTACAGTCTAAATGAAGATGGGTCGGAGCTGACCATCAAAGAC</u>	810
T V K W A R G N T E L E S D E K Y S L N E D G S E L T I K D	
<u>GTCAATAAGCTCGATGAGGGAGATTACAAGTGCATCGCTAGAAACAAGGCTGGAGAGAGGAGTGAAGAAGTACAGCTCAATGTGTTTGTG</u>	900
V N K L D E G D Y K C I A R N K A G E R S E E V T L N V F V	
<u>CAACCTAAGATCACCTTCTAGAAAACAGACGGCATCTGAGTTGGAGGAGCAGATCACGCTGACTTGTGAGGCGACGGGTGATCCAACA</u>	990
Q P K I T F L E N Q T A S E L E E Q I T L T C E A T G D P T	
<u>CCTAACATCATCTGGAGCTTCCGCCCGCGTCTTCCACGAAAATGAACAGAGTCTGGATGGTAACGTGGTTGTGCGCAGTGATGCCCGC</u>	1080
P N I I W S F G R R V F T E N E Q S L D G N V V V R S D A R	
<u>GTGCTCTCTGACTCTGAAGTACGTTTCAAGTTCACGGACCGCGCCAGTACCTTTGACCCGACGCAACTCCATCGGTCAAGGACATCCAG</u>	1170
V S S L T L K Y V Q F T D A G Q Y L C T A R N S I G Q D I Q	

AGCATGTACCTGGAAGTGCCTATGCTCCAAAGATCCAGGGCCCTCAGGCGGTGTTCACCTGGGAGGTAATCCAGCTAATATCACCTGC S M Y L E V R Y A P K I Q G P Q A V F T W E G N P A N I T C	1260
GAGGCCCTCGCTCACCCGGTGCCTCCGTTTTGTGGTTCCGGGATGGCCAGAGCTGCCGAGCGCTAATACCACCAACGTCAAGATCTAC E A L A H P G A S V L W F R D G Q Q L P S A N T T N V K I Y	1350
AACACCCCCACAGTCACTTCCTGGAGGTCACTCCAGACTCCCAAAACGACTTTGGCAGTTACAACCTGCACAGCTACCAATGTCATCGGC N T P T V S F L E V T P D S Q N D F G S Y N C T A T N V I G	1440
ACAGAGTCAAAGGAATTCATTTTGGTTCAAGCAGATGTGCCTTCGGCCCCCTCTATCGAGCGTGTGGAGCCGTATTCCAGCACAGCAATG T E S K E F I L V Q A D V P S A P S I E R V E P Y S S T A M	1530
ATAGAGTTTGAGGAGCCTGCTTCCAGTGGAGGAGTGCCTGTTCTCAAGTACAAAGCTGAATGGAGGATAGCAGGCCAAGACTGGACTGAC I E F E E P A S S G G V P V L K Y K A E W R I A G Q D W T D	1620
CGAGAGTATGAACCTGAGGATGGTCTCAACCTGATCACCATTGTGGGGCTGAAGCCAGAGACCACATATGAAGTCAAGATATCGGCCATC R E Y E L E D G L N L I T I V G L K P E T T Y E V K I S A I	1710
AACGGCAAAGGTGAAGGAGAGAGCAGCGCCCCAGAAAGCTTTAAAACCCAGCCTGTTCCGGGAACCTAATCCTCTAAACTGGAAGCTAAG N G K G E G E S S A P E S F K T Q P V R E P N P P K L E A K	1800
CCACAGTCCACGGCAATGAGATGAAAGTGCACCTTATCAAGCAGGACGATGGGGTTCCTCCATCAAACACTATCTAGTGGCTACAGA P Q S T G N E M K V H F I K Q D D G G S P I K H Y L V R Y R	1890
GCTAAGAACCAGGACTGGAAGCCTGAGATCCGATGCCTGATGCCAGCGATTACATAGTGTGCGGGGCTAGACTGGAACACAGAA A K N R Q D W K P E I R M P D A S D Y I V L R G L D W N T E	1980
TATGAAGTCTACGTCATTGCCGAAAACAGCGAGGACGATCTGAACCCGGCACCCTCTCCTTCAGGACTTGCCAGAACCACCCGCCATC Y E V Y V I A E N Q R G R S E P G T L S F R T L P E P T A I	2070
CCAGAAAACAGCTCAGGTTTGGGCACTGGCGCGATCGTGGGCATCCTCATTGTGGTCTTCATCTGCTCCTCTTTGGCGTAGACGTCCT P E T S S G L G T G A I V G I L I V V F I L L L F G G V D V T	2160
TGCTACTTCTGAACAAGTGTGGCCTCCTCATGTGCATCGCTGTCAATTTCTGCGGCAAGTCTGGGCCTTCAGCAGCCAAGAGCAAGGAT C Y F L N K C G L L M C I A V N F C G K S G P S A A K S K D	2250
ATCGAGGAGGGAAAAGTGCCTTCACTAAGGATGAATCTAAGGAGCCTATTGTGGAGGTAAGAAGTGAAGAAGAGCGCACACCAAATCAC I E E G K A A F T K D E S K E P I V E V R T E E E R T P N H	2340
GAGGGAGGAGGCCAAGTGAACCAACGAGACCACCCCTCTGACCGACCCCGCAGCGTGTGACACCACAGCAACAGTAGTGACTTGCT E G G G P T E P N E T T P L T D P	2430
TCCCTCTGTAACCACTAAGTCAAGCAGCAGCCCGGACTGAAAGTCCGGCTAGCGATAGCACCACCCTTACCACCAGCACCACCCTAAACCTAC	2520
TCCCCAATCCAGCACCACCAACCTAGCGTACCTCTCCACCTCCCTCCTCAAGCCGTGGCCCTCTGGTGGACTGAGTGAAACACC	2610
CTCCAAACAGACCTCAAAGTCTTAGATGATTCAAGCCCCGAGAAGTGGCCAGAGCCGATGGCCAGAGCCCGGCTGAGCCGGCCAAAGC	2700
CCCCAAAGTAAGGACTCTCAGGTACAAGCAGGATCCCACCAGACCACAGATAGTGACCCTGCCAAGAATTCAGCGACTCCTCCAGCGC	2790
ACCGTCCGCACCCAACAGGACGAGACCGGTAAAATCATTGTAGATGACAAAAGTAAAGCGCCGAGACGGAGGTTAAGAAAACCCCGGCG D G K I I V D D K S K A P E T E V K K P P A	2880
GAGGTGAAGACAGTCCCAATGAAGCCCGCAGGCGAACGGCAACGAGAGCAAAGCATGA E V K T V P N E A P Q A N G N E S K A -	2940

Abb. 66: codierende Sequenz von zNCAM mit alternativem Exon

Die dargestellte Sequenz zeigt den codierenden Bereich von zNCAM mit dem eingefügten alternativen Exon (rot). Unter der Sequenz steht der Einbuchstabencode der Aminosäuresequenz. Für das alternative Exon konnte diese Darstellung nicht erfolgen, da die Sequenz eine Leserasterverschiebung aufweist. Somit wäre das Stopcodon nicht mehr zu lesen.

Vergleich der Proteinsequenzen von zNCAM und zPCAM

Base: Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode:

	10		20	
	-----+-----+-----			
1	M L Q I R D L I W T L L F L G Y A A A L	zNCAM	CDS	
1	M F P T K A I I L V L L F F D N A V S L	zPCAM	CDS	
	30		40	
	-----+-----+-----			
61	Q V E I T P T Q G E I S V G E S K F F L	zNCAM	CDS	

Lebenslauf

Persönliche Daten

Michael Dietzsch

geboren am 09.04.1980 in Jena

ledig

Akademische Ausbildung

11/ 2004 bis 02/ 2008

Promotion an der Universität Karlsruhe (TH)

Promotionsthema: „Die Familie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle im Zebrafisch: Expressionsmuster, Funktion und Glykosylierung“

10/ 1999 bis 11/ 2004

Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss mit Gesamtnote 1,5

Diplomarbeitsthema: „Verteilung und Funktion von Proteoglykanen im Zebrafisch, *Danio rerio*“

Hauptfach: Allgemeine Zoologie

Nebenfächer: Biochemie und Genetik

Zivildienst

08/ 1998 bis 08/ 1999

Neurologische Intensivstation am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Schulbildung

09/ 1991 – 07/ 1998

Staatliches Gymnasium „Ernst Haeckel“ Jena, Abschluss mit Abiturnote 1,7

09/ 1986 – 07/ 1991

Grundschule „Erich Weinert“ Jena