

Expressionsregulation, Glykosylierung und Funktion von Zelladhäsionsmolekülen der NCAM-Familie im Zebrafischembryo

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Melanie Langhauser

aus

Ludwigshafen am Rhein

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Co-Referent: Prof. Dr. Uwe Strähle

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2012

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in der Zeit von Mai 2008 bis März 2012 durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:

Langhauser M., Ustinova J., Rivera-Milla E., Ivannikov D., Seidl C., Slomka C., Finne J., Yoshihara Y., Bastmeyer M. und Bentrop J. (2012): "Ncam1a and Ncam1b- two carriers of polysialic acid with different functions in the developing zebrafish nervous system", *Glycobiology*, Feb. 22(2):196-209

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet habe.

Melanie Langhauser, 7. März 2012

1	Zusammenfassung	11
2	Einleitung	12
2.1	Das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM1.....	13
2.1.1	NCAM1: Aufbau und Vorkommen	13
2.1.2	NCAM1-Interaktionen.....	14
2.1.3	PolySia, eine posttranslationale Modifikation von NCAM1	15
2.1.4	Funktion von NCAM1 und deren Modulation durch polySia.....	17
2.2	Das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül NCAM2 (OCAM).....	21
2.2.1	NCAM2: Aufbau und Expression.....	21
2.2.2	Funktion von NCAM2	22
2.3	Die NCAM-Familie im Zebrafischembryo.....	23
2.3.1	Duplikation der <i>ncam</i> -Gene im Zebrafisch.....	23
2.3.2	Aufbau der Vertreter der NCAM-Familie im Zebrafisch.....	24
2.3.3	Spezifisches Expressionsmuster der Mitglieder der NCAM-Familie im Zebrafischembryo.....	25
2.3.4	PolySia-Expressionsmuster im Nervensystem des Zebrafischembryos.....	26
2.3.5	Die Entfernung von polySia führt zu verändertem axonalem Wachstum im Zebrafischembryo.....	27
2.3.6	PolySia-Akzeptormoleküle im Zebrafischembryo.....	28
2.3.7	Wird die polySia-Expression auf den Axonen im Zebrafischembryo über das CPE-Motiv reguliert?	28
2.4	Das cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE)	28
2.4.1	Expression maternaler mRNA über den CPE-Mechanismus	29
2.4.2	Die CPE-abhängige Translation im Zebrafisch	31
2.5	Zielsetzung dieser Studie	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Chemikalien und Reagenzien.....	35
3.2	Medien, Puffer und sonst. Lösungen	36
3.2.1	PBS (Pulver von Biochrom AG).....	36
3.2.2	PBS/1%BSA/1%DMSO-Lösung	37
3.2.3	Phosphatpuffer (4x).....	37

3.2.4	4 % PFA in Phosphatpuffer.....	37
3.2.5	Danieau-Puffer (50x)	38
3.2.6	E3-Embryomedium (Haffter et al., 1996).....	38
3.2.7	PTU-Lösung (0,3%)	39
3.2.8	Natriumborhydrid-Lösung	39
3.2.9	Mowiol mit n-Propylgallat.....	39
3.2.10	TAE Puffer (50x; Elektrophorese-Puffer für Agarose-Gele).....	39
3.2.11	SOC-Medium (von Invitrogen)	40
3.2.12	LB-Medium	40
3.2.13	Antibiotika-Stammlösungen	40
3.2.14	LB-Agarplatten für BP-Konstrukt mit 50 µg/ml Kanamycin	40
3.2.15	LB-Agarplatten für LR-Konstrukt mit 100 µg/ml Ampicillin	41
3.3	Antikörper	41
3.3.1	Primärantikörper für die Immunfärbung.....	41
3.3.2	Sekundärantikörper für die Immunfärbung	42
3.4	Konjugat	42
3.4.1	EndoN-GFP	42
3.5	Enzyme	43
3.5.1	DNA-Polymerasen	43
3.5.2	RNA-Polymerasen	43
3.5.3	Multisite Gateway Enzyme (von Invitrogen)	43
3.6	Zellen.....	43
3.7	Versuchstiere.....	44
3.8	Aufzucht von Zebrafischen (ZF).....	44
3.8.1	Paramecien-Zucht	45
3.8.2	Artemien-Zucht.....	45
3.9	Gewinnung von Zebrafischembryonen im gewünschten Stadium	45
3.10	Mikroinjektion von Zebrafischembryonen.....	46
3.10.1	Herstellung und Füllung der Injektionsnadeln	46
3.10.2	Mikroinjektion.....	46

3.11	Aufzucht von Zebrafischembryonen, „Staging“, Dechorionieren	47
3.12	Fixierung und „Wholemout“-Immunfärbung von Zebrafischembryonen.....	47
3.13	Dottersackentfernung und „Mounting“ der Zebrafischembryonen	49
3.14	Knockdown-Technik mittels Morpholino-Injektion	50
3.15	Umklonierung von <i>ncam1a</i> und <i>ncam1b</i> zur Durchführung der „Rescue“- Experimente	51
3.16	Klonierungen mit dem Multisite Gateway System (Invitrogen) und den Bausteinen des Tol2kits.....	52
3.17	Auswertung der Zebrafischembryonen am Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta (Zeiss).....	54
3.17.1	Verwendete Optiken und Software zur Analyse der Präparate	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Expressionsmuster der Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie	56
4.1.1	<i>Ncam1a</i> und <i>Ncam1b</i> besitzen ein unterschiedliches Expressionsmuster im Nervensystem des Zebrafischembryos.....	56
4.1.2	Expressionsmuster von <i>Ncam1a</i> und <i>Ncam1b</i> auf dem posterioren Seitenlinienorgan.....	62
4.1.3	Expression von <i>Ncam2</i> ist auf das Prosencephalon beschränkt.....	64
4.2	Polysialylierung der NCAM-Moleküle im Zebrafischembryo.....	65
4.2.1	Morpholino-Knockdown von <i>ncam1a</i> und <i>ncam1b</i>	65
4.2.2	PolySia, eine posttranslationale Modifikation von <i>Ncam1a</i> und <i>Ncam1b</i>	68
4.2.3	PolySia- <i>Ncam1a</i> überwiegt im cranialen und polySia- <i>Ncam1b</i> im caudalen Teil des Zebrafisch-Nervensystems	71
4.2.4	Kein Hinweis für eine Polysialylierung von <i>Ncam2</i> (OCAM)	75
4.3	Die Funktion der Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie im Zebrafischembryo 77	
4.3.1	<i>Ncam1a</i> und <i>Ncam1b</i> besitzen eine unterschiedliche Funktion an der posterioren Kommissur	77
4.3.2	PolySia- <i>Ncam1b</i> beeinflusst das Wachstum der Motoraxone.....	83
4.3.3	Ganglion des posterioren Seitenliniennervs und Nervus vagus in den <i>ncam1b</i> -Knockdownembryonen verändert	86
4.3.4	Verändertes Bewegungsmuster nach <i>ncam1b</i> -Knockdown.....	89

4.3.5	Reduzierte Stabilität der Knockdown-Embryonen	92
4.4	Funktion der CPE-Sequenzen in der 3'UTR von mRNA im Zebrafischembryo ..	94
4.4.1	Die CPE-Sequenz der 3'UTR von <i>st8sia2</i> -mRNA verhindert die Expression des Reporterkonstrukts.....	95
4.4.2	Funktion der CPEs in der 3'UTR von <i>ncam1a</i> und <i>ncam1b</i> ?	96
5	Diskussion	99
5.1	Die Expression von Ncam1a und Ncam1b im Zebrafischembryo.....	101
5.1.1	Differierende Expressionsmuster im sich entwickelnden Nervensystem ...	101
5.1.2	Diversifizierung der Expressionsmuster von Ncam1a und Ncam1b entlang des posterioren Seitenlinienorgans.....	103
5.2	PolySia, die posttranslationale Modifikation von Ncam1a und Ncam1b im Zebrafischembryo	104
5.3	Die Funktion von Ncam1a und Ncam1b im Nervensystem des sich entwickelnden Zebrafischs	107
5.3.1	PolySia-Ncam1a und Ncam1b beeinflussen das axonale Wachstumsmuster der posterioren Kommissur	107
5.3.2	Ncam1b reguliert das Wachstumsmuster der spinalen Motoraxone.....	110
5.3.3	Funktion von Ncam1b bezüglich der Axonfaszikulierung des Nervus vagus 111	
5.3.4	<i>Ncam1b</i> -Knockdown führt zur Reduktion des Seitenliniennerv-Ganglions infolgedessen kommt es zu einem veränderten Schwimmverhalten der Embryonen 112	
5.3.5	Reduzierte Stabilität der Zebrafischembryonen	114
5.4	Das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül Ncam2	115
5.5	Die Expressionsregulation der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle und deren polySia-Modifikation über die CPE-Sequenz	117
5.6	Ausblick	120
6	Literaturverzeichnis	122
7	Anhang	140
7.1	Abkürzungsverzeichnis	140
7.2	Danksagung	141
7.3	Lebenslauf.....	143

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der NCAM1-Isoformen in der Maus, nach Fields und Itoh, 1996.....	13
Abbildung 2: Schema zur Polysialylierung von NCAM1	16
Abbildung 3: PolySia moduliert homophile Interaktionen von NCAM1 (Schema).....	18
Abbildung 4: Zonale Organisation des olfaktorischen Systems in der Maus (Yoshihara et al., 1997).....	21
Abbildung 5: Aufbau der Vertreter der NCAM-Familie im Zebrafisch, nach Mizuno et al., 2001:.....	24
Abbildung 6: Kontrolle der Translation über das CPEB (Mendez und Richter, 2001).....	30
Abbildung 7: Schema zur polySia-Expression auf den Neuronen im Zebrafischembryo ..	32
Abbildung 8: PolySia-Expression nach CPE-Blockade der <i>st8sia2</i> -mRNA	32
Abbildung 9: Ncam1a- und Ncam1b-Expression in WT-Zebrafischembryonen (11-12 hpf)	57
Abbildung 10: Ncam1a- und Ncam1b-Expression im WT-Zebrafischembryo (17 hpf).....	58
Abbildung 11: Ncam1a- und Ncam1b-Expression im WT-Zebrafischembryo (24 hpf).....	59
Abbildung 12: Ncam1a- und Ncam1b-Expression in WT-Zebrafischembryonen (36 hpf) .	61
Abbildung 13: Ncam1a- und Ncam1b-Expression auf dem Seitenliniennerv.....	62
Abbildung 14: Ncam1b-Expression auf dem Primordium des Seitenlinienorgans	63
Abbildung 15: Ncam2 (OCAM)-Expression in WT-Zebrafischembryonen	64
Abbildung 16: Spezifische Inhibition der Proteinexpression durch die Morpholinos gegen <i>ncam1a</i> bzw. <i>ncam1b</i>	66
Abbildung 17: Überlebensstatistik der Zebrafischembryonen	68
Abbildung 18: PolySia, eine posttranslationale Modifikation von Ncam1a und Ncam1b...	69
Abbildung 19: Schema der EndoN-GFP Reaktion	71
Abbildung 20: Quantifizierung der polySia-Expression in verschiedenen Bereichen des Zebrafisch-Nervensystems (36 hpf)	72
Abbildung 21: Keine Kolokalisation von Ncam2 mit polySia	75
Abbildung 22: Komplementäre Expression von Ncam1a und Ncam1b im Bereich der posterioren Kommissur	79
Abbildung 23: Ncam1a, Ncam1b und polySia beeinflussen die Ausbildung der posterioren Kommissur (pK)	81

Abbildung 24: Verändertes Wachstumsmuster der spinalen Motoraxone nach <i>ncam1b</i> -Knockdown.....	84
Abbildung 25: Veränderungen an den Motoraxonen nach <i>ncam1b</i> -Knockdown.....	86
Abbildung 26: Ganglion des posterioren Seitenliniennervs und N. vagus in den <i>ncam1b</i> -Knockdownembryonen verändert	87
Abbildung 27: Defaszikulierung der Cranialnerven V und VII in den Knockdownembryonen	88
Abbildung 28: Bogenförmiges Schwimmverhalten der <i>ncam1b</i> -Knockdown-Embryonen .	90
Abbildung 29: Einseitig stark reduziertes Ganglion führt zu verändertem Schwimmverhalten nach <i>ncam1b</i> -Knockdown	91
Abbildung 30: Reduzierte „Stabilität“ entlang des Rückenmarks nach <i>ncam1b</i> -Knockdown	93
Abbildung 31: CPE-Sequenz der <i>st8sia2</i> -mRNA blockiert Translation	95
Abbildung 32: Evolutionsbedingte Verwandtschaftsbeziehungen der homologen <i>NCAM</i> -Genfamilie	100
Abbildung 33: Schema zur Verteilung von polySia-Ncam1a und polySia-Ncam1b im Bereich der posterioren Kommissur.....	108

Tabelle 1: Ncam-Proteinomenklatur:	24
Tabelle 2: Chemikalienverzeichnis	35
Tabelle 3: Primärantikörper	41
Tabelle 4: Sekundärantikörper.....	42
Tabelle 5: Protokoll zur Immunfärbung	48
Tabelle 6: Permeabilisierungszeiten in Aceton	49
Tabelle 7: Morpholino-Auflistung	50
Tabelle 8: Primer für die Rescue-Experimente	52
Tabelle 9: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	54
Tabelle 10: PolySia-Verteilung im Wildtyp-Zebrafischembryo (36 hpf).....	74

1 Zusammenfassung

Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie vermitteln und modulieren die Interaktion zwischen Zellen auf vielfältige Weise. Ein Mitglied dieser Proteinfamilie ist das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM1. Es ist durch eine charakteristische posttranslationale Modifikation gekennzeichnet, die Anheftung des langkettigen Polysaccharids Polysialinsäure (polySia). PolySia-NCAM1 ist an der Entwicklung des Nervensystems einschließlich der Steuerung des Wachstumsmusters und der Faszikulierung von Axonen beteiligt. Phylogenetische Analysen zeigen, dass die Genomduplikation während der Evolution der Teleostier zur Duplikation des *ncam1*-Gens geführt hat. Tetrapoden hingegen exprimieren nur ein *ncam1*-Gen. Die Funktion von Ncam1a, Ncam1b und Polysialinsäure im Nervensystem des Zebrafisches, bilden den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Nach der Genduplikation ist es zu einer funktionellen Diversifizierung von *ncam1a* und *ncam1b* gekommen. Das zeigt sich unter anderem in ihren Expressionmustern, die nur partiell überlappen. Gemeinsam ist Ncam1a und Ncam1b jedoch die Modifikation durch Anheftung von Polysialinsäure. PolySia-Ncam1a wird hauptsächlich im rostralen Bereich des Embryos exprimiert während polySia-Ncam1b im caudalen Bereich überwiegt. Ncam1a, Ncam1b und ihre polySia-Modifikation regulieren die Ausbildung von Axontrakten im Zebrafisch-Embryo auf unterschiedliche Weise. So erfordert das Auswachsen der posterioren Kommissur, eines prominenten Axontrakts an der Vorderhirn/Mittelhirn-Grenze, die Expression von Ncam1b auf den Zellkörpern des dorsalen Diencephalons. Die Faszikulierung der Axone ist von polySia-Ncam1a auf den Axonen abhängig. Desweiteren ist die korrekte Expression von Ncam1b notwendig für das Wachstum cranialer und spinaler Motoraxone. Das zeigt, dass es nicht nur zwischen Ncam1a und Ncam1b zu einer funktionellen Differenzierung gekommen ist, sondern dass beide Paraloge darüber hinaus verschiedene Funktionen bei der Bildung unterschiedlicher Axontrakte ausüben können.

Ncam2, ein weiteres Mitglied der *ncam*-Genfamilie, liegt bei Teleostiern, wie bei Tetrapoden, in nur einer Genkopie vor. Ncam2 wird im Zebrafisch erst exprimiert, nachdem alle wichtigen Axontrakte bereits ausgebildet sind, und ist nicht polysialiert.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Genduplikation bei Teleostiern eine Grundlage für die Subfunktionalisierung von Genen bildet. Diese Differenzierung wird in unterschiedlichen Expressionsmustern und unterschiedlichen Funktionen der Genprodukte sichtbar.

2 Einleitung

Die kontrollierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung des Nervensystems (Rutishauser und Jessell, 1988, Shapiro et al., 2007, Suzuki und Takeichi, 2008). Zelladhäsionsmoleküle regulieren Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte und ermöglichen dadurch die Bildung zusammenhängender Zellverbände (Gewebe) (Probstmeier et al., 1989, Acheson et al., 1991, Vleminckx und Kemler, 1999, Kasper et al., 2000, Thiery, 2003, Seidenfaden et al., 2006). Für die Funktion des Nervensystems ist es jedoch wichtig, nicht nur Zellverbindungen aufzubauen, sondern diese je nach Bedarf auch zu modulieren (Smith et al., 1993, Dityatev et al., 2008, Muhlenhoff et al., 2009). Dies ist insbesondere während der Entwicklung des Nervensystems, aber auch für die Plastizität des adulten Gehirns von Bedeutung und wird unter anderem über die Modifikation der Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche erreicht (Mayford et al., 1992, Fambrough und Goodman, 1996, Gascon et al., 2007, Eckhardt et al., 2000). Zelladhäsionsmoleküle können posttranslational modifiziert werden oder ihre Anzahl bzw. Zusammenstellung auf der Zelloberfläche kann im Verlauf der Entwicklung verändert werden (Sadoul et al., 1983, Chuong und Edelman, 1984b, Rougon et al., 1990, Fambrough und Goodman, 1996, Mayford et al., 1992). Mitglieder verschiedener Familien von Zelladhäsionsmolekülen werden auf Nervenzellen exprimiert: Cadherine, Integrine, Neurexine, Neuroligine und Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (Milner und Campbell, 2002, Shapiro et al., 2007, Craig und Kang, 2007, Suzuki und Takeichi, 2008). In dieser Studie wurden Zelladhäsionsmoleküle der NCAM („neural cell adhesion molecule“)-Familie im Nervensystem des Zebrafischembryos untersucht. Die Mitglieder der NCAM-Familie gehören zur Immunglobulin-Superfamilie (Cunningham et al., 1987, Mizuno et al., 2001, Maness und Schachner, 2007).

Zunächst gehe ich auf die Vertreter der NCAM-Familie bei Säugetieren etc. ein, bis ich mich auf die speziellen Funktionen im Zebrafisch beziehe. Vertreter der NCAM-Familie bei Säugetieren sind NCAM1, auch NCAM genannt, und NCAM2, auch OCAM („olfactory cell adhesion molecule“) genannt, da es im olfaktorischen System exprimiert wird (Cremer et al., 1994, Paoloni-Giacobino et al., 1997, Yoshihara et al., 1997).

2.1 Das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM1

NCAM1 ist das erste Zelladhäsionsmolekül, das bei Säugetieren gefunden wurde. Es wurde erstmals 1974 aus dem Gehirn von Ratten isoliert und als synaptisches Membranprotein bezeichnet (Jorgensen und Bock, 1974). Drei Jahre später wurde es, präpariert aus Hühnerretina, als Zelladhäsionsmolekül identifiziert (Thiery et al., 1977). G.M.Edelman und Kollegen untersuchten in den 80iger Jahren den Aufbau von NCAM1 und ordneten es aufgrund der Immunglobulin(Ig)-Domänen der Immunglobulin-Superfamilie zu (Edelman, 1983, Chuong und Edelman, 1984b, Cunningham et al., 1987).

2.1.1 NCAM1: Aufbau und Vorkommen

NCAM1 ist ein transmembranes Protein, das aus fünf Ig-Domänen und zwei Fibronektin(TypIII)-Domänen auf der extrazellulären Seite, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne besteht (siehe Abbildung 1) (Cunningham et al., 1987, Brümmendorf und Rathjen, 1993, Chothia und Jones, 1997). Durch alternatives Spleißen kommt NCAM1 bei Säugetieren in verschiedenen Isoformen vor (Murray et al., 1986, Gower et al., 1988, Thompson et al., 1989, Fields und Itoh, 1996).

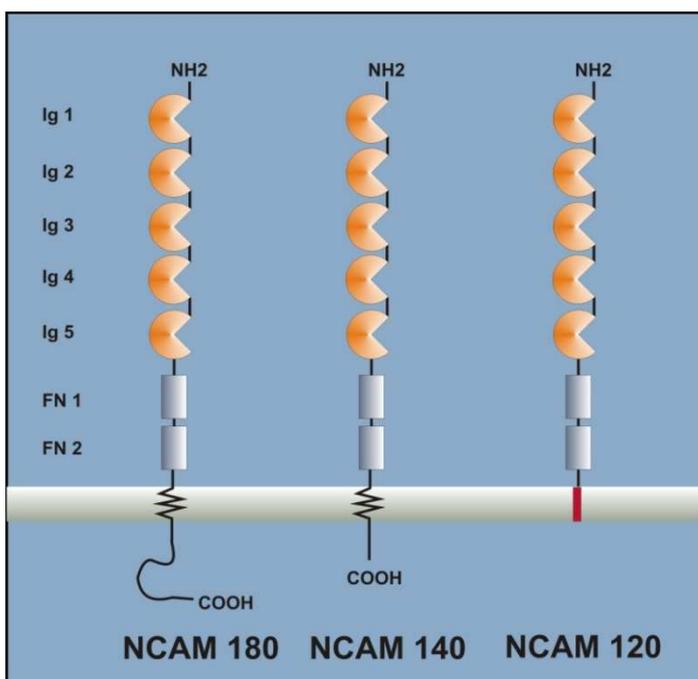


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der NCAM1-Isoformen in der Maus, nach Fields und Itoh, 1996

Durch alternatives Spleißen der *ncam1*-mRNA kommt es zur Expression von verschiedenen Isoformen von NCAM1 in der Maus. Die Isoformen werden nach ihrem Molekulargewicht NCAM180, NCAM140 und NCAM120 genannt. Alle drei Isoformen bestehen aus 5 Ig-Domänen (Ig 1-5) und 2 Fibronektin(FN)-TypIII-Domänen auf der extrazellulären Seite. NCAM180 und NCAM140 besitzen eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne, während NCAM120 über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden ist.

Die Hauptisoformen von NCAM1 aus der Maus sind in Abbildung 1 gezeigt:

- 180 kDa (mit langer cytoplasmatischer Domäne),
- 140 kDa (mit kurzer cytoplasmatischer Domäne),
- 120 kDa (mit GPI-Verankerung) (Fields und Itoh, 1996).

Expriert wird NCAM1 von Neuronen, Glia- und Muskelzellen in adulten und embryonalen Vertebraten (Grumet et al., 1982, Noble et al., 1985, Covault und Sanes, 1985, Akeson et al., 1988, Palser et al., 2009, Theodosis et al., 2000, Hall und Rutishauser, 1985). Bei Insekten, Mollusken und Nematoden findet man NCAM1-ähnliche Moleküle (Hall und Rutishauser, 1985). Fasciclin II ist das NCAM1-Ortholog in *Drosophila melanogaster*, ApCAM in *Aplysia californica* und LeechCAM in *Hirudo medicinalis* (Mayford et al., 1992, Huang et al., 1997, Mao und Freeman, 2009).

2.1.2 NCAM1-Interaktionen

NCAM1 vermittelt Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktionen über homophile oder heterophile Bindungen (Probstmeier et al., 1989, Acheson et al., 1991, Kasper et al., 2000). Die homophile Interaktion der NCAM1-Moleküle erfolgt sowohl in *cis* als auch in *trans* (Kiselyov et al., 2005). Welche Ig-Domänen dabei beteiligt sind und in welcher Weise sie interagieren, wurde schon mit vielen verschiedenen Methoden untersucht, wird aber immer noch kontrovers diskutiert (Atkins et al., 1999, Atkins et al., 2001, Soroka et al., 2003, Atkins et al., 2004, Johnson et al., 2004). Bei einer *cis*-Interaktion sind vermutlich nur die ersten beiden Ig-Domänen involviert, dabei sind die NCAM1-Moleküle parallel angeordnet sind (Kasper et al., 2000, Kiselyov et al., 2005). Bei einer *trans*-Interaktion der NCAM1-Moleküle wird eine reißverschlußartige Formation angenommen (Soroka et al., 2003).

Viele heterophile Interaktionen von NCAM1, in *cis* und *trans*, wurden bisher beschrieben. Einige der Bindungspartner sind:

- „Fibroblast growth factor“ (FGF)-Rezeptor 1 (Williams et al., 1994, Kiselyov et al., 2005),
- „glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF) und GDNF-Rezeptor alpha (Paratcha et al., 2003),
- „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) (Vutskits et al., 2001),

- „platelet-derived growth factor“ (PDGF) (Zhang et al., 2004),
- das Zelladhäsionsmolekül L1 (Kadmon et al., 1990, Horstkorte et al., 1993),
- das transiente axonale Glykoprotein TAG-1/axonin-1 (Milev et al., 1996),
- die, für das Nervensystem typischen Chondroitin-Sulfat-Proteoglycane Neurocan (Friedlander et al., 1994) und Phosphocan (Milev et al., 1994),
- das Heparan-Sulfat-Proteoglycan: Agrin (Storms et al., 1996)...

Für die heterophilen Bindungen sind unterschiedliche Domänen von NCAM1 notwendig. Über seine extrazellulären Fibronectin-Domänen geht NCAM1 eine heterophile Bindung z.B. mit dem „Fibroblast growth factor“(FGF)-Rezeptor ein und beeinflusst dadurch das Wachstum von Neuriten (Kiselyov et al., 2003, Anderson et al., 2005, Carafoli et al., 2008, Kochoyan et al., 2008). Über die cytoplasmatische Domäne interagiert NCAM1 (Isoform 140 kDa und 180 kDa) mit Proteinen des Zellzytoskeletts, α - und β -Tubulin und α -Actinin1 (Büttner et al., 2003). Die cytoplasmatische Domäne der Isoform NCAM180 bindet weitere intrazelluläre Zytoskelett- oder Zytoskelett-assoziierte Proteine, wie z.B. β -Aktin, Tropomyosin, MAP1A (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1A) und RhoA-bindende Kinase α (Büttner et al., 2003). Ebenso kann NCAM1 mit seiner extrazellulären Domäne Bindungen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix eingehen, wie z.B. mit Heparan- und Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen (Cole und Glaser, 1986, Cole et al., 1986, Friedlander et al., 1994, Milev et al., 1994, Kiselyov et al., 1997).

2.1.3 PolySia, eine posttranslationale Modifikation von NCAM1

NCAM1 kann posttranslational mit einer Polysialinsäurekette (polySia) modifiziert werden (Finne et al., 1983, Cremer et al., 1994, Hildebrandt et al., 2010, Angata et al., 1998). PolySia ist ein negativ geladenes, lineares Homopolymer aus α -2,8-verbundenen N-Acetylneuraminsäure-Bausteinen (Finne, 1982). PolySia liegt bei Säugetieren fast ausschließlich gebunden an das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM1) vor. Dies konnte durch die nahezu komplette Abwesenheit von polySia bei NCAM1-Knockout-Mäusen bestätigt werden (Cremer et al., 1994). Neben polySia-NCAM1 gibt es noch sieben weitere polysialylierte Glykoproteine in verschiedenen Organismen zu finden:

- CD36, gefunden in menschlicher Muttermilch (Yabe et al., 2003),
- Neuropilin-2 auf menschlichen dendritischen Zellen (Curreli et al., 2007),

- alpha-Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals in der Ratte (Zuber et al., 1992),
- die Polysialyltransferasen St8Sia2 und St8Sia4 (Autopolysialylierung) bei Säugetieren (Mühlenhoff et al., 1996, Close und Colley, 1998),
- das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM1 in der Maus (Galuska et al., 2010).

Bei Invertebraten tritt polySia insbesondere während der Entwicklung auf (Roth et al., 1992, Kitazume et al., 1994, Malykh et al., 1999, Seppo und Tiemeyer, 2000). Manche Bakterien, wie z.B. *E.coli* K1 und Meningokokken (Gruppe B) besitzen polySia in der Kapsel (Frosch et al., 1985). Gegen das polySia-Epitop auf *E.coli* K1 und Meningokokken (Gruppe B) wurde, der in dieser Arbeit verwendete Antikörper gegen polySia hergestellt (Frosch et al., 1985).

Die Polysialylierung von NCAM1 beginnt mit der sogenannten „Core“-Glykosylierung, einer N-Glykosylierung an den Aminosäuren Asparaginsäure(Asn)-449 (bzw. Asn5) und Asn-478 (Asn6) der fünften Ig-Domäne von NCAM1 (Finne, 1982, Nelson et al., 1995, Foley et al., 2010). Anschließend werden im Golgi-Apparat bis zu 400 N-Acetyl-

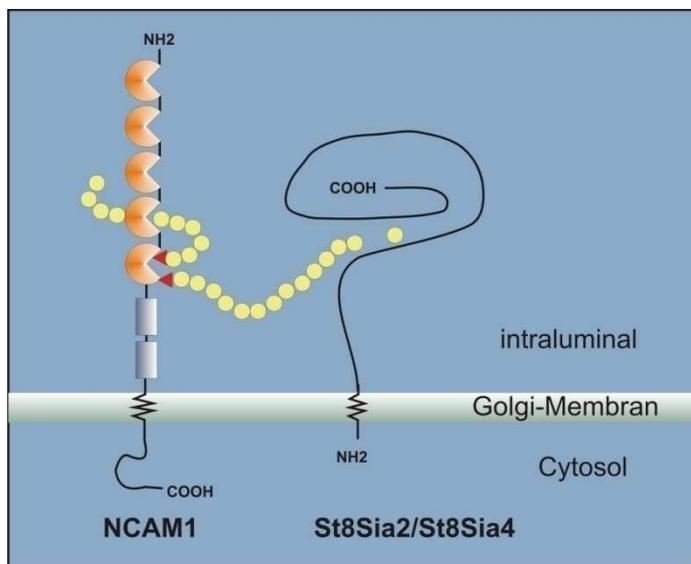


Abbildung 2: Schema zur Polysialylierung von NCAM1

Die Enzyme zur Polysialylierung von NCAM1, St8Sia2 (STX) und St8Sia4 (PST), sitzen in der Membran vom Golgi-Apparat, wobei sich die katalytische Domäne intraluminal befindet (Angata and Fukuda, 2003). NCAM1 wird an 2 Asparaginsäureresten der Ig5-Domäne polysialyliert (Nelson et al., 1995).

Neuraminsäure („Sialinsäure“)-Bausteine an die Ig5-Domäne gebunden (Schema siehe Abbildung 2) (Troy, 1992, Angata und Fukuda, 2003, Nakata und Troy, 2005). Die Synthese der polySia-Kette übernehmen Polysialyltransferasen des St8Sia-Typs: St8Sia2 (STX) und St8Sia4 (PST), die in der Membran des Golgi-Apparates lokalisiert sind (Abbildung 2) (Angata et al., 1998, Nakayama et al., 1998, Ong et al., 1998, Angata und Fukuda, 2003). Polysialyltransferasen besitzen eine TypII-Membranprotein-Topologie (Angata und Fukuda,

2003). Ein kurzes cytoplasmatisches Segment ist verbunden mit einer Transmembrandomäne, gefolgt von einer großen intralumenalen Domäne, die sich in eine Stammregion und eine katalytische Domäne unterteilen lässt (Schema in Abbildung 2) (Angata und Fukuda, 2003). Die katalytische Domäne ist in die Bindung von NCAM1 und die Bindung der Sialinsäurebausteine involviert (Datta und Paulson, 1995, Datta et al., 1998). Für die Interaktion der Polysialyltransferasen mit NCAM1 in der Golgi-Membran ist die Fibronectin1(FN1)-Domäne von NCAM1 essentiell (Mendiratta et al., 2005). Eine Deletion der FN1 eliminiert die N-Glykan-Polysialylierung der Ig5-Domäne (Mendiratta et al., 2005). Insbesondere die in der FN1-Domäne enthaltene α -Helix und die Aminosäuregruppe QVQ (Glutamin-Valin-Glutamin) sind wichtig für die Positionierung der Polysialyltransferasen (Close et al., 2003, Mendiratta et al., 2006, Foley et al., 2010).

2.1.4 Funktion von NCAM1 und deren Modulation durch polySia

Viele Vorgänge im Nervensystem, wie z.B. Differenzierung, Migration, das Überleben von Nervenzellen, neuronale Plastizität (Lernprozesse), Regeneration von peripheren Nerven und das Auswachsen von Neuriten werden durch polySia-NCAM1 beeinflusst (Cremer et al., 1994, Vutskits et al., 2001, Prag et al., 2002, Seidenfaden et al., 2006, Gascon et al., 2007, Rutishauser, 2008, Jungnickel et al., 2009, Kleene et al., 2010, Kochlamazashvili et al., 2010, Gascon et al., 2010). Während der Entwicklung des Nervensystems liegt NCAM1 polysialyliert vor (Rothbard et al., 1982, Chuong und Edelman, 1984a, Mühlhoff et al., 2009). Im adulten Gehirn hingegen ist NCAM1 meist nicht polysialyliert (Seki und Arai, 1993, Bonfanti und Theodosis, 1994, Rousselot et al., 1995, Burgess et al., 2008). Ausnahmen dazu bilden Hirnareale, die auch im adulten Tier mit Plastizität und Neurogenese verbunden werden, wie z.B. der Hippocampus, der Hypothalamus und der *bulbus olfactorius* (Theodosis et al., 1991, Seki und Arai, 1993, Burgess et al., 2008, Röckle et al., 2008, Rutishauser, 2008).

PolySia moduliert die adhäsiven Eigenschaften von NCAM1 (Johnson et al., 2005, Mühlhoff et al., 2009, Eggers et al., 2011). Die homophile Bindung von NCAM1 wird durch die negative Ladung und die sterischen Eigenschaften der Polysialinsäure abgeschwächt (siehe Schema in Abbildung 3). Beeinflusst wird dadurch die Faszikulation von Axonen, wie z.B. bei den Motoraxonen im Huhn (Tang et al., 1992, Tang et al., 1994) oder bei den Axonen der posterioren Kommissur im Zebrafisch (Marx et al., 2001). Durch

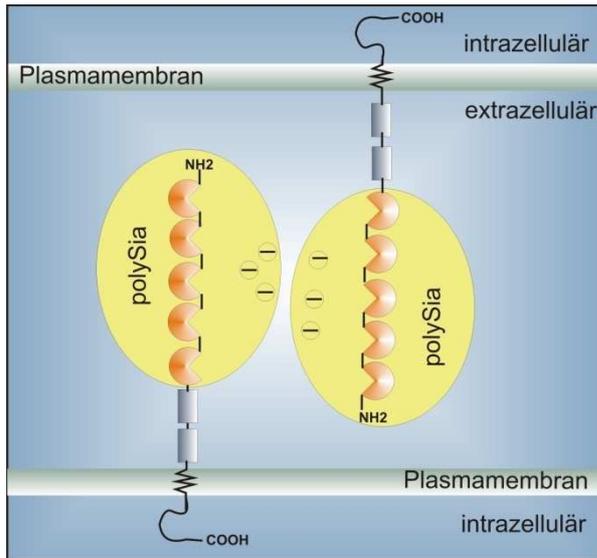


Abbildung 3: PolySia moduliert homophile Interaktionen von NCAM1 (Schema)

Aufgrund der negativen Ladung und der Hydratisierung von polySia reduziert sich die homophile Interaktion von polysialylierten NCAM1-Molekülen (Johnson et al., 2005). Die Abstoßung zwischen den Zellen vergrößert sich und die Zelladhäsion wird reduziert (Johnson et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass der Abstand zwischen den Zellen durch polySia um 10-15 nm vergrößert wird (Yang et al., 1992, Yang et al., 1994).

Hippocampus ist stark verändert und führt zu ektopischer Innervation von Cornu Ammonis Region3(CA3)-Pyramidenzellen (Cremer et al., 1998). Die wiederholte Stimulation von Glutamat-abhängigen-Synapsen im Gehirn der Knockout-Mäuse, zeigt eine Reduktion der Langzeit-Synapsenstabilisierung und damit des Langzeit-Gedächtnisses (Cremer et al., 1998). Die Defizite des Langzeitgedächtnisses in NCAM1-Knockout-Mäusen können durch die Applikation von BDNF („brain derived neurotrophic factor“) aufgehoben werden (Muller et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass polysialyliertes NCAM1 direkt an BDNF bindet und dadurch Neurone gegenüber BDNF sensitiviert (Muller et al., 2000). Dadurch werden die Modulation der synaptischen Plastizität, wie auch die Differenzierung und das Überleben von Neuronen im Cortex beeinflusst (Muller et al., 2000, Vutskits et al., 2001). Der olfaktorische Bulbus der Knockout-Mäuse ist verkleinert, da die Migration der Neuroblasten, die entlang des sogenannten „rostral migratory stream“ (RMS) zum olfaktorischen Bulbus wandern, gestört ist (Tomasiewicz et al., 1993, Cremer et al., 1994). Normalerweise exprimieren die Neuroblasten polySia-NCAM1, das für die Migration, das Überleben und die Kontrolle der Differenzierung dieser Zellen notwendig ist (Cremer et al., 1994, Rousselot et al., 1995, Battista und Rutishauser, 2010, Röckle et al., 2008).

die Entfernung von polySia mit Endoneuraminidase (EndoN; eine spezifische Glykosidase für polySia) kommt es zu Projektionsfehlern der Motoraxone im Flügel des Huhns bzw. zur Aufspaltung der posterioren Kommissur in mehrere Axonfaszikel im Zebrafisch (Tang et al., 1992, Marx et al., 2001).

Die Funktion von polysia-NCAM1 bei Säugetieren konnte mit Hilfe der NCAM1-Knockout-Maus untersucht werden (Cremer et al., 1994). Diese Mäuse zeigen keine Defizite in der Motorik (Cremer et al., 1994). Sie besitzen aber einen verkleinerten *bulbus olfactorius* und zeigen aufgrund einer Dysfunktion im Hippocampus Defizite beim Lernen (Cremer et al., 1994). Die Faszikulation und das Wachstum der „mossy fibers“ im

Wird polySia durch EndoN-Injektion entfernt, stoppen die Neuroblasten ihre Wanderung bzw. migrieren ins umliegende Gewebe und differenzieren frühzeitig (Ono et al., 1994, Hu, 2000, Battista und Rutishauser, 2010). Die Tatsache, dass durch die Entfernung von polySia der selbe Phänotyp wie in den NCAM1-Knockout-Mäusen hervorgerufen wird, lässt darauf schließen, dass polySia wichtig für die Entwicklung des olfaktorischen Bulbus und die Plastizität des Gehirns ist (Rutishauser und Landmesser, 1996, Theodosis et al., 1999, Becker et al., 1996).

Um die Funktion der Polysialinsäure von der Funktion des Zelladhäsionsmoleküls NCAM1 unterscheiden zu können, wurden zunächst die cDNAs von Polysialyltransferasen verschiedener Spezies kloniert und deren Expression untersucht (Nakayama et al., 1995, Yoshida et al., 1995, Eckhardt et al., 1995, Wood et al., 1997, Kudo et al., 1998). Bei Säugetieren wurden zwei Polysialyltransferasen gefunden, die für die Bildung von polySia an NCAM1 notwendig sind: St8Sia2 und St8Sia4 (Angata et al., 1998, Nakayama et al., 1998). St8Sia2 ist während der embryonalen, perinatalen und frühen postnatalen Entwicklung für die polySia-Expression verantwortlich, während St8Sia4 die vorherrschende Polysialyltransferase im postnatalen und adulten Gehirn ist (Ong et al., 1998, Hildebrandt et al., 1998b). Der Doppel-Knockout der Polysialyltransferasen St8Sia2 und St8Sia4 führt bei der Maus zu einem schwerwiegenden Phänotyp mit vorzeitigem Tod der Tiere (Weinhold et al., 2005). Die Mäuse sind postnatal wachstumsverzögert, entwickeln einen progressiven Hydrocephalus, die Bewegungskoordination ist gestört, der *bulbus olfactorius* ist verkleinert und sie besitzen keine anteriore Kommissur (Weinhold et al., 2005, Hildebrandt et al., 2009). Eine Aufhebung dieses Phänotyps ist durch einen zusätzlichen Knockout von NCAM1 möglich. Dies zeigt, dass die Hauptfunktion der Polysialyltransferasen St8Sia2 und St8Sia4 bei der Maus die Modifikation von NCAM1 ist (Weinhold et al., 2005).

Eine neuere Studie zur Funktion von polySia zeigt, dass die Gehirnveränderungen an der anterioren Kommissur, dem *corpus callosum* und der internen Kapsel durch das Expressionslevel von nicht polysialyliertem NCAM1 während der Entwicklung bestimmt wird (Hildebrandt et al., 2009). Je mehr nicht-polysialyliertes NCAM1 während der Entwicklung vorliegt, desto größer sind die Veränderungen (Hildebrandt et al., 2009). Die Auffälligkeiten im Gehirn der Mäuse erinnern an die Veränderungen im Gehirn von schizophrenen Patienten (Hildebrandt et al., 2009). Möglicherweise führt eine Störung in der Koordination der NCAM1-Polysialylierung zu einer Prädisposition für Schizophrenie (Vawter, 2000, Hildebrandt et al., 2009). Das Expressionslevel von polySia-NCAM1 ist

auch im Gehirn von Patienten mit einer bipolaren Störung oder bei depressiven Patienten verändert (Varea et al., 2011).

Das polySia-NCAM1-Expressionslevel wird auch im Verlauf von Tumorerkrankungen einschließlich Neuroblastoma, Glioma, Lungentumore, Wilms´ Tumor, Schilddrüsen- und Eierstockepithelkarzinom verändert (Roth et al., 1988, Scheidegger et al., 1994, Hildebrandt et al., 1998a, Tanaka et al., 2001, Suzuki et al., 2005, Yang et al., 2011, Zecchini et al., 2011). Das Expressionslevel von polySia- wie auch der Polysialyltransferase *st8sia2* dient daher als prognostischer Marker bei den genannten Tumorarten (Seidenfaden et al., 2003, Cheung et al., 2006, Roth et al., 1988, Scheidegger et al., 1994, Tanaka et al., 2000). Eine hohe polySia-Konzentration korreliert meist mit einer schlechten Prognose, da polySia bzw. polySia-NCAM1 die Zelladhäsion reduziert und damit die Migrationsfähigkeit der Tumorzellen steigert (Roth et al., 1988, Scheidegger et al., 1994, Suzuki et al., 2005, Schreiber et al., 2008). Patienten mit polySia-NCAM1-positivem Neuroblastoma haben häufig Metastasen und die polySia-NCAM1 Expression korreliert mit einer fortgeschrittenen Erkrankung (Korja et al., 2009). Das Fehlen einer polySia-NCAM1 Expression im fortgeschrittenen Stadium scheint dagegen ein sehr ungünstiger Faktor für das Überleben der Patienten zu sein (Korja et al., 2009). Wodurch dies bedingt ist bleibt bisher unklar (Korja et al., 2009).

Im Bereich der medizinischen Forschung wird ebenfalls untersucht, ob polySia die Regeneration von verletzten Nerven erleichtert, da es während der Entwicklung des Nervensystems an dynamischen Prozessen wie Zellmigration und Synapsenbildung beteiligt ist (Kleene und Schachner, 2004, Rutishauser, 2008). Nach einer Verletzung von peripheren Nerven adulter Nagetiere wird die polySia-Expression in Neuronen, Schwann-Zellen und Skelettmuskelzellen hochreguliert (Carratù et al., 1993, Olsen et al., 1995, Mehanna et al., 2009). Versuche mit Substanzen, die polySia imitieren oder mit Kolominsäure, einem Homopolymer aus α -2-8 verknüpfter N-acetyl-Neuraminsäure, zeigten eine verbesserte Regeneration von peripheren Nerven durch die Anwesenheit von polySia (Mehanna et al., 2009, Jungnickel et al., 2009). Viral-induzierte polySia-Expression im Bereich von Nervenverletzungen führt zu einem verbesserten Wachstum der Nerven in den Verletzungsbereichen (Zhang et al., 2007, Mehanna et al., 2009). Desweiteren werden polySia-beschichtete Netze bzw. Transplantate zur Regeneration von peripheren Nerven hergestellt (Assmann et al., 2010, Haastert-Talini et al., 2010). In Zukunft könnten sich daraus Methoden zur Behandlung von peripheren Nervenverletzungen oder bei Querschnittslähmungen ergeben (Zhang et al., 2007, Mehanna et al., 2009).

Epithels (OE) exprimiert, die in den ventrolateralen Teil (Zone II-IV, türkis-blau) des olfaktorischen Bulbus (OB) projizieren und dort Synapsen mit sogenannten M/T(“mitral/tufted”)-Zellen bilden (siehe Abbildung 4) (Mori und Yoshihara, 1995, Treloar et al., 2003). Eine vorübergehende Expression von NCAM2 zeigt sich auch auf M/T-Zellen im dorsalen Bereich des olfaktorischen Bulbus (Treloar et al., 2003). Die Expression von NCAM2 ist asymmetrisch (Treloar et al., 2003). NCAM2-positive Axone des olfaktorischen Epithels bilden Synapsen mit NCAM2-negativen Dendriten von M/T-Zellen und NCAM2-negative Axone des OEs bilden Synapsen mit NCAM2-exprimierenden M/T-Zellen (Treloar et al., 2003). Eine ähnliche komplementäre Expression findet man im akzessorischen olfaktorischen System (Campenhausen et al. 1997). NCAM2 wird im akzessorischen olfaktorischen System auf Axonen von Vomeronasal-Neuronen exprimiert, die im apikalen Bereich des Epithels sitzen und in den rostralen Teil des akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB) projizieren, deren M/T-Zellen kein NCAM2 exprimieren (Campenhausen et al., 1997)(Yoshihara et al., 1997). Im Gegensatz dazu, bilden NCAM2-negative vomeronasale Axone im basalen Teil des vomeronasalen Epithels (VNE) Synapsen mit NCAM2-positiven M/T-Zellen in der caudalen Region des AOBs (Campenhausen et al., 1997).

2.2.2 Funktion von NCAM2

Die Funktion von NCAM2 konnte mit Hilfe der NCAM2-Knockout-Maus bestimmt werden (Walz et al., 2006). Entgegen der Meinung, dass NCAM2 für die topographische Projektion der Neurone des olfaktorischen Epithels zum olfaktorischen Bulbus verantwortlich sein könnte, zeigte sich keine Veränderung dieser Projektion in der NCAM2-Knockout-Maus (Walz et al., 2006). Es konnte sogar eine Verbesserung der Projektionen und damit des Geruchssinns bei den Knockout-Mäusen beobachtet werden (Walz et al., 2006). Veränderungen zeigten sich in der Strukturierung der Dendriten und Axone innerhalb der einzelnen Glomeruli des olfaktorischen Bulbus, d.h. NCAM2 ist für die Organisation der Synapsen innerhalb der Glomeruli notwendig (Walz et al., 2006). Die Kompartimentierung der Glomeruli ist wichtig für die Verarbeitung von olfaktorischen Informationen (Borisovska et al., 2011). In NCAM2-Knockout-Mäusen zeigt sich eine reduzierte Synchronität neuronaler Aktivität von M/T-Zellen innerhalb eines Glomerulus (Borisovska et al., 2011).

NCAM2 wird in der Maus nicht polysialyliert (Yoshihara et al., 1997). NCAM1 enthält im Gegensatz zu NCAM2 in seiner Fibronectin1(FN1)-Domäne eine α -Helix und die Aminosäureabfolge QVQ, die wichtig für die Positionierung der Polysialyltransferasen ist (Mendiratta et al., 2005, Mendiratta et al., 2006). Genauere Untersuchungen, weshalb NCAM2 nicht wie NCAM1 polysialyliert wird, wurden mit Hilfe von chimären Proteinen untersucht (Foley et al., 2010). Ein Austausch der FN1-Domäne zwischen NCAM2 und NCAM1 zeigte, dass die FN1-Domäne von NCAM2 die Polysialylierung nicht unterbindet (Foley et al., 2010). Es konnte aber eine Reduktion der Polysialylierung um 50 % gegenüber dem Wildtyp-NCAM1 beobachtet werden (Foley et al., 2010). Dies läßt darauf schließen, dass die FN1-Domäne von NCAM1 eine bessere Bindung der Polysialyltransferasen ermöglicht (Foley et al., 2010). Der genaue Mechanismus der dazu führt, dass NCAM2 im Gegensatz zu NCAM1 nicht polysialyliert wird ist unklar.

2.3 Die NCAM-Familie im Zebrafischembryo

2.3.1 Duplikation der *ncam*-Gene im Zebrafisch

Drei verschiedene Gene, die zur *ncam*-Familie gehören, wurden im Zebrafischgenom gefunden (Mizuno et al., 2001). Bei der Sequenzanalyse stellte sich heraus, dass zwei dieser Gene den Mausehomologen *NCAM1* (früher: *NCAM*) bzw. *NCAM2* (früher: *OCAM*) ähneln (Mizuno et al., 2001). Die Aminosäuresequenz stimmt zu 62,4 % (*NCAM1/zNCAM*) bzw. 61.6 % (*NCAM2/zOCAM*) mit den Proteinen in der Maus überein (Mizuno et al., 2001). Das dritte gefundene Protein wurde in alphabetischer Reihenfolge „zPCAM“ genannt, wobei „z“ für Zebrafisch steht (Mizuno et al., 2001).

Die Nomenklatur wurde in dieser Dissertation gemäß der Festlegung des Komitees für die Zebrafisch-Nomenklatur angepaßt. Gennamen werden klein und kursiv geschrieben. Duplizierte Gene werden mit a bzw. b zusätzlich markiert. Bei Proteinen wird der erste Buchstabe groß geschrieben und die restlichen Buchstaben klein (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: NCAM-Proteinnomenklatur:

Zebrafisch-Nomenklatur alt:	Zebrafisch-Nomenklatur neu:	Maus-Nomenklatur:
zNCAM	Ncam1a	NCAM bzw. NCAM1
zPCAM	Ncam1b	/
zOCAM	Ncam2	OCAM bzw. NCAM2

2.3.2 Aufbau der Vertreter der NCAM-Familie im Zebrafisch

Ncam1a, Ncam1b und Ncam2 sind Transmembranproteine und bestehen aus fünf Ig-Domänen und zwei Fibronektin(TypIII)-Domänen auf der extrazellulären Seite und einer unterschiedlich langen intrazellulären Domäne (Schema siehe Abbildung 5) (Edelman und Crossin, 1991, Mizuno et al., 2001). Wie im NCAM1-Protein der Ratte kann auch in Ncam1a und Ncam1b ein sogenanntes VASE („variable alternatively spliced exon“) im Bereich der Ig4-Domäne durch alternatives Splicen eingefügt werden (Small et al., 1988, Mizuno et al., 2001). Ncam1b besitzt sogar 2 verschieden lange VASE-Exons mit einer Länge von 30 bzw. 54 Basenpaaren (bp) (Mizuno et al., 2001). Möglicherweise wird die Funktion von Ncam1a und Ncam1b auch durch die Insertion der VASE-Exons reguliert (Mizuno et al., 2001).

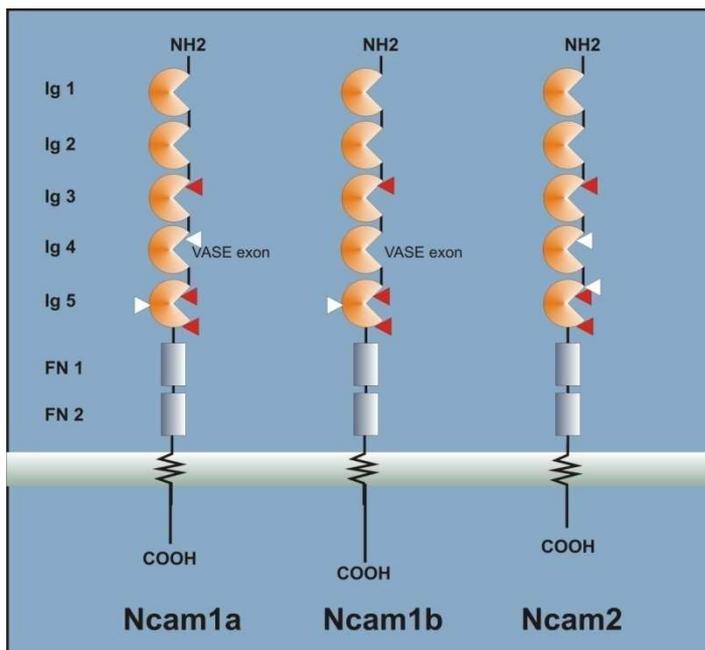


Abbildung 5: Aufbau der Vertreter der NCAM-Familie im Zebrafisch, nach Mizuno et al., 2001:

Die 3 Vertreter der NCAM-Familie im Zebrafisch besitzen 5 Ig-Domänen und 2 TypIII-Fibronektin-Domänen auf der extrazellulären Seite, eine Transmembrandomäne und eine unterschiedlich lange intrazelluläre Domäne. Ncam1a und 1b besitzen im Bereich der vierten Ig-Domäne ein sogenanntes VASE (variable alternatively spliced exon), das durch alternatives Splicen eingefügt werden kann. Rote Pfeilspitzen markieren konservierte Glykosilierungsstellen und weiße Pfeilspitzen indizieren die nicht-konservierten Glykosilierungsstellen.

Die Expression des NCAM1-VASE-Exons wird postnatal im Gehirn von Ratten hochreguliert (Walsh et al., 1992). Dadurch verändert sich die Reaktion auf die Stimulation durch NCAM1 (Doherty et al., 1992). Je höher der Anteil an exprimiertem NCAM1 mit VASE-Exon, desto geringer ist deren Reaktion auf eine Stimulation mit NCAM1 zum Wachstum von Neuriten (Doherty et al., 1992, Liu et al., 1993, Saffell et al., 1994).

Ncam1a wurde im Zebrafisch bisher in 2 Isoformen beschrieben: 140 kDa (Mizuno et al., 2001) und 170 kDa (Marx et al., 2001, Schober, 2011). Von der 140 kDa-Isoform wurde die Struktur der cDNA, bestehend aus 16 Exons, und die Aminosäuresequenz (838 Aminosäuren) bereits veröffentlicht (Mizuno et al., 2001). Die 170 kDa-Isoform konnte mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper D3 aus dem Hühnchen (Bastmeyer et al., 1990) auf einem Westernblot nachgewiesen werden (Marx et al., 2001). Der monoklonale Antikörper MG5 gegen humanes NCAM1 (Takamatsu et al., 1994, Gerardy-Schahn et al., 1994) erkennt ebenfalls die Isoform von 170 kDa im Zebrafisch (Marx, 2002). Die Isoform von 140 kDa besteht im Bereich der intrazellulären Domäne aus den Exons 17 und 18 (Mizuno et al., 2001, Schober, 2011). Mit Hilfe spezifischer Primer konnte gezeigt werden, dass bei der Ncam1a-Isoform von 170 kDa im Zebrafisch ein zusätzliches Exon, das Exon 17a, verwendet wird (Schober, 2011). Dadurch kommt es zu einem Molekulargewicht von 170 kDa und nicht, wie bei der Maus, zu einem Molekulargewicht von 180 kDa (Schober, 2011).

2.3.3 Spezifisches Expressionsmuster der Mitglieder der NCAM-Familie im Zebrafischembryo

Die Expressionsmuster von *ncam1a*, *ncam1b* und *ncam2* wurden bisher auf mRNA-Ebene mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierungen untersucht (Mizuno et al., 2001, Dietzsch, 2008). *Ncam1a* und *ncam1b* werden bereits 11 Stunden nach der Befruchtung („hours post fertilization“: hpf) im Zebrafischembryo exprimiert (Mizuno et al., 2001, Dietzsch, 2008). *Ncam1a* ist zunächst vermehrt im cranialen und *ncam1b* im caudalen Bereich des Nervensystems zu detektieren (Mizuno et al., 2001). Die Expression von *ncam1a* breitet sich auf das komplette zentrale Nervensystem aus, während *ncam1b* in spezifischen Neuromeren zu finden ist (Mizuno et al., 2001). 20 Stunden nach der Befruchtung ist eine Färbung mit der *ncam1b*-Sonde im dorsalen und ventralen Thalamus, im Pretectum, im

Rhombencephalon, im otischen Vesikel und im Rückenmark festzustellen (Mizuno et al., 2001). Im Hinterhirn wird *ncam1b* Rhombomer-spezifisch exprimiert (Mizuno et al., 2001). In 20hpf-Embryonen findet man eine starke *ncam1b*-Färbung in Rhombomer 2 und eine schwache Expression in den Rhombomeren 3,4,6 und 7 (Mizuno et al., 2001).

Die Expression von *ncam2* startet, im Gegensatz zu *ncam1a* und *ncam1b*, erst 30 hpf und ist auf sekundäre Neuronen des olfaktorischen Systems beschränkt (Mizuno et al., 2001).

2.3.4 PolySia-Expressionsmuster im Nervensystem des Zebrafischembryos

Im zentralen Nervensystem des Zebrafischs wird polySia auf den Zellkörpern und nicht auf Axonen exprimiert, mit Ausnahme der posterioren Kommissur (Marx et al., 2001). Im peripheren Nervensystem befindet es sich auf den Motoraxonen der Cranialnerven (V, VII, IX und X) und auf den sekundären Motoneuronen im Zebrafischschwanz. Dort ist es sowohl auf den Zellkörpern als auch auf den Axonen zu finden (Marx et al., 2001). Das Zebrafischgenom kodiert zwei Polysialyltransferasen vom St8Sia-Typ: St8Sia2 (STX) und St8Sia4 (PST) (Harduin-Lepers et al., 2005, Marx et al., 2007). Auf der Aminosäureebene stimmen St8Sia2 und St8Sia4 zu 49,3 % überein, und in Bezug auf die menschlichen Homologe zeigen St8Sia2 und St8Sia4 eine Sequenzübereinstimmung von 63,4 % bzw. 70,2 % (Marx et al., 2007). Die Expression der beiden Polysialyltransferasen ist sehr unterschiedlich im sich entwickelnden Zebrafisch (Marx et al., 2007, Rieger et al., 2008). Eine Färbung mit der *st8Sia2*-Sonde findet man im Gehirnprimordium ab 13 hpf (Marx et al., 2007). Später ist eine starke Expression im anterioren Nervensystem und entlang der Floorplate („Bodenplatte“) im Rückenmark zu detektieren (Marx et al., 2007). 96 Stunden nach der Befruchtung zeigt sich ein deutlicher Rückgang der *st8sia2*-Expression (Rieger et al., 2008). Nur im Bereich des Cerebellums und um die Ventrikel sind schwache Signale zu finden (Rieger et al., 2008). Die *st8sia4*-Expression im sich entwickelnden Zebrafisch ist insgesamt schwächer als die *st8sia2*-Expression (Marx et al., 2007). 48 Stunden nach der Befruchtung wird eine Färbung mit der *st8sia4*-Sonde in ventralen Regionen des Vorder-, Mittel- und Hinterhirns und um die Ventrikel sichtbar (Marx et al., 2007). Im 96 hpf-Stadium ist die Expression zurückgegangen und nur noch leicht im Hinterhirn zu detektieren (Rieger et al., 2008). Der adulte Zebrafisch zeigt meist eine zelltyp- und gewebsspezifische Expression von *st8sia2* und *st8sia4* (Rieger et al., 2008). Im Cerebellum exprimieren die Purkinje-Zellen *st8sia2* stark und *st8sia4* schwach, bei den

Granulazellen ist es genau umgekehrt (Rieger et al., 2008). Der präoptische Nucleus, die Thalamusregion, der caudale Bereich des Cerebellums und verschiedene Bereiche des Hinterhirns exprimieren nur *st8sia2* im adulten Zebrafisch (Rieger et al., 2008).

2.3.5 Die Entfernung von polySia führt zu verändertem axonalen Wachstum im Zebrafischembryo

Mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierungen und Knockdownexperimenten konnte im Zebrafisch gezeigt werden, dass *st8sia2* die Polysialyltransferase ist, die den Hauptanteil der Polysialinsäure im sich entwickelnden Nervensystem synthetisiert (Marx et al., 2007). Nach Injektion von Morpholinos gegen *st8sia2* ist die polySia-Expression nahezu komplett unterbunden und es kommt zu Veränderungen im Axonwachstumsmuster an der posterioren Kommissur und bei kommissuralen Axonen im Hinterhirn (Marx et al., 2007). Untersuchungen mit EndoN, zum enzymatischen Verdau von polySia, zeigen ähnliche Effekte im Nervensystem des sich entwickelnden Zebrafischembryos, wie die Knockdown-Studien (Marx et al., 2001). Zum einen wachsen die Axone der posterioren Kommissur aufgeteilt in mehrere Bündel, zum anderen können die kommissuralen Axone des Hinterhirns nicht mehr über die Mittellinie wachsen (Marx et al., 2001). Im Wildtyp-Zebrafischembryo wachsen die polySia-positiven Axone der posterioren Kommissur in einer Umgebung von Zellen, die polySia schwächer exprimieren (Marx et al., 2001). Durch die komplette Entfernung von polySia auf den Axonen und den umgebenden Zellen während der Entwicklung des Nervensystems werden die Interaktionen mit den umgebenden Zellen verstärkt und die Wachstumskegel in Richtungen gelenkt, in die sie normalerweise nicht wachsen würden (Marx et al., 2001). Die Interaktion der Axone zueinander wird durch die polySia-Entfernung verstärkt, aber anscheinend ist die Interaktion mit den umgebenden Zellen stärker und führt zur Aufspaltung der Kommissur in mehrere Axonbündel (Marx et al., 2001). Die kommissuralen Axone im Hinterhirn benötigen im Wildtyp-Embryo polySia-positive Floorplate-Zellen zum Wachstum über die Mittellinie (Marx et al., 2001). Durch die Entfernung von polySia durch EndoN wird dieses Wachstum gestoppt (Marx et al., 2001). Dies zeigt eine neue Aufgabe von polySia, nämlich die Verbesserung der Interaktion zwischen Zellen und Axonen und nicht die Abschwächung der Interaktion (Marx et al., 2001). Vermutlich bindet polySia eine lösliche Komponente, die für die Mittellinien-Überkreuzung notwendig ist (Marx et al., 2001).

2.3.6 PolySia-Akzeptormoleküle im Zebrafischembryo

Die Datenlage zur Charakterisierung der polySia-Träger im Nervensystem des Zebrafischembryos war zu Beginn der vorliegenden Dissertation spärlich. Sowohl der Knockdown von *ncam1a*, wie der von *ncam1b* hatten nicht zur kompletten Reduktion von polySia im Rückenmark oder auf den Motoneuronen von Zebrafischembryonen geführt (Dietzsch, 2008). Das wurde als erster Hinweis darauf gedeutet, dass polySia die posttranslationale Modifikation von Ncam1a, wie auch von Ncam1b ist (Dietzsch, 2008).

Bei Ncam2 ist es ebenfalls unklar, ob eine polySia-Modifikation vorliegt. Versuche wurden dahingehend bisher nicht durchgeführt. In Säugetieren liegt NCAM2 nicht polysialyliert vor (Yoshihara et al., 1997).

2.3.7 Wird die polySia-Expression auf den Axonen im Zebrafischembryo über das CPE-Motiv reguliert?

Im Nervensystem des Zebrafischembryos tragen nur wenige Axone polySia (Marx et al., 2001). Im zentralen Nervensystem (ZNS) sind die Axone der posterioren Kommissur polySia-positiv, und im peripheren Nervensystem tragen die sekundären Motoraxone im Schwanz, wie auch die motorischen Komponenten der Cranialnerven polySia (Marx et al., 2001). Daher stellt sich die Frage, wie die polySia-Expression auf den Axonen im Zebrafischembryo reguliert wird. Die Sequenzanalyse der mRNA von *ncam1a*, *ncam1b* und *st8sia2* gab einen Hinweis darauf, dass dieser Vorgang möglicherweise über das sogenannte cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE) erfolgen kann.

2.4 Das cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE)

Das cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE) ist ein Sequenzmotiv in der 3'UTR („untranslated region“/nichttranslatierte Region) einer Reihe von mRNAs (Fox et al., 1989, McGrew et al., 1989, McGrew und Richter, 1989). Das CPE wurde zunächst als

repetitive Sequenz beschrieben und schon Anfang der 80er Jahren in der mRNA von Seeigel- und Froscheiern gefunden (Costantini et al., 1980, Anderson et al., 1982). Mittlerweile weiß man, dass über das CPE die Translation von mRNAs reguliert werden kann und dass dieser Vorgang bei vielen Prozessen involviert ist, wie z.B. bei der Oocyten-Reifung, Zellteilung, Zellalterung und der synaptischen Plastizität (Review: (Villalba et al., 2011)). Am besten untersucht ist der Vorgang der cytoplasmatischen Polyadenylierung über das CPE bei der Reifung von *Xenopus*-Oocyten (Radford et al., 2008).

2.4.1 Expression maternaler mRNA über den CPE-Mechanismus

Während der Reifung von Oocyten und in der frühen Embryogenese findet keine mRNA-Synthese statt (Bachvarova et al., 1966, Newport und Kirschner, 1982). Die Proteinexpression erfolgt ausschließlich aus vorliegender maternaler RNA (Newport und Kirschner, 1982, Radford et al., 2008). Die maternale RNA liegt zunächst deadenyliert in verschiedenen Bereichen des Embryos vor und wird dann spezifisch in verschiedenen Entwicklungsstadien polyadenyliert und translatiert (Fox et al., 1989, McGrew et al., 1989, Radford et al., 2008). Die kontrollierte polyadenylierungsabhängige Translation der maternalen RNA in *Xenopus*-Oocyten wird unter anderem über den CPE-Mechanismus reguliert (de Moor et al., 2005, Radford et al., 2008). Für die Kontrolle der CPE-abhängigen Translation werden zwei Sequenz-Elemente in der 3'UTR benötigt:

1. das Hexanukleotid AAUAAA bzw. AUUAAA und
2. das CPE UUUUUA₁₋₃U (Fox et al., 1989, McGrew et al., 1989, McGrew und Richter, 1990).

Die Regulation der Translation erfolgt über das CPEB, das CPE-bindende-Protein (Richter, 2007). Dies ist ein Zink-Finger-Protein mit RNA-Erkennungsmotiv (Hake et al., 1998). CPEB ist sowohl für die Aktivierung, wie auch für die Unterdrückung der Translation der mRNA verantwortlich (Richter, 2007). CPEBs findet man bei Vertebraten und bei Invertebraten (Chang et al., 1999, Lamont und Kimble, 2007, Minshall et al., 2007, Racki und Richter, 2006, Si et al., 2010). Vertebraten besitzen häufig vier Gene, die CPEB-Proteine kodieren und bei einigen Invertebraten gibt es zwei (Richter, 2007). Im ruhenden Zustand bindet CPEB an die CPE-Sequenz und über CPEB bindet Maskin an den eukariotischen Initiationsfaktor eIF4E (Abbildung 6). EIF4E bindet an das 5'Ende der

mRNA (Mendez und Richter, 2001). Durch die Bindung von Maskin können keine weiteren Initiationsfaktoren an eIF4E binden, infolgedessen wird die mRNA nicht translatiert (Mendez und Richter, 2001).

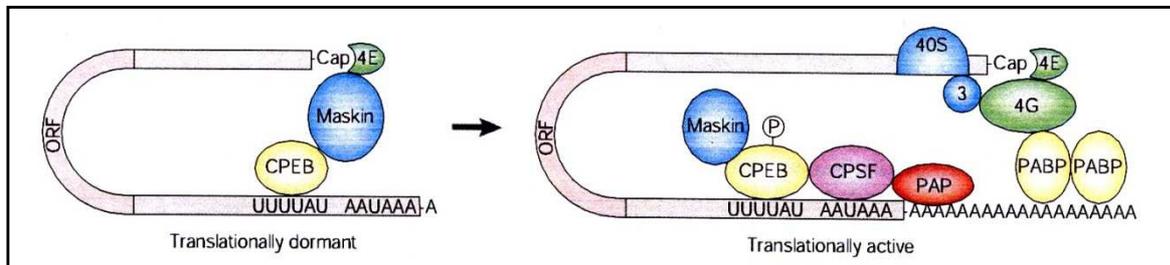


Abbildung 6: Kontrolle der Translation über das CPEB (Mendez und Richter, 2001)

Stillgelegte mRNAs besitzen einen kurzen Poly(A)-Schwanz. Die Translation wird durch die Bindung von Maskin an eIF4E und CPEB inhibiert. Es kommt zur Initiation der Translation wenn CPEB phosphoryliert wird, da Maskin von eIF4E dissoziiert und der Poly(A)-Schwanz von der Poly(A)-Polymerase verlängert wird (Mendez und Richter, 2001).

Zur Aktivierung der Translation wird das CPEB am Serinrest 174 durch eine Serin-Threonin-Proteinkinase phosphoryliert (Mendez et al., 2000, Sarkissian et al., 2004). Maskin dissoziiert und CPSF („cleavage and polyadenylation specificity factor“) bindet an das Hexanukleotid (AAUAAA), wodurch die Poly(A)-Polymerase (PAP) rekrutiert wird (Mendez et al., 2000, Mendez und Richter, 2001). Die Polymerase verlängert den Poly(A)-Schwanz, so dass PABPs (Poly(A)-bindende Proteine) binden können, die die Interaktion zwischen eIF4E und eIF4G stabilisieren (Tarun und Sachs, 1996, Le et al., 1997, Mendez und Richter, 2001, Barnard et al., 2005). Diese Initiationsfaktoren befinden sich am 5'Ende der mRNA und assemblieren hier den 48S-Komplex des Ribosoms (Gallie, 1991, Preiss und Hentze, 1998, Mendez und Richter, 2001).

Die CPE/CPEB-abhängige Translation ist nicht nur bei der Reifung von Oocyten beteiligt, sondern auch in Funktionen des Nervensystem involviert, wie z.B. das Wachstum von Dendriten, die Regulation synaptischer Plastizität, dem Aufbau neuronaler Schaltkreise und dem Gedächtnis (Si et al., 2003, Huang und Richter, 2007, Zearfoss et al., 2008, Bestman und Cline, 2008, Si et al., 2010). CPEB-1 Knockout-Mäuse zeigen ein reduziertes Langzeitgedächtnis und das Vergessen von Schocksituationen ist verlangsamt (Alarcon et al., 2004, Berger-Sweeney et al., 2006). Die synaptische Plastizität der CPEB-1 Knockout-Mäuse ist vermutlich aufgrund einer reduzierten Expression des Wachstumshormons (GH/„growth hormon“) eingeschränkt (Zearfoss et al., 2008).

Über die cytoplasmatische Polyadenylierung wird auch die Translation CPE-enthaltender mRNA an den Synapsen kontrolliert (Wu et al., 1998, Huang et al., 2002, Du und Richter, 2005). Ein Beispiel hierfür ist die CPE-enthaltende α CaMKII-mRNA, deren Polyadenylierung und Translation über phosphoryliertes CPEB auf der postsynaptischen Seite von Neuronen aktiviert wird (Wu et al., 1998, Huang et al., 2002). In Abhängigkeit von der Stimulation der Synapsen wird die mRNA polyadenyliert und anschließend translatiert (Du und Richter, 2005).

Im Modellorganismus *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von Dendriten im optischen Tektum über CPEBs reguliert wird, und in der Meeresschnecke *Aplysia californica* zeigt sich eine CPEB-abhängige Verteilung von mRNA im Axon und eine CPEB-abhängige Regulation des Langzeitgedächtnisses (Si et al., 2003, Bestman und Cline, 2008, Si et al., 2010). Das CPE kann also auch eine Rolle beim axonalen Transport von mRNAs spielen.

2.4.2 Die CPE-abhängige Translation im Zebrafisch

Beim Zebrafisch wurden vier CPEBs gefunden (Huppert, 2006), wobei CPEB1 bzw. „Zorba“, bereits 1998 beschrieben wurde (Bally-Cuif et al., 1998). Über Zor-1/Zorba wird die mRNA von *c-mos*, das bei *Xenopus* in die Oocytenreifung involviert ist, im animalen Pol von Zebrafisch-Oocyten lokalisiert (Suzuki et al., 2009). Und die Expression der maternalen *cyclinB1*-mRNA wird im Zebrafischembryo CPE-abhängig translatiert (Zhang und Sheets, 2009).

Die mRNA von *ncam1a*, *ncam1b* und *st8sia2* enthält ebenfalls ein cytoplasmatisches Polyadenylierungselement (Marx, 2002, Dietzsch, 2008). Die Funktion dieser Sequenz bezüglich der Expression der Zelladhäsionsmoleküle und der Polysialyltransferase *st8sia2* ist unklar. Möglicherweise wird über das CPE die polySia-Expression im Nervensystem des Zebrafischembryos reguliert. PolySia wird hauptsächlich auf den Zellkörpern von Neuronen exprimiert (Marx et al., 2001). Ausnahmen dazu sind die Axone der posterioren Kommissur, craniale und spinale Motoraxone (Marx et al., 2001). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Funktion des Axonhügels. Im Übergang zwischen dem Soma eines Neurons und dessen Axon befindet sich der Axonhügel, eine Grenze zwischen dem organellenreichen Soma und dem Axon (Braun et al., 1993).

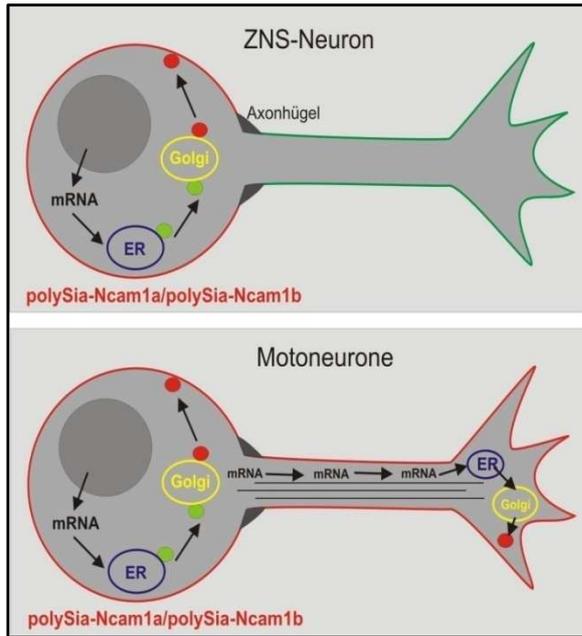


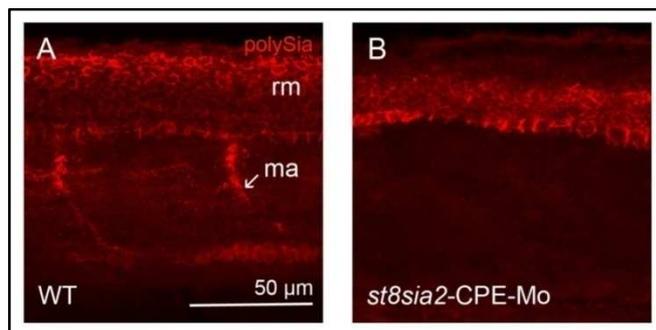
Abbildung 7: Schema zur polySia-Expression auf den Neuronen im Zebrafischembryo

Neurone innerhalb des zentralen Nervensystems im Zebrafischembryo exprimieren polySia (rot) auf dem Zellkörper und nicht auf dem Axon. Motoneurone dagegen zeigen einen polySia-Besatz auf beiden Kompartimenten.

Möglicherweise erfolgt am Axonhügel eine Sortierung der Proteine, so dass polySia-Ncam1a bzw. polySia-Ncam1b nicht von der Membran des Zellkörpers ins Axon gelangen. In den Motoneuronen wird die Sortierung am Axonhügel umgangen, indem die *ncam1a*, *ncam1b*- und *st8sia2*-mRNA über CPE-bindende Proteine ins Axon transportiert werden und dort lokal exprimiert und in die Zellmembran eingebaut werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Organellen geht man davon aus, dass am Axonhügel eine Sortierung stattfindet. Es besteht daher die Möglichkeit, dass polysialyliertes Ncam1a bzw. Ncam1b im Zellkörper gebildet wird, und normalerweise nicht von der Membran des Zellkörpers in die Axonmembran gelangt. In den cranialen und spinalen Motoneuronen kommt es möglicherweise zusätzlich zu der Sortierung am Axonhügel zu einem CPE-abhängigen Mechanismus (Schema siehe Abbildung 7).

Morpholino-Knockdown-Experimente haben bisher keinen Hinweis auf eine Funktion der CPE-Motive bei *ncam1a* und *ncam1b* ergeben (Dietzsch, 2008). Für die Regulation einer Translation von *st8sia2* über das CPE gibt es jedoch Evidenzen (siehe Abbildung 8). Die



Injektion eines Morpholinos gegen die CPE-Sequenz der *st8sia2*-mRNA führt zu einem polySia-Verlust auf den Axonen der spinalen Motoneurone, während auf den Zellkörpern weiterhin polySia detektiert werden kann (Abbildung 8).

Abbildung 8: PolySia-Expression nach CPE-Blockade der *st8sia2*-mRNA

A-B) Laterale Ansicht eines Abschnitts im Zebrafischschwanz (36 hpf) immungefärbt gegen polySia. **A)** PolySia wird im Wildtyp-Embryo auf den Zellen des Rückenmarks (rm) und auf den Motoraxonen (ma) exprimiert. **B)** Die polySia-Expression ist nach Injektion des *st8sia2*-CPE-Morpholinos nur noch auf den Zellen des Rückenmarks zu detektieren. Maßstabsbalken in A gilt für A und B). Abkürzungen: ma: Motoraxon, Mo: Morpholino, rm: Rückenmark, WT: Wildtyp

2.5 Zielsetzung dieser Studie

Wie in 2.1.4 beschrieben, besitzen NCAM1 und seine posttranslationale Modifikation polySia bei Säugetieren eine enorme Bedeutung und das nicht nur für die Entwicklung des Nervensystems, sondern auch für die Plastizität im adulten Gehirn (Cremer et al., 1994, Rutishauser und Landmesser, 1996, Rutishauser, 2008, Kochlamazashvili et al., 2010, Gascon et al., 2010). Im adulten Zebrafisch kann Ncam1a ebenfalls mit der Funktion des Gedächtnisses in Verbindung gebracht werden (Pradel et al., 2000). Über die Funktion von Ncam1a und Ncam1b während der Entwicklung des Nervensystems im Zebrafisch ist jedoch nichts Genaues bekannt. In einer vorausgegangenen Dissertation wurde lediglich gezeigt, dass die Motoraxone nach *ncam1b*-Knockdown Unregelmäßigkeiten aufzeigen (Dietzsch, 2008). Interessant ist z.B. die Frage, was mit der Funktion von *ncam1* nach der Genomduplikation vor ca. 350 Millionen Jahren passiert ist (Vandepoele et al., 2004, Meyer und Van de Peer, 2005). Wurde die Funktion von *ncam1* auf *ncam1a* und *ncam1b* verteilt oder wurden über Mutationen neue Funktionen etabliert? Kam es zu einer Konservierung der beiden Gene *ncam1a* und *ncam1b* aufgrund einer Subfunktionalisierung (Lynch und Force, 2000, He und Zhang, 2005)? Im Rahmen dieser Dissertation soll eine genauere Analyse der einzelnen Funktionen von *ncam1a* und *ncam1b* während der Entwicklung des Nervensystems im Zebrafischembryo durchgeführt werden. Desweiteren stellt sich natürlich die Frage, was im Zebrafisch nach der Genduplikation mit der posttranslationalen Modifikation der Zelladhäsionsmoleküle passiert ist? Werden beide Moleküle polysialyliert oder verliert eines der Proteine die Modifikation im Verlauf der Evolution? Diesen Fragen wird im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen. Ob Ncam2, das dritte Mitglied der NCAM-Familie im Zebrafisch, polysialyliert vorliegt wird ebenfalls in dieser Studie analysiert. Die Funktion von Ncam2 im Zebrafisch wird bereits von einer anderen wissenschaftlichen Gruppe untersucht und ist deshalb nicht Teil dieser Arbeit (Miyasaka et al., 2009). Zur Ergänzung der *in-situ*-Expressionsstudien der NCAM-Familie im Zebrafisch (Mizuno et al., 2001), werden spezifische Antikörper gegen die Proteine Ncam1a, Ncam1b und Ncam2 eingesetzt. Sie ermöglichen eine detaillierte Analyse der Proteinexpression im Nervensystem des sich entwickelnden Zebrafischembryos.

Ein weiteres Teilprojekt dieser Arbeit ist die Funktionsanalyse der CPE-Motive in der 3'UTR der *st8sia2*-, *ncam1a*- und *ncam1b*-mRNA. Die bisherigen Versuche zur Funktion der CPE-Motive in der *st8sia2*-, *ncam1a*- und *ncam1b*-mRNA beschränken sich auf die Injektion von Morpholinos gegen die CPE-Sequenzen (Dietzsch, 2008). Es zeigten sich

keine Auffälligkeiten im Wachstum der Motoraxone bzw. in der Verteilung von polySia nach Injektion der *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-CPE-Morpholinos (Dietzsch, 2008). Die Blockierung des CPE-Motivs in der *st8sia2*-mRNA dagegen führt zu einem deutlichen Phänotyp: dem Verlust der polySia-Expression auf den Motoraxonen (Abbildung 8). Dies ist ein erster Hinweis dafür, dass die Regulation der Polysialylierung auf den Motoraxonen über den CPE-Mechanismus erfolgen könnte. Zur Erweiterung der Untersuchungen bezüglich des CPE-Mechanismus werden in dieser Arbeit Reporterkonstrukte kloniert, die die 3'UTR der mRNAs mit und ohne CPE-Sequenz enthalten. Möglicherweise zeigt sich dadurch eine regulatorische Funktion dieser Elemente. Die Regulation von lokaler Translation über das CPE-Motiv in Zebrafisch-Axonon wäre ein ganz neuer Aspekt in der Zebrafisch-Forschung.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalienverzeichnis

Chemikalie	Hersteller
Aceton (99,5%)	Roth
Agar	Fluca
Agarose	Roth
Ampicillin	Roth
H ₂ O dest.	TKA-Anlage
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich
Calciumnitrat (Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O)	Roth
Calciumchlorid (CaCl ₂ x 2H ₂ O)	Roth
1kb DNA-Ladder	NEB
100bp DNA-Ladder	NEB
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
EDTA	Roth
Eisessig	Roth
Ethanol (99,8 %)	Roth
Ethidiumbromid-Tabletten	Sigma
Glycerin	Roth
Hefeextract	Fluka
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Roth
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Loading Dye (6x)	Fermentas

Methylenblau	Roth
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Roth
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Roth
Mowiol 4-88 (Polyvinylalkohol)	Calbiochem
MS-222 (3-Aminobenzoessäureethylester)	Sigma
Natriumborhydrid (NaBH_4)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Phenolrot	Roth
n-Propylgallat	Sigma
PBS Dulbecco ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG
PFA (Paraformaldehyd)	Merck
PTU (1-Phenyl-2-Thiourea)	Sigma
Thimerosal (Natriumethylmercuritthiosalicylat)	Roth
Tris	Roth

3.2 Medien, Puffer und sonst. Lösungen

3.2.1 PBS (Pulver von Biochrom AG)

8 g NaCl ,

0,2 g KCl ,

1,15 g Na_2HPO_4 ,

0,2 g KH_2PO_4 ,

0,1 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$,

0,1 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$,

in 800 ml H_2O dest. lösen, pH-Wert mit HCl auf 7,4 bringen. Mit H_2O dest. auf 1 l auffüllen.

Die Lösung im Autoklav sterilisieren.

3.2.2 PBS/1%BSA/1%DMSO-Lösung

50 ml PBS

0,5 g BSA

500 µl DMSO

PBS in ein Becherglas mit Rührfisch füllen. BSA-Flocken auf PBS geben. DMSO auf die BSA-Flocken pipettieren, damit dieses leichter gelöst wird. Rühren, bis BSA gelöst ist. Lösung jeweils frisch ansetzen. Über Nacht bei 4°C haltbar.

3.2.3 Phosphatpuffer (4x)

5,32 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$

52,11 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

In 0,4 l H_2O dest. lösen, pH 7,4 kontrollieren, auf 0,5 l mit H_2O dest. auffüllen.

Lösung sterilfiltrieren und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahren.

Vor Gebrauch 1:4 verdünnen.

3.2.4 4 % PFA in Phosphatpuffer

10 g PFA (Merck)

150 ml H_2O dest.

0,5 ml NaOH (1 M)

Die Mischung erhitzen (nicht über 60°C) bis sich das PFA gelöst hat. Lösung durch einen Papierfaltenfilter filtrieren. 62,5 ml 4x Phosphatpuffer zugeben, pH 7,4 kontrollieren und gegebenenfalls mit HCl einstellen, auf 250 ml auffüllen. Lösung aliquotieren und bei -20°C einfrieren.

3.2.5 Danieau-Puffer (50x)

58 mM	NaCl
0,7 mM	KCl
0,4 mM	MgSO ₄
0,6 mM	Ca(NO ₃) ₂
5 mM	HEPES

Mit 10 N NaOH auf pH 7,6 einstellen und sterilfiltrieren.

100 ml für eine Injektion ansetzen:

2 ml Stammlösung, 98 ml H₂O dest., 100 µl Methylenblau (0,02%).

3.2.6 E3-Embryomedium (Haffter et al., 1996)

(Zum Aufbewahren der Embryonen nach der Injektion)

1 Liter (60x):

17,2 g NaCl

0,76 g KCl

2,9 g CaCl₂ x 2H₂O

4,9 g MgSO₄ x 7H₂O

Die Lösung wird sterilfiltriert und dann eingefroren. Entnahme der Stammlösung unter der Sterilbank. Nach der Verdünnung 0,02%iges Methylenblau zugeben.

500 ml Embryomedium (1x) pro Injektion ansetzen:

8,3 ml Stammlösung, 491,7 ml H₂O dest., 400 µl Methylenblau.

3.2.7 PTU-Lösung (0,3%)

0,3 g PTU in 100 ml H₂O dest. rühren lassen bis es sich etwas gelöst hat. (PTU löst sich schlecht, es wirkt aber trotzdem.) Lösung kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Vor der Verwendung 1:100 in E3-Medium verdünnen und Embryonen ab 24 hpf darin inkubieren, um die Pigmentierung zu verhindern.

3.2.8 Natriumborhydrid-Lösung

1 µg/ml NaBH₄ in PBS

Lösung jedes Mal frisch ansetzen.

3.2.9 Mowiol mit n-Propylgallat

60 g Mowiol 4-88 (Calbiochem) und 200 ml PBS über Nacht rühren, 100 ml Glycerin dazugeben, weitere 8h rühren, pH-Wert mit 1N NaOH auf 8-8,5 einstellen, 0,3 ml Thimerosal Lösung (0,2%) zufügen, 15 min bei 4000 rpm zentrifugieren, aliquotieren und bei -20°C lagern.

Vor Gebrauch vorsichtig in der Mikrowelle erwärmen, eine Spatelspitze n-Propylgallat einrühren, 10 min bei 4000 rpm zentrifugieren.

N-Propylgallat ist ein Radikalfänger und schützt Fluoreszenzpräparate vor vorzeitigem Ausbleichen.

3.2.10 TAE Puffer (50x; Elektrophorese-Puffer für Agarose-Gele)

242 g	Tris
57,1 ml	Eisessig (konzentrierte Essigsäure)
100 ml	EDTA (0,5 M, pH 8)

auf 1 l mit H₂O dest. auffüllen. Zum Gebrauch auf 1x verdünnen.

3.2.11 SOC-Medium (von Invitrogen)

2 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
20 mM	Glukose

3.2.12 LB-Medium

10 g/l	Bacto-Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
5 g/l	NaCl

Bestandteile in 0,8 l H₂O dest. lösen, pH auf 7,0 einstellen und auf 1 l auffüllen. Lösung autoklavieren und mit den nötigen Antibiotika versehen.

3.2.13 Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin:	100 mg/ml
Kanamycin:	50 mg/ml

3.2.14 LB-Agarplatten für BP-Konstrukt mit 50 µg/ml Kanamycin

500 ml LB-Medium mit 7,5 g Agar mischen, autoklavieren, abkühlen lassen, mit 0,5 ml Kanamycin-Stammlösung (50 mg/ml) mischen. Platten gießen und abkühlen lassen, im Kühlschrank aufbewahren.

3.2.15 LB-Agarplatten für LR-Konstrukt mit 100 µg/ml Ampicillin

500 ml LB-Agar mit 0,5 ml Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) versetzen. Platten gießen, abkühlen, im Kühlschrank aufbewahren.

3.3 Antikörper

3.3.1 Primärantikörper für die Immunfärbung

Tabelle 3: Primärantikörper

Name	Herkunft	Typ	Spezifität	Verdünnung	Referenz	Bezugsquelle
735	Maus	IgG, mkl	PolySia	1:400	(Frosch et al., 1985)	R.Gerardy-Schahn
T 741	Kaninchen	IgG, pkl	Zebrafisch Tag-1	1:3000	(Lang et al., 2001)	Uni Konstanz
T8/9	Maus	IgG, mkl	Zebrafisch Tag-1	1:500 (8 µg/ml)	/	Uni Konstanz
704	Kaninchen	IgG, pkl	Ncam1a, Ncam1b	1:2000	Marx et al., 2001	Zoolog. Institut (KIT)
Ncam1a	Kaninchen	IgG, pkl	Ncam1a	1:500	/	Yoshihiro Yoshihara
Ncam1b	Kaninchen	IgG, pkl	Ncam1b	1:500 (0,4 µg/ml)	(Miyasaka et al., 2005)	Yoshihiro Yoshihara
Ncam2	Kaninchen	IgG, pkl	Ncam2	1:500 (1,4 µg/ml)	(Miyasaka et al., 2009)	Yoshihiro Yoshihara

Die Antikörper gegen Ncam1a, Ncam1b und Ncam2 wurden mir von Yoshihiro Yoshihara (Lab for Neurobiology of Synapse; RIKEN/Japan) zur Verfügung gestellt. Sie wurden von der Firma Sawaday Technology (Tokyo, Japan) hergestellt. Ein Kaninchen wurde dafür

mit einem synthetischen C-terminalen Peptid, konjugiert mit einem „keyhole limpet“ Hämocyantin, immunisiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Immunoaffinitäts-Chromatography mit einem Peptid-gekoppelten Harz (Miyasaka et al., 2005).

Für den Ncam1b Antikörper wurde das synthetische Peptid nach der C-terminalen Aminosäureabfolge 1012-1031 hergestellt (Koide et al., 2009). Die Peptidsequenz für das Ncam2- und Ncam1a-Serum wurde nicht publiziert.

3.3.2 Sekundärantikörper für die Immunfärbung

Tabelle 4: Sekundärantikörper

Nummer	Herkunft	Gekoppelter Farbstoff	Typ	Spezifität	Verdünnung	Bezugsquelle
1	Esel	Cyanin 3	IgG	Kaninchen IgG	1:1000	Dianova
2	Ziege	Alexa488	IgG	Kaninchen IgG	1:1000	Molecular Probes/ Invitrogen
3	Ziege	Cyanin 3	IgG	Maus IgG	1:1000	Dianova
4	Ziege	Alexa488	IgG	Maus IgG	1:1000	Molecular Probes/ Invitrogen

3.4 Konjugat

3.4.1 EndoN-GFP

EndoN-GFP ist eine Verbindung aus dem Enzym Endosialidase N und dem Fluorophor GFP (Jokilammi et al., 2004). Das Enzym wurde so modifiziert, dass es an sein Substrat, polySia, binden kann, dieses aber nicht degradiert (Jokilammi et al., 2004). In den Versuchen dieser Dissertation wurde das Konjugat EndoN-GFP zur Quantifizierung von polySia in einer Konzentration von 30 µg/ml eingesetzt. Dies entspricht einer 1:500

Verdünnung der Stocklösung. Das Konjugat wurde mir von Prof. Dr. Jukka Finne (Department of Biosciences, University of Helsinki/Finland) zur Verfügung gestellt.

3.5 Enzyme

3.5.1 DNA-Polymerasen

Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB)

PFU Turbo DNA-Polymerase (Stratagene)

DreamTaq (Fermentas)

3.5.2 RNA-Polymerasen

T7-RNA-Polymerase (mMessage mMachine kit, Ambion)

Sp6-RNA-Polymerase (mMessage mMachine kit, Ambion)

3.5.3 Multisite Gateway Enzyme (von Invitrogen)

BP-Clonase II enzyme mix

LR-Clonase II enzyme mix

Proteinase K solution

3.6 Zellen

One Shot TOP10 Competent Cells *E.coli* (Invitrogen)

One Shot ccdB Survival T1 Chemically Competent *E.coli* (Invitrogen)

3.7 Versuchstiere

Zebrafisch (*Danio rerio*)

Systematische Einordnung:

Stamm: Chordata (Wirbeltiere)
Klasse: Osteichthyes (Knochenfische)
Ordnung: Cypriniformes (Karpfenfischartige)
Familie: Cyprinidae (Karpfenfische)
Gattung: Danio (Bärblinge)
Art: *Danio rerio* (Zebrabärbling)

Die Zebrafische werden bei ca. 26°C in einer Aquarienanlage gehalten. Um eine Steigerung der Eiablage zu erreichen, werden die Zebrafische ein paar Tage vor der Paarung nach Geschlecht getrennt. 1-2-mal pro Woche werden je sechs Paare zum Laichen zusammengesetzt. Für die Versuche wurden Wildtyp-Zebrafische verwendet.

3.8 Aufzucht von Zebrafischen (ZF)

In der ersten Woche nach der Befruchtung werden die ZF-Embryonen in E3-Medium in Petrischalen im Brutschrank (28,5°C) gehalten. Das Medium muss regelmäßig gewechselt werden. Ab der zweiten Woche werden die Embryonen mit Paramecien gefüttert. Die Fütterung erfolgt mehrmals täglich in kleinen Portionen. Das Wasser sollte jetzt täglich gewechselt werden. Die Embryonen können weiterhin in E3-Medium gehalten werden. Je nach Platzbedarf werden sie in größere Plastischalen umgesetzt. Die Zugabe von Methylenblau verhindert das Wachstum von Bakterien. Ab der vierten Woche kann versucht werden mit Artemien-Larven zu füttern. Die Fütterung erfolgt 4-5x täglich. Ab einem Alter von 6 Wochen können die Jungfische in die Zebrafischanlage gebracht werden. Zunächst wird ein schmaler Behälter verwendet mit 500er Locheinsatz und Nylonstrumpf um die Öffnung zu verdecken. Die Fütterung erfolgt mit geschnittenen Mückenlarven und Trockenfutter für Jungfische. Ab einem Alter von 3 Monaten sind Zebrafische geschlechtsreif und können für Paarungen eingesetzt werden.

3.8.1 Paramecien-Zucht

Weizenkörner in Wasser kochen und 12 nicht aufgeplatze Körner in eine 2 Liter Flasche legen, etwas Paramecien-Kultur in die Flasche füllen und den Rest zur Hälfte mit Leitungswasser und dest. Wasser auffüllen. Flasche im Dunkeln aufbewahren.

3.8.2 Artemien-Zucht

Um Artemien zu züchten wird Salzwasser in eine flache Glasschale gefüllt. Die Artemien-Eier werden auf das Salzwasser gestreut und mit Alufolie lichtdicht abgedeckt. Mit Hilfe einer Styroporwand wird der Bereich der Eier von dem Rest der Schale getrennt. Die Styroporwand muss eine Öffnung enthalten durch die die geschlüpften Artemienlarven in Richtung Licht schwimmen können. Nach etwa 2 Tagen ist dies der Fall und die Artemien können verfüttert werden.

3.9 Gewinnung von Zebrafischembryonen im gewünschten Stadium

Um befruchtete Zebrafischeier zu erhalten, werden am Vorabend vor der Injektion Zebrafischpaare nach Geschlechtern getrennt in 3l-Behälter gesetzt. Die Trennung erfolgt über Plastikbehälter mit Metallgitterböden. Am darauffolgenden Morgen (ca. 9 Uhr), wenn das Licht durch eine Zeitschaltuhr im Fischlabor angeht, wird das Weibchen zum Männchen im unteren Behälter gesetzt. Die abgelaichten Eier fallen durch einen weiteren Metallgitterboden. Dadurch wird verhindert, dass die Eier von den adulten Tieren gefressen werden. Die abgelaichten Eier werden in einem kleinen Sieb aufgefangen und mit 1x Danieau-Puffer in Petrischalen gespült. Diese Technik ermöglicht es, ZF-Eier in einem sehr frühen Stadium zu erhalten. Die Injektion erfolgt im 1-2 Zellstadium.

Um eine größere Anzahl von Injektionen an einem Tag durchzuführen, werden einige Zebrafisch-Pärchen über Nacht blickdicht abgedeckt und am nächsten Morgen erst zeitverzögert aufgedeckt und zusammengesetzt. Dies ermöglicht zwei Injektionen pro Vormittag.

3.10 Mikroinjektion von Zebrafischembryonen

3.10.1 Herstellung und Füllung der Injektionsnadeln

Die Injektionsnadeln werden aus Glaskapillaren (Länge 150 mm, Außendurchmesser 1 mm, Helmut Saur Laborbedarf) mit Hilfe des „David Kopf Instruments Vertical Pipette Puller Model 700C“ mit der Einstellung Heater 80, Solenoid 85 gefertigt. Dazu werden sie in das Gerät eingespannt, erhitzt und auseinander gezogen. Mit einem Glasschneider werden sie auf die richtige Länge gebracht. Die Füllung der Injektionsnadeln erfolgt mit Hilfe von Mikroloader Pipettenspitzen (Eppendorf). Diese Spitzen sind so dünn und lang, dass sie in die Injektionsnadeln eingeführt werden können.

3.10.2 Mikroinjektion

Für die Mikroinjektion werden die ZF-Eier mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze aus der Petrischale pipettiert und in einer Silikonform mit Vertiefungen aufgereiht. Das korrekte Aufreihen ist wichtig, um später alle Eier gut injizieren zu können. Die Danieau-Lösung sollte soweit abgesaugt werden, dass die Eier in den Vertiefungen liegen bleiben, im Verlauf der Injektion aber auch nicht austrocknen.

Der Transjektor 5246 (Eppendorf) muss für die Injektion vorbereitet werden:

1. Gerät anschalten und auf manuellen Injektionsbetrieb stellen
2. Kanal auswählen aus dem die Druckluft ausströmen soll
3. mit „set“ den Injektionsdruck (Pi) auf 3000 Hekto-Pascal stellen, bestätigen
4. Kanal schließen
5. Injektionskapillare befestigen
6. Spitze der Kapillare mit Pinzette auf die richtige Länge bringen,
7. Kanal öffnen und injizieren.

Die Abgabe der Injektionslösung wird über ein Fußpedal gesteuert und die Menge (ca. 3-4 nl) an Injektionslösung wird über ein Binokular kontrolliert.

3.11 Aufzucht von Zebrafischembryonen, „Staging“, Dechorionieren

Die, mit Morpholinos injizierten ZF-Embryonen werden in Petrischalen mit 1x E3-Embryomedium 24 Stunden bei 28,5°C im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Tag werden die Embryonen bei Raumtemperatur inkubiert, damit sie sich nach 48 Stunden etwa im 36-hpf-Stadium befinden. Die Bestimmung des genauen Entwicklungsstadiums erfolgt nach Kimmel et. al. (1995). Im Stadium von 24 hpf wird dem E3-Embryomedium (ca. 50 ml je Petrischale) 500 µl PTU (Stammlösung: 0.3 % PTU in H₂O dest.) hinzugefügt. Vor der Fixierung der Embryonen wird das Chorion mit 2 spitzen Pinzetten unter dem Binokular entfernt.

3.12 Fixierung und „Wholemount“-Immunfärbung von Zebrafischembryonen

Für die Betäubung werden die ZF-Embryonen fünf Minuten auf Eis gestellt. Zur Erleichterung der späteren Waschschriffe pipettiert man die Embryonen in Netze, die in zwei Milliliter Reaktionsgefäßen stehen. Die Fixierung erfolgt mit 4 % PFA in Phosphatpuffer für 4,5 Stunden bei 4 °C auf einem Drehrad. Anschließend wäscht man die Embryonen 3x 5 min mit 1x Phosphatpuffer bei Raumtemperatur (RT) auf dem Drehrad. Zur Vorbereitung auf die Permeabilisierung werden die Embryonen kurz mit dest. Wasser abgespült. Die Permeabilisierung erfolgt mit Aceton (-20 °C) auf Eis und dauert bei den 36 hpf Embryonen (WT oder Morpholino-injiziert) 6-8 Minuten. Die Acetonreste werden kurz mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend werden die Embryonen 3x 5 min mit Phosphatpuffer bei RT auf dem Drehrad gewaschen. Um Doppelbindungen zu reduzieren, die durch die Fixierung entstanden sein können, werden die Embryonen mit einer frisch angesetzten Natriumborhydrid-PBS-Lösung 1x 5 min bei RT abgespült. Die Natriumborhydridlösung wird durch Spülen der Embryonen mit PBS entfernt. Zusätzlich werden die Embryonen 2x 5 min mit PBS auf dem Drehrad bei RT gewaschen.

Zur Vorbereitung auf die Antikörperbehandlung werden die ZF-Embryonen in PBS/1%BSA/1%DMSO überführt und in 250 µl Reaktionsgefäße pipettiert. Die Primärantikörperlösung besteht aus je 250 µl PBS/BSA/DMSO, einem monoklonalen Antikörper wie z.B. 735 (1:400, Maus IgG gegen polySia) und einem polyklonalen

Antikörper wie z.B. T741 (1:3000, Kaninchen IgG gegen Zebrafisch Tag-1). Die Embryonen inkubieren über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad in der Antikörperlösung. Für eine Färbung der kommissuralen Axone im Hinterhirn empfiehlt es sich die Embryonen zusätzlich 2 h bei RT in der Antikörperlösung zu inkubieren und den Dotter vor der Inkubation im Primärantikörper zu entfernen.

Um die Primärantikörper zu entfernen, werden die Embryonen 3x15 min in PBS/BSA/DMSO bei RT gewaschen. Die Sekundärantikörperlösung enthält je Probe 250 µl PBS/BSA/DMSO, einem Sekundärantikörper gegen Maus IgGs und einen Sekundärantikörper gegen Kaninchen IgGs. Die Inkubation erfolgt in 250 µl Reaktionsgefäßen 2 h bei RT auf dem Drehrad. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, werden die ZF-Embryonen 2x 30 min mit PBS/BSA/DMSO gewaschen und anschließend übers Wochenende in 2 ml Reaktionsgefäße mit PBS/BSA/DMSO stehen gelassen.

Tabelle 5: Protokoll zur Immunfärbung

Schritt	Dauer	Temperatur	Reaktionsgefäß
Fixierung mit PFA in Phosphatpuffer	4,5 Std	4°C	2 ml Eppi mit Netz, auf Drehrad
Spülen in 1x Phosphatpuffer	3 x 5 min	Raumtemperatur	2 ml Eppi mit Netz, auf Drehrad
Spülen mit A. bidest	5 sek	Raumtemperatur	Netz
Permeabilisieren in Aceton	siehe Tabelle 5, *	-20°C	2 ml Eppi mit Netz
Spülen mit A. bidest	5 sek	Raumtemperatur	Netz
Spülen mit 1x Phosphatpuffer	3 x 5 min	Raumtemperatur	2 ml Eppi mit Netz, auf Drehrad
Spülen mit NaBH ₄	1 x 5 min	Raumtemperatur	Netz, in Petrischälchen
Spülen mit PBS	5 min	Raumtemperatur	Netz
Waschen mit PBS	3 x 5 min	Raumtemperatur	2 ml Eppi mit Netz, auf Drehrad
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 Std.	Raumtemperatur	250 µl PCR-Eppi, auf Drehrad
Spülen mit PBS/BSA/DMSO	2 x 30 min	Raumtemperatur	2 ml Eppi, auf Drehrad

* Dauer der Permeabilisierung in Abhängigkeit vom Embryonalalter:

Tabelle 6: Permeabilisierungszeiten in Aceton

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

3.13 Dottersackentfernung und „Mounting“ der Zebrafischembryonen

Zur besseren Positionierung der Embryonen wird zunächst der Dottersack mit 2 Minutiennadeln unter dem Binokular entfernt. Dazu pipettiert man die Embryonen mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze in eine Petrischale mit PBS und etwas PBS/BSA/DMSO. Zum Einbetten der Embryonen wird auf einem beschrifteten Deckglas (24x60 mm) ein Streifen Mowiol aufgebracht. Mit Hilfe einer Minutiennadel nimmt man die Embryonen einzeln aus der Petrischale ins Mowiol auf dem Deckglas. Unter dem Binokular werden die Embryonen so positioniert, dass der Kopf von dorsal und der Schwanz von lateral betrachtet werden kann. Überflüssiges Mowiol wird entfernt. Das Trocknen des Mowiols dauert etwa 30 Minuten, dann können die Embryonen weiter eingebettet werden. Mit einem Glasschneider werden schmale Streifen (3-5 mm breit) aus Deckgläsern geschnitten. Je 2 dieser Glasstreifen werden auf jede Seite eines

Deckglases mit Embryonen gelegt. Sie dienen als Platzhalter, damit die Embryonen nicht beim Einbetten zerquetscht werden. 500 µl Mowiol werden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf die Embryonen aufgebracht und mit einem weiteren Deckglas bedeckt.

Vor der Auswertung unter dem Mikroskop sollten die Embryonen seit etwa 1 Woche eingebettet sein. Die Präparate werden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

3.14 Knockdown-Technik mittels Morpholino-Injektion

Morpholinos sind künstlich hergestellte Oligonukleotide. Sie besitzen einen Morpholinring anstatt des Desoxyribose-Rings, und eine ungeladene Phosphordiamidatgruppe anstatt des Phosphatrests. Aufgrund ihres unnatürlichen Rückgrats können Morpholinos nicht von Nukleasen abgebaut werden. Sie sind 25 Basen lang und die Sequenz ist komplementär zur mRNA-Sequenz eines Zielgens. Sie blockieren entweder das korrekte Splicen oder die Translation der mRNA.

Zum transienten Knockdown der Expression der Polysialyltransferase *st8sia2* im Zebrafisch ist eine Kombination von 2 verschiedenen Morpholinos notwendig (Marx et al., 2007). Für den Knockdown von *ncam1a* und *ncam1b* wurden ebenfalls 2 verschiedene Morpholinos getestet. Es wurde aber jeweils nur ein Morpholino eingesetzt.

Die folgenden Morpholinos wurden ohne Modifikation bei GeneTools bestellt:

Tabelle 7: Morpholino-Auflistung

Name	Sequenz	Position
Morpholino1 St8Sia2	5'-AAAAGACATGACTTGACCGATGCG-3'	-15 bis +9
Morpholino2 St8Sia2	5'-AGAAATGTGTTCTCCTCTTTCACG-3'	-74 bis -51
Ncam1a 5'UTR	5'-TTCCGTGTAGAATAGGTAGAGTTGG-3'	-48 bis -24
Ncam1a Startcodon	5'-TGAGATCCCGTATTTGAAGCATTGC-3'	-3 bis +22

Ncam1b 5'UTR	5'-GTTTACTGTTTGTGTTTTGCCTTCCG-3'	-52 bis -28
Ncam1b Startcodon	5'-AGATTATCGCCTTGGTCGGAAACAT-3'	0 bis +25
Kontroll-Morpholino	5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'	/

Beispiel einer Morpholinolösung mit einer Morpholino-Endkonzentration von 2,5 ng/nl:

1 µl Morpholino (25 ng/nl)

0,2 µl Danieau-Puffer (50x)

5 µl Phenolrot

3,8 µl dest. Wasser

Die Morpholinolösungen werden im 1-2 Zellstadium in den Dotter von Zebrafischembryonen injiziert. Morpholinokonzentrationen von 1,25 ng/nl je Morpholino und 2,5 ng/nl je Morpholino wurden eingesetzt. Pro Embryo werden ca. 3-4 nl der Lösung injiziert.

3.15 Umklonierung von *ncam1a* und *ncam1b* zur Durchführung der „Rescue“-Experimente

Um einen „off-target“ Effekt der Morpholinos auszuschließen, wurden sogenannte „Rescue“-Experimente durchgeführt. Dazu wurde die komplette kodierende Sequenz von *ncam1a* und *ncam1b* in Vektoren kloniert, die Bindungsstellen der Morpholinos verändert und nach Linearisierung der Vektoren „capped“-mRNA mit dem mMessage mMachine kit (Ambion, Austin, TX) hergestellt. *Ncam1a* wurde über KpnI-/NotI-Schnittstellen in den Vektor pcDNA3.1(+) kloniert. Eine Veränderung der Morpholinobindungsstelle war hier nicht notwendig, da der Morpholino in der 5'UTR bindet. Zur Herstellung der mRNA wurde die T7-RNA-Polymerase verwendet und der *Ncam1a*/pcDNA3.1 Vektor mit dem Enzym StuI geschnitten. *Ncam1b* wurde über EcoRI-Schnittstellen in den Vektor pCS2(+) kloniert. Im Bereich des *ncam1b*-Start-Morpholinos wurden 5 mismatches eingebaut: **ATG TTC CCA ACG AAA GCA ATC**.

Folgende Primer wurden dafür eingesetzt:

Tabelle 8: Primer für die Rescue-Experimente

	Forward Primer	Reverse Primer
Erstes Primerpaar	5'-GCC CTT ATG TTC CCG ACG AAA GCG ATA ATC TTG GTG C-3'	5'-G CAC CAA GAT TAT CGC TTT CGT CGG GAA CAT AAG GGC-3'
Zweites Primerpaar	5'-C GCC CTT ATG TTC CCA ACG AAA GCA ATA ATC TTG GTG C-3'	5'-G CAC CAA GCT TAT TGC TTT CGT TGG GAA CAT AGG GCG-3'

Zur Herstellung der *ncam1b*-mRNA wurde der Vektor mit NotI geschnitten und die Sp6-RNA-Polymerase verwendet. Den Morpholinlösungen wurden 0,1 ng/nl oder 0,2 ng/nl *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-mRNA beigefügt.

3.16 Klonierungen mit dem Multisite Gateway System (Invitrogen) und den Bausteinen des Tol2kits

Das Multisite Gateway System (Invitrogen) ermöglicht das modulare Kombinieren von DNA-Fragmenten (5'Promotor / Reporter gen / 3'UTR) in einem Expressionsvektor. Mit Hilfe von sogenannten „attachment sites“ können die Zielgene spezifisch in einen Vektor in der gewünschten Richtung kloniert werden. Das fertige Konstrukt ermöglicht, z.B. die Funktionsanalyse bestimmter DNA-Sequenzen.

Um das Multisite Gateway System erfolgreich im Zebrafisch einzusetzen, wurde der Tol2kit entwickelt (Kwan et al., 2007). Dieses Kit enthält Klone mit DNA-Sequenzen aus dem Zebrafischgenom und einen Expressionsvektor mit Transposon-Rückgrat. Dadurch verbessert sich die Integrationsrate der DNA-Konstrukte in das Zebrafischgenom. Der Tol2kit wurde mir freundlicherweise von Dr. Chi-Bin Chien (University of Utah, Dept. Of Neurobiology&Anatomy, Salt Lake City/USA) zur Verfügung gestellt.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von sogenannten CPE-Sequenzen in der 3'UTR der *ncam1a*-, *ncam1b*- und *st8sia2*-mRNA untersucht. Für die eingesetzten

Reporterkonstrukte wurde der Hb9-Promotor verwendet, um die DNA in den Motoneuronen im Zebrafisch zu exprimieren (Arber et al., 1999, Nakano et al., 2005). Die Reportergene im mittleren DNA-Fragment wurden den untersuchten Sequenzen angepasst. Für die Untersuchung der 3'UTR der *st8sia2*-mRNA wurde St8Sia2-EGFP verwendet und für die 3'UTR der *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-mRNA prenyliertes EGFP (Vektor aus dem Tol2kit). St8Sia2-EGFP enthält die Golgilokalisationssequenz von *st8sia2*, so dass EGFP, wie das Enzym St8Sia2, in der Golgimembran exprimiert wird. Prenyliertes EGFP wird aufgrund des lipophilen Rests in der Membran lokalisiert, ähnlich wie die Zelladhäsionsmoleküle Ncam1a und Ncam1b. Die komplette 3'UTR der *st8sia2*-mRNA wurde mit und ohne CPE-Sequenz („UUUUUAU“) in den 3'Vektor des Tol2kit kloniert. Im Rahmen einer von mir angeleiteten Diplomarbeit wurden auch die 3'UTRs von *ncam1a* und *ncam1b* mit und ohne die CPE-Elemente in den 3'Vektor aus dem Tol2kit kloniert (Fischer, 2010).

Folgende Konstrukte wurden mit den einzelnen Komponenten erstellt:

1. [Hb9-Promotor]-[*st8sia2-egfp*]-[3'UTR von *st8sia2*]
2. [Hb9-Promotor]-[*st8sia2-egfp*]-[3'UTR von *st8sia2* ohne CPE]
3. [Hb9-Promotor]-[prenyliertes EGFP]-[polyA]
4. [Hb9-Promotor]-[prenyliertes EGFP]-[3'UTR von *ncam1a* komplett]
5. [Hb9-Promotor]-[prenyliertes EGFP]-[3'UTR von *ncam1a* ohne CPEs]
6. [Hb9-Promotor]-[prenyliertes EGFP]-[3'UTR von *ncam1b*]
7. [Hb9-Promotor]-[prenyliertes EGFP]-[3'UTR von *ncam1b* ohne CPEs].

Zur Herstellung der Konstrukte wurden die Protokolle auf der Internetseite des Tol2kits (<http://chien.neuro.utah.edu/tol2kitwiki/index.php/Protocols>) verwendet und die Anleitung von Invitrogen zum MultiSite Gateway System („MultiSite Gateway Three-Fragment Vector Construction Kit“).

3.17 Auswertung der Zebrafischembryonen am Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta (Zeiss)

Die Besonderheit am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) ist, dass im Gegensatz zum Lichtmikroskop, ein Laser die Proben punktweise bestrahlt. Man bezeichnet deshalb die konfokalen Systeme als Punktscanner. Ein weiterer wichtiger Unterschied zum Lichtmikroskop ist der Einsatz einer konfokalen Blende, dem Pinhole. Über die Öffnung dieser Blende kann bestimmt werden, wieviel Licht von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene ausgeblendet wird. Die Größe des Pinholes bestimmt damit die Dicke des optischen Schnittes. Mit einem konfokalen LSM ist es somit möglich aus einer dicken Probe eine dünne Schicht abzubilden, die bei passenden Aufnahmebedingungen eine z-Ausdehnung von weniger als 500 nm aufweisen kann. Durch die Aufnahmen von mehreren Schnitten in übereinander liegenden Fokusebenen lassen sich 3D-Rekonstruktionen des Objekts erstellen (http://www.dpi.physik.uni-goettingen.de/Praktika/Biophysik/Versuche/2006w/Fluoreszenz_und_konfokale_Mikroskopie-Literatur-ZEISSgrundl.pdf).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendet LSM 510 Meta wurde 2001 von Zeiss auf den Markt gebracht. Das Prinzip des konfokalen Laser Scanning Mikroskops wurde bereits 1955 von Marvin Minsky entwickelt (MINSKY, 1988).

Die folgenden Fluoreszenzfarbstoffe wurden bei den Untersuchungen eingesetzt:

Tabelle 9: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe	Immission [nm]	Emission [nm]
Cy3	553	575
Alexa488	491	515

Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Sekundärantikörper gekoppelt sind, müssen zunächst die richtigen Laser ausgewählt werden. Für den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 wurde der DPSS- Laser (561 nm) und für Alexa 488 der Argon-Laser (488 nm). Zur Detektion des emittierten Lichts wurde eine Multitrack-Einstellung verwendet. Die Aufnahmen werden hierbei nicht simultan, sondern sukzessiv durchgeführt. Dies führt zu einer höheren Bildqualität, insbesondere, wenn sich die Immissions- und Emissionswellen zum Teil überschneiden.

3.17.1 Verwendete Optiken und Software zur Analyse der Präparate

3.17.1.1 Mikroskope und Objektive

Axioplan, Carl Zeiss	konventionelles Mikroskop mit Durchlicht und Fluoreszenzlicht, aufrecht <ul style="list-style-type: none">• Ph1 Plan NEOFLUAR 10x/0.30• Ph2 Plan NEOFLUAR 20x/0.50
SteREO.Lumar.V12, Carl Zeiss	Binokular mit Fluoreszenzlicht
LSM 510 Meta, Carl Zeiss	konfokales Laser Scanning Mikroskop, invers <ul style="list-style-type: none">• Plan Achromat 10x/0.45• Plan-Achromat 20x/0.8• C-Achromat 40x/1.2 W Korr

3.17.1.2 Verwendete Software zur Analyse und Auswertung

- LSM Image Examiner, Carl Zeiss

3.17.1.3 Verwendete Software zur Darstellung und statistischen Analyse

- Photoshop® CS2, Version 9.0.2, Adobe
- Office Excel 2007, Microsoft

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsmuster der Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie

4.1.1 Ncam1a und Ncam1b besitzen ein unterschiedliches Expressionsmuster im Nervensystem des Zebrafischembryos

Die Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie werden im Zebrafischembryo während der Entwicklung des Nervensystems räumlich und zeitlich unterschiedlich exprimiert (Mizuno et al., 2001). *In-situ*-Hybridisierungsdaten zeigen, dass die mRNA-Expression von *ncam1a* und *ncam1b* elf Stunden nach der Befruchtung („hours post fertilization“/hpf) beginnt (Mizuno et al., 2001). Um das Expressionsmuster der Zelladhäsionsmoleküle auf dem Proteinlevel im Zebrafischembryo zu detektieren wurden in der vorliegenden Arbeit spezifische Antikörper eingesetzt. Die polyklonalen Antikörper wurden mir freundlicherweise von Dr. Yoshihiro Yoshihara (RIKEN Brain Science Institute; Japan) zur Verfügung gestellt. Zur Expressionsanalyse wurden immunhistochemische Färbungen mit Wildtyp(WT)-Zebrafischembryonen in verschiedenen Stadien durchgeführt und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Die folgenden Abbildungen sind Totalprojektionen von Bilderstapeln, die mit dem Laser Scanning Mikroskop 510 Meta (Zeiss) aufgenommen wurden. Die Immunfärbungen gegen die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle, Ncam1a und Ncam1b, werden in dieser Arbeit immer in Magenta gezeigt.

Die Expression von *ncam1a* und *ncam1b* beginnt in der Segmentierungsperiode (10-24 hpf) (Kimmel et al., 1995, Mizuno et al., 2001). Im Verlauf dieser Periode entwickelt sich aus der Neuralplatte durch eine Einstülpung der ektodermalen Zellen zunächst eine Struktur, die einem Schiffskiel ähnelt (Hjorth und Key, 2002, Kimmel et al., 1995). Bei der darauffolgenden Abschnürung der Zellen bildet sich aus dem Kiel ein runder Stab, der über eine Hohlraumbildung zum Neuralrohr wird (Hjorth und Key, 2002). Bereits im Stadium der Kielbildung (ca. 11-12 hpf) ist die erste Proteinexpression von Ncam1a und Ncam1b nachweisbar (Abbildung 9). Bei einem Blick von dorsal auf den Bereich der Gehirnanlage ist eine Färbung mit dem Antikörper gegen Ncam1a zu erkennen (Abbildung 9 A). Die Immunfärbung gegen Ncam1a ist, wie die Verteilung der *ncam1a*-mRNA (Mizuno et al., 2001), zunächst nur im rostralen Bereich des Nervensystems zu finden. Ncam1b wird in diesem Stadium, wie die *ncam1b*-mRNA, in Form von zwei Streifen entlang des sich entwickelnden Neuralrohrs exprimiert (Abbildung 9 B).

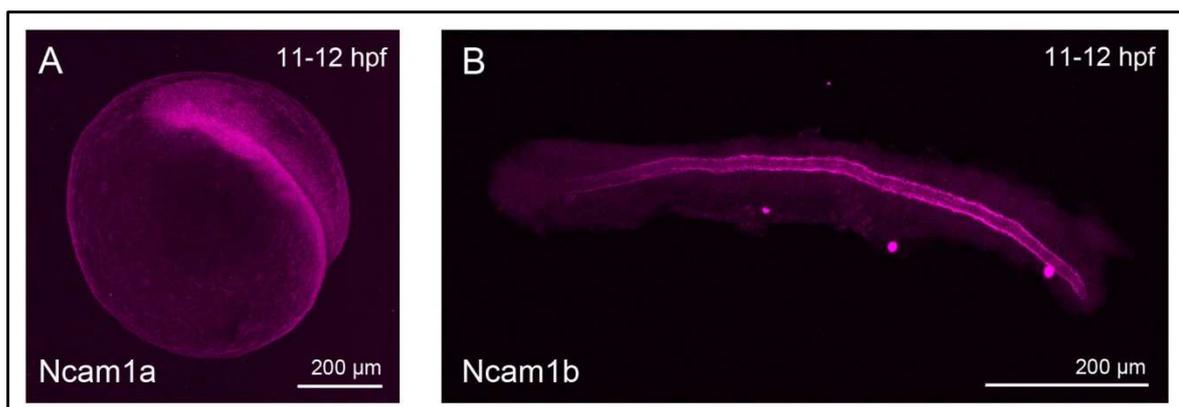


Abbildung 9: Ncam1a- und Ncam1b-Expression in WT-Zebrafischembryonen (11-12 hpf)

A-B) Konfokale Aufnahmen von ZF-Embryonen (11-12 hpf) mit Immunfärbungen gegen Ncam1a (A) oder Ncam1b (B). **A)** Zebrafischembryo mit Dotter (Ansicht von lateral; rostral liegt links); Ncam1a Expression im anterioren Neuralrohr vorhanden. **B)** Zebrafischembryo von dorsal ohne Dotter (anterior befindet sich links im Bild); Ncam1b wird streifenförmig im Neuralrohr exprimiert.

17 Stunden nach der Befruchtung zeigt sich ebenfalls ein räumlicher Unterschied bezüglich der Ncam1a- und Ncam1b-Expression (siehe Abbildung 10). Die Immunfärbung gegen Ncam1a ist weiterhin auf den rostralen Teil des Nervensystems beschränkt (Abbildung 10 A). Während sich die Expression von Ncam1b hauptsächlich im caudalen Teil des Nervensystems zeigt. Dies wird insbesondere bei einem Blick von lateral auf den Zebrafischembryo deutlich (Abbildung 10 C). Das Rückenmark (rm) und der sich entwickelnde otische Vesikel (ov) werden mit dem Ncam1b-Antikörper detektiert. Das streifenförmige Expressionsmuster ist im Stadium von 17 hpf in beiden Immunfärbungen, bei einem Blick von dorsal auf das sich entwickelnde Rückenmark zu erkennen (Abbildung 10 B und D). Ncam1a und Ncam1b werden in Form von drei Streifen entlang des Neuralrohrs exprimiert (Abbildung 10 D). Im Verlauf der Strukturierung des Neuralrohrs kommt es von einer Ncam1b-Expression in Form von zwei Streifen (11-12 hpf) zu einer drei-streifigen Expression 17 hpf.

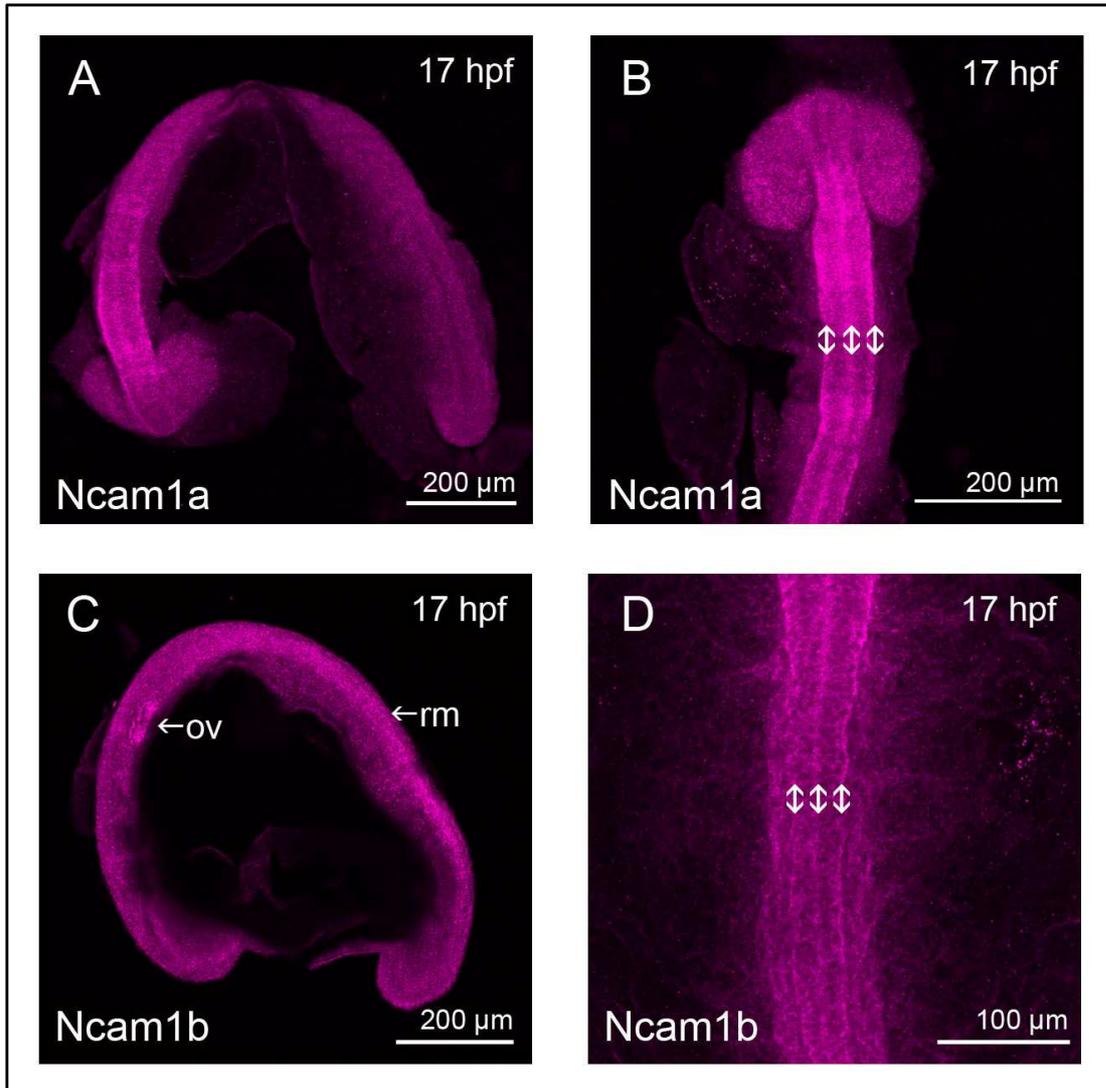


Abbildung 10: Ncam1a- und Ncam1b-Expression im WT-Zebrafischembryo (17 hpf)

A-B) Konfokale Aufnahmen von ZF-Embryonen (17 hpf) mit Immunfärbungen gegen Ncam1a (A, B) oder Ncam1b (C, D). **A)** ZF-Embryo ohne Dotter (cranial befindet sich links und caudal rechts im Bild): Ncam1a-Expression im cranialen Teil des sich entwickelnden Nervensystems. **B)** ZF-Embryo ohne Dotter; Aufnahme von dorsal auf den Kopfbereich: Ncam1a-Expression im sich entwickelnden Auge und in Form von drei Streifen entlang des Neuralrohrs. **C)** ZF-Embryo ohne Dotter (laterale Ansicht); Immunfärbung gegen Ncam1b im Rückenmark (rm) und auf den Zellen des sich entwickelnden otischen Vesikels (ov) zu erkennen. **D)** Ncam1b-Expression in drei Streifen entlang des sich entwickelnden Neuralrohrs (Blick von dorsal, cranial befindet sich oben im Bild).

Nach 24 Stunden, gegen Ende der Segmentierungsperiode, ist die Strukturierung der Gehirnanlage in Prosencephalon (Telencephalon und Diencephalon), Mesencephalon und Rhombencephalon abgeschlossen (Kimmel et al., 1995). Ncam1a wird nun in allen 3 Gehirnbereichen exprimiert (siehe Abbildung 11 A). Eine besonders starke Färbung fällt im sich entwickelnden olfaktorischen System (os) auf, das im Prosencephalon liegt (siehe Abbildung 11 A).

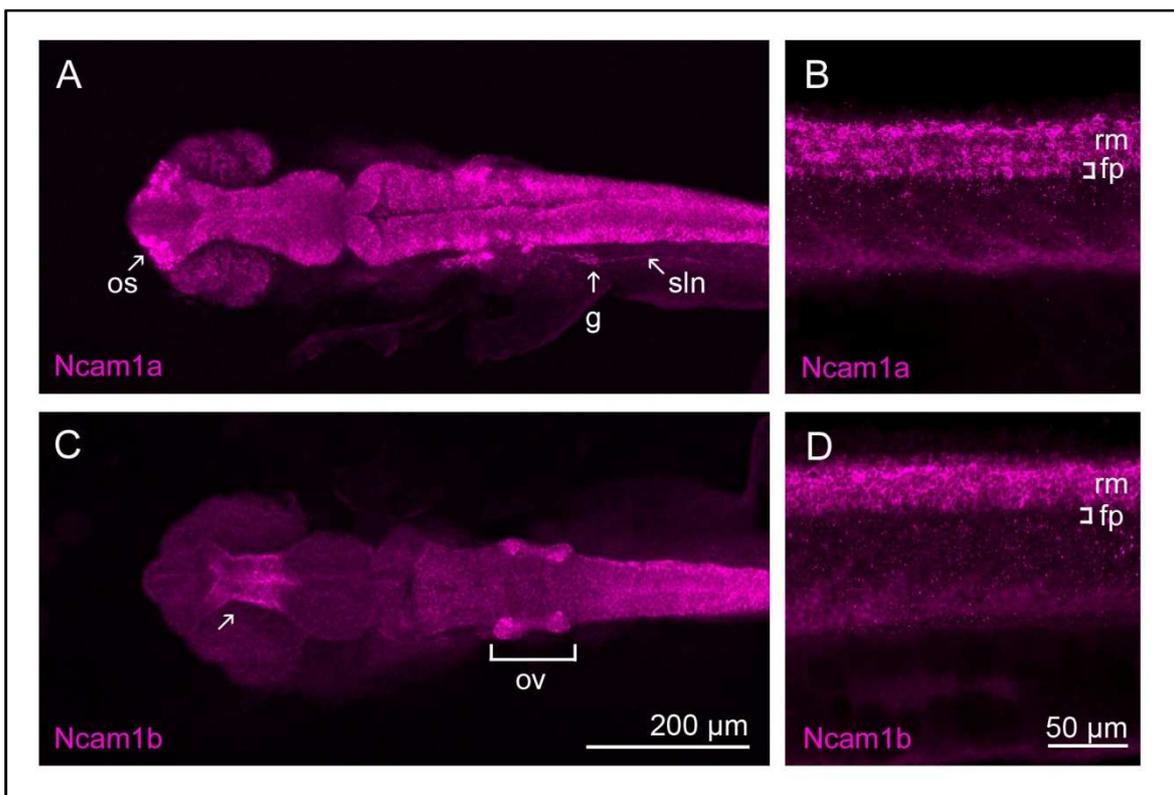


Abbildung 11: Ncam1a- und Ncam1b-Expression im WT-Zebrafischembryo (24 hpf)

A-D) Konfokale Aufnahmen von ZF-Embryonen (24 hpf) mit Immunfärbungen gegen Ncam1a (A, B) oder Ncam1b (C, D). A, C: Dorsale Ansicht des Kopfes; 10er Objektiv; 1xZoom. B, D: Laterale Ansicht des Schwanzes; 20er Objektiv; 2x Zoom. **A)** Ncam1a-Expression im Pros-, Mes- und Rhombencephalon zu detektieren, wobei eine verstärkte Expression im Bereich des olfaktorischen Systems (os) auffällt. Leichte Ncam1a-Expression auf dem posterioren Seitenliniennerv, inklusive dessen Ganglion, erkennbar. **B)** Die laterale Aufsicht auf den Schwanz zeigt eine Ncam1a-Expression im Bereich des Rückenmarks (rm), inklusive der Floorplate (fp, eckige Klammer). **C)** Ncam1b-Expression im Übergang zwischen Di- und Mesencephalon (siehe Pfeil), auf den Zellen des otischen Vesikels (ov) und auf den Neuronen im Rückenmark. **D)** Detektion von Ncam1b auf den Zellkörpern der Neurone im Rückenmark, exklusive der Floorplate.

Maßstabsbalken in C gilt für die Abbildungen A und C. Maßstabsbalken in D gilt für die Abbildungen B und D.

Abkürzungen: fp: Floorplate, g: Ganglion des Seitenliniennerv, os: olfaktorisches System, sln: Seitenliniennerv, rm: Rückenmark.

Eine leichte Ncam1a-Expression ist im sich entwickelnden Auge zu detektieren (Abbildung 11 A). Da der Embryo in Abbildung 11 A im Bereich des Rückenmarks leicht nach lateral verdreht ist, kann man hier auch die Ncam1a-Expression auf dem posterioren Seitenliniennerv (sln), inklusive dem Ganglion (g), erkennen. Die Färbung mit dem Ncam1b-Antikörper weist im WT-Zebrafischembryo (24 hpf) nur im Diencephalon und im anterioren Teil des Mesencephalons (siehe Pfeil in Abbildung 11 C), im otischen Vesikel (ov) und auf den Neuronen im Rückenmark (rm) Signale auf (Abbildung 11 C). Die Immunfärbung entlang des Rückenmarks ist von einer drei-streifigen zu einer bandförmigen Ncam1b-Expression übergegangen. Lediglich im Bereich des Di- und Mesencephalons ist die drei-streifige Ncam1b-Expression noch zu erkennen (Pfeil in Abbildung 11 C). Die lateralen Ansichten des Zebrafischschwanzes zeigen einen weiteren spezifischen Unterschied bezüglich der Expression von Ncam1a und Ncam1b (Abbildung 11 B und D). Beide Proteine werden auf den Neuronen im Rückenmark (rm) exprimiert, die Zellen der Floorplate (fp) werden jedoch nur mit dem Antikörper gegen Ncam1a detektiert (siehe eckige Klammer in Abbildung 11 B, D).

36 Stunden nach der Befruchtung ist die Expression von Ncam1a und Ncam1b in einem spezifischen Muster erkennbar und den verschiedenen Strukturen des Nervensystems zuzuordnen (Abbildung 12). Ncam1a wird relativ gleichmäßig auf allen Zellkörpern des zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, wobei die Expression im olfaktorischen Bulbus (ob) und der olfaktorischen Plakode (op), besonders hervorsteht (Abbildung 12 A). Nur eine Axonpopulation im ZNS weist eine Ncam1a-Expression auf: die posteriore Kommissur (pK). Sie ist in der Dorsalansicht des Kopfes zu erkennen (siehe Abbildung 12 A). Die Ncam1a-Expression innerhalb des Auges (siehe Abbildung 12 A) hat sich verstärkt, im Vergleich zum 24-hpf-Stadium (Abbildung 10). Im peripheren Nervensystem wird Ncam1a auf den Motorkomponenten der Cranialnerven V, VII (siehe Abbildung 12 C), IX und X (siehe Abbildung 13 B) und auf den Motoraxonen (ma) im Schwanz (siehe Abbildung 12 G) exprimiert. Im rostralen Teil des otischen Vesikels befindet sich eine Zellpopulation, die ebenfalls eine Ncam1a-Expression aufweist (Abbildung 12 E).

Die Ncam1b-Expression im zentralen Nervensystem (Abbildung 12 B, H) ist auf spezifische Bereiche beschränkt: olfaktorischer Bulbus (ob), Epiphyse (e), dorsales Diencephalon, anteriorer Teil des Mesencephalons, Cerebellumanlage (ca), Hinterhirn (h) und Rückenmark (rm). Im peripheren Nervensystem wird Ncam1b auf den Motoraxonen der Cranialnerven (Abbildung 12 D) und den Motoraxonen im Schwanz (Abbildung 12 H) exprimiert, wobei die Ncam1b-Immunfärbung hier schwächere Signale liefert, als die Ncam1a-Färbung (Abbildung 12 C und G).

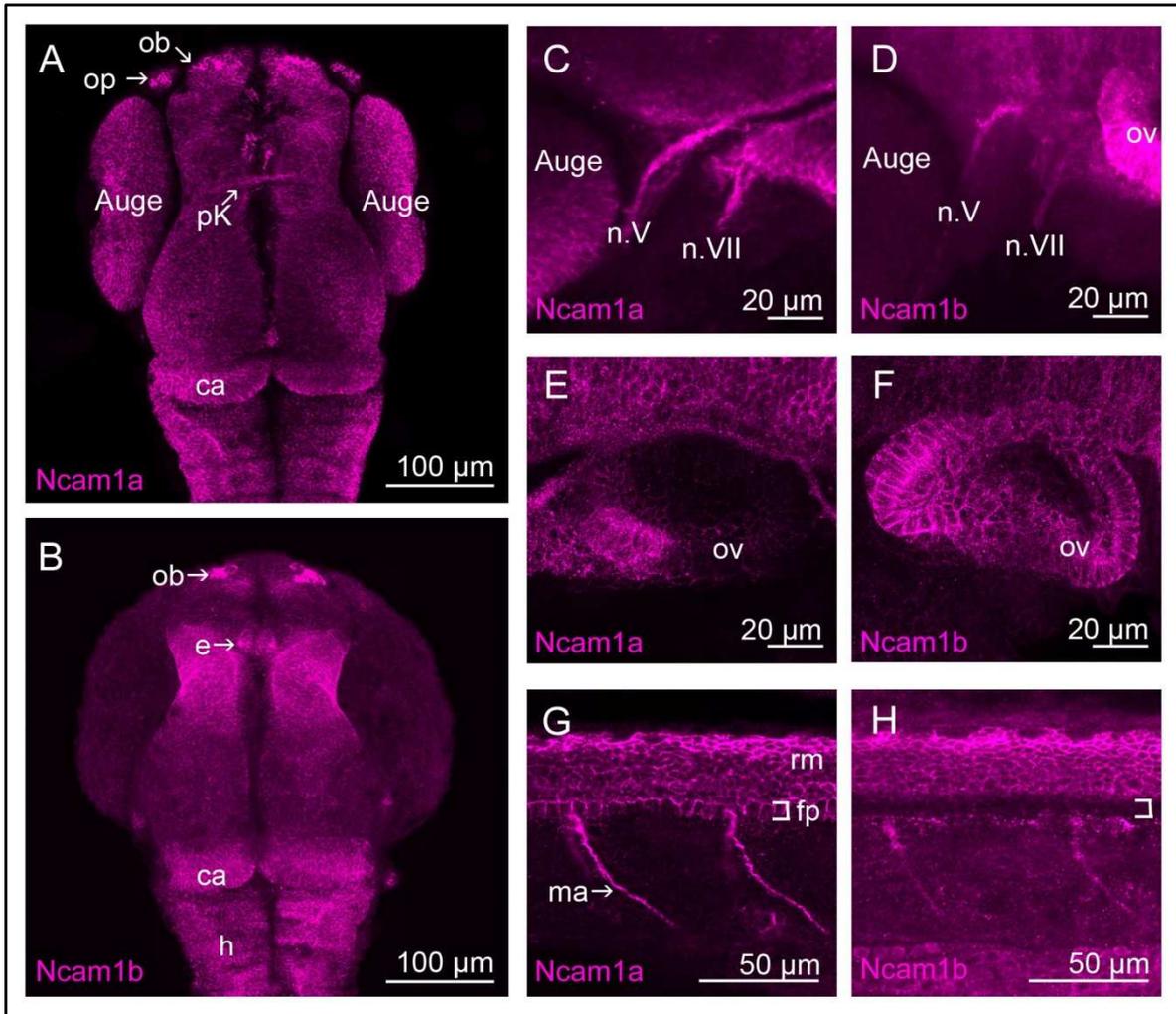


Abbildung 12: Ncam1a- und Ncam1b-Expression in WT-Zebrafischembryonen (36 hpf)

A-H) Konfokale Aufnahmen von ZF-Embryonen (36 hpf) mit Immunfärbungen gegen Ncam1a (A, C, E, G) oder Ncam1b (B, D, F, H). **A, B)** Dorsalansicht des Kopfes. **C-H)** Laterale Ansicht des Embryos (cranial befindet sich links im Bild). **A)** Ncam1a wird auf allen Zellkörpern des ZNS und auf den Axonen der posterioren Kommissur (pK) exprimiert. **B)** Die Immunfärbung gegen Ncam1b weist ein Signal im olfaktorischen Bulbus (ob), auf der Epiphyse (e), im dorsalen Mittelhirn, in der Cerebellumanlage (ca) und im Bereich des Hinterhirns (h) auf. **C, D)** Auf den Motoraxonen der Cranialnerven ist eine starke Färbung gegen Ncam1a (C) und eine schwächere Färbung gegen Ncam1b (D) zu erkennen. **E, F)** Die Zellen des otischen Vesikels exprimieren hauptsächlich Ncam1b (F). Nur im rostralen Teil wird Ncam1a exprimiert (E). **G, H)** Ncam1a und Ncam1b werden im Rückenmark (rm) und auf den Motoraxonen (ma) exprimiert, mit Ausnahme der Floorplate (fp), wo nur Ncam1a detektiert wird.

Abkürzungen: ca: Cerebellumanlage, e: Epiphyse, fp: Floorplate, h: Hinterhirn, ma: Motoraxone, rm: Rückenmark, ob: olfaktorischer Bulbus, op: olfaktorische Plakode, pK: posteriore Kommissur, WT: Wildtyp.

4.1.2 Expressionsmuster von Ncam1a und Ncam1b auf dem posterioren Seitenlinienorgan

Das Seitenlinienorgan ist ein sensorisches Netzwerk mit dem Fische und manche Amphibien Wasserbewegungen wahrnehmen (Coombs et al., 2001, Coombs et al., 2002). Es besteht aus mechanosensorischen Organen, den Neuromasten und dem Seitenliniennerv der die sensorischen Informationen zum Gehirn weiterleitet bzw. Informationen vom Gehirn zu den Neuromasten übermittelt (Chitnis et al., 2011). Die Neuromasten sind auf beiden Seiten des Fische in die Epidermis eingelagert (Ghysen und Dambly-Chaudière, 2007). Die Haarzellen in den Neuromasten detektieren die Wasserbewegungen über ihre, in eine gallertartige Cupula, eingelagerten Zilien. Je nachdem in welche Richtung die Zilien durch die Wasserströmungen bewegt werden

öffnen oder schließen sich Ionenkanäle, was zur De- oder Hyperpolarisierung der Haarzelle führt (Hudspeth, 1989).

Ncam1a wird auf dem Seitenliniennerv und dem Ganglion in allen untersuchten Stadien exprimiert (Abbildung 13 A und B). Beispielhaft werden hier die Stadien 24 hpf und 48 hpf gezeigt. Ncam1b ist lediglich in frühen Stadien

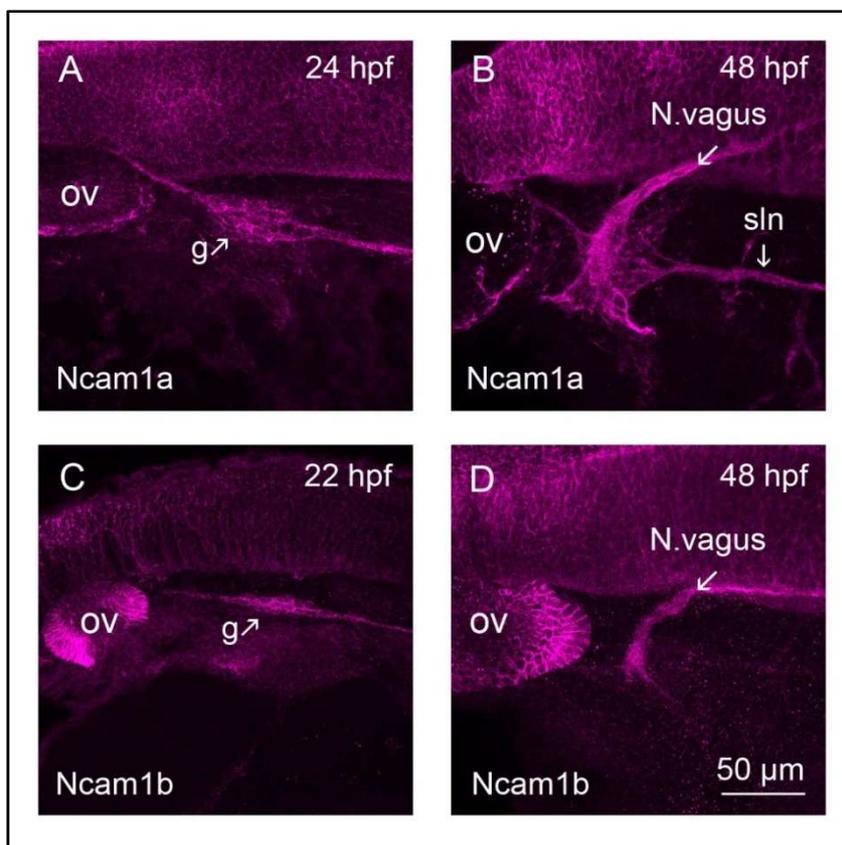


Abbildung 13: Ncam1a- und Ncam1b-Expression auf dem Seitenliniennerv

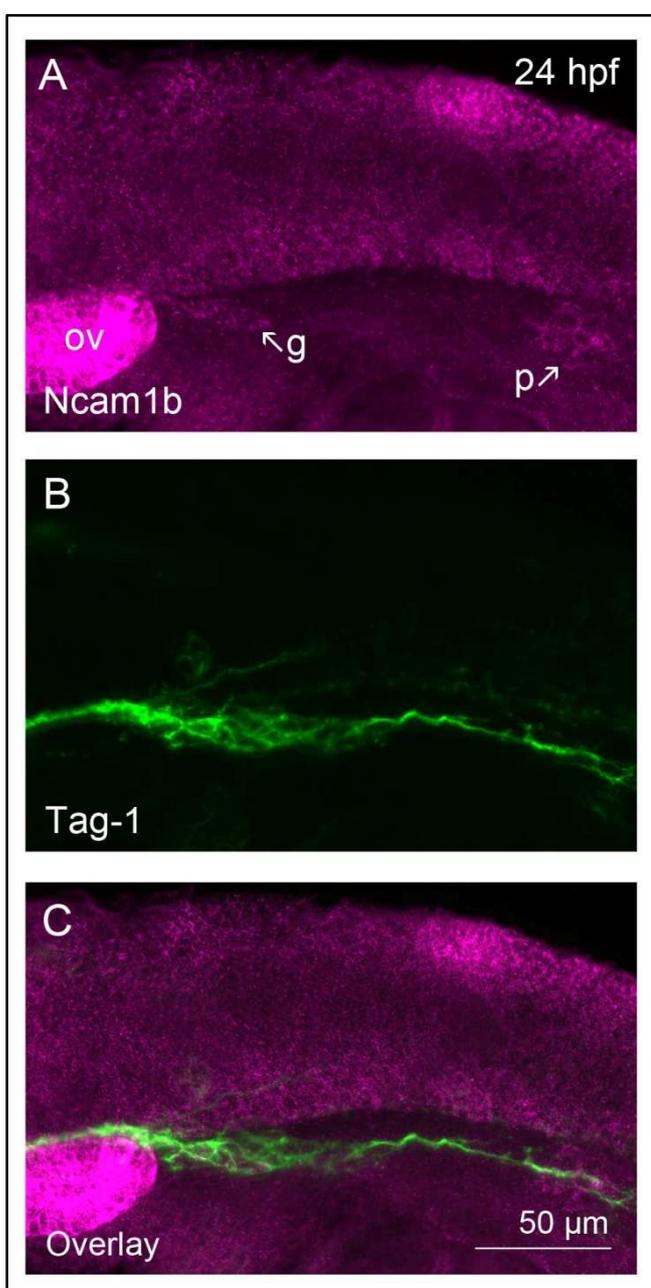
A-D Laterale Ansicht (rostral liegt links und caudal rechts im Bild) des Seitenliniennervs von immungefärbten WT-Zebrafischembryonen. **A, B**) Ncam1a-Expression auf dem Seitenliniennerv, inklusive dem Ganglion (g), in Zebrafischembryonen im Stadium von 24 hpf (A) und 48 hpf (B) erkennbar. Im Stadium von 48 hpf wird das Ganglion vom N. vagus verdeckt. **C**) Ncam1b-Expression auf dem Seitenliniennerv, inklusive des Ganglions im Stadium von 22 hpf. **D**) Keine Signale mit dem Ncam1b-Antikörper auf dem Seitenliniennerv im Stadium von 48 hpf zu detektieren.

Maßstabsbalken in D gilt für die Abbildung A-D.

Abkürzungen: g: Ganglion des Seitenliniennervs, sln: Seitenliniennerv, ov: otischer Vesikel.

(22 hpf) auf dem posterioren Seitenliniennerv, inklusive dem Ganglion, zu detektieren (Abbildung 13 C). Bereits im Stadium von 24 hpf ist die Expression deutlich reduziert (siehe Abbildung 14 A) und im Stadium von 48 hpf ist Ncam1b in diesem Bereich nicht mehr zu detektieren (Abbildung 13 D). In Abbildung 13 ist ebenfalls zu erkennen, dass Ncam1a und Ncam1b auf dem zehnten Cranialnerv, dem N. vagus, exprimiert werden.

Eine schwache Expression von Ncam1b ist 24 hpf auf dem Ganglion (g) des Seitenliniennervs, wie auch auf dem Neuromasten-Primordium (p, in Abbildung 14 A) nachweisbar. Die Färbung des Seitenliniennervs gegen Tag-1 zeigt den Verlauf des Nerven 24 hpf (Abbildung 14 B). Im Overlay der beiden Immunfärbungen wird deutlich, dass der Seitenliniennerv während dessen Ausbildung in Kontakt mit dem Primordium



steht (Abbildung 14 C).

Abbildung 14: Ncam1b-Expression auf dem Primordium des Seitenlinienorgans

A-C) Laterale Ansicht eines WT-Zebrafischembryos (24 hpf) immungefärbt gegen Ncam1b (**A**) und Tag-1 (**B**). **A)** Ncam1b-Expression auf dem otischen Vesikel (ov), sich entwickelnden Rückenmark, Ganglion (g) des Seitenliniennervs und Primordium (p) des Seitenlinienorgans. **B)** Tag-1-Expression auf dem Seitenliniennerv, inklusive dem Ganglion. **C)** Überlagerung der beiden Immunfärbungen. Der sich entwickelnde Seitenliniennerv steht in Kontakt mit den Zellen des Primordiums.

Maßstabsbalken in C gilt für die Bilder A-C.

Abkürzungen: g: Ganglion des Seitenliniennervs, ov: otischer Vesikel, p: Primordium des Seitenlinienorgans.

48 Stunden nach der Befruchtung weist die Immunfärbung gegenüber 36 hpf keine weiteren Veränderungen bezüglich der Ncam1a- bzw. Ncam1b-Expression auf. Da das Ziel dieser Studie die Untersuchung der Funktion der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle während der Entwicklung des Zebrafisch-Nervensystems ist und die Hauptentwicklung innerhalb der ersten beiden Tagen stattfindet (Kimmel et al., 1995), wurden keine weiteren Stadien untersucht.

4.1.3 Expression von Ncam2 ist auf das Prosencephalon beschränkt

Die Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie im Zebrafisch besitzen ein weiteres Mitglied: Ncam2 (Mizuno et al., 2001). Die bereits publizierten Daten bezüglich der *ncam2*-mRNA-Expression im Zebrafischembryo weisen einen deutlichen Unterschied zur *ncam1a*- und *ncam1b*-Expression auf (Mizuno et al., 2001). Die *ncam2*-Expression beginnt erst im Stadium von 30 hpf in kleinen Zellgruppen sekundärer Neurone im Tel- und Diencephalon (Mizuno et al., 2001). Die Immunfärbungen gegen Ncam2 in dieser Arbeit bestätigen diesen Unterschied und weisen eine ähnliche Verteilung der Proteine

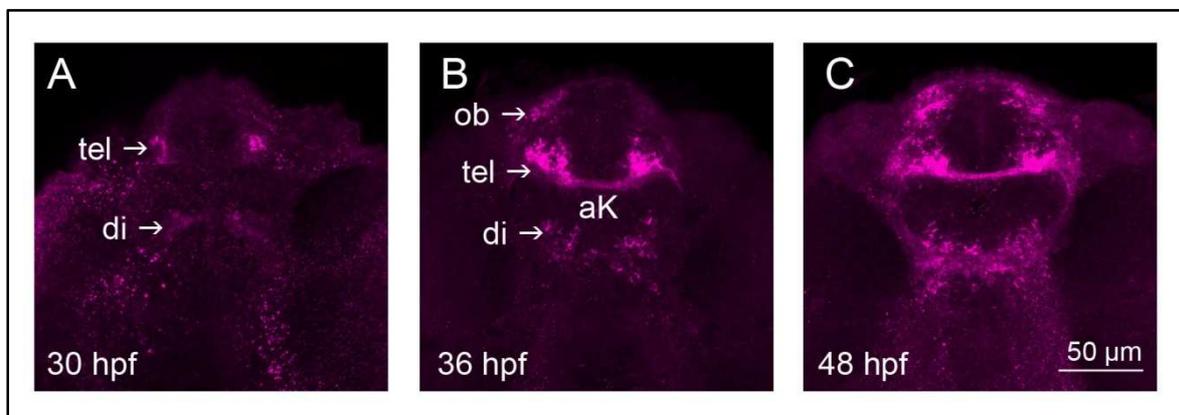


Abbildung 15: Ncam2 (OCAM)-Expression in WT-Zebrafischembryonen

A-C) Konfokale Aufnahmen von der ventralen Seite des Kopfes verschiedener gegen Ncam2 immungefärbter WT-Zebrafischembryonen im Alter von 30-48 hpf. Rostral befindet sich oben und caudal unten im Bild. Immunfärbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen Ncam2 (Miyasaka et al, 2009). **A)** Start der Ncam2-Expression im Alter von 30 hpf im Telencephalon (tel) und im Diencephalon (di). **B)** Die Ncam2-Expression weitet sich aus, über die anteriore Kommissur (aK) und im olfaktorischen Bulbus (ob). **C)** Im 48-hpf-Embryo ist die Ncam2-Expression komplett ausgebildet. Außerhalb des olfaktorischen Systems ist keine Ncam2-Expression zu finden. Der Maßstabsbalken in C gilt für A-C.

Abkürzungen: aK: anteriore Kommissur, di: Diencephalon, hpf: hours post fertilization (Stunden nach der Befruchtung), ob: olfaktorischer Bulbus, tel: Telencephalon.

auf (siehe Abbildung 15). Die ersten Signale zeigen sich 30 hpf in Zellpopulationen des Tel- und Diencephalons (Abbildung 15 A). Die Expression breitet sich im Verlauf der Entwicklung des Embryos weiter aus (Abbildung 15 B und C). Im Stadium von 36 hpf sind Signale im Bereich der olfaktorischen Bulbi (ob) und auf der anterioren Kommissur (aK) hinzugekommen. Die Anzahl der Zellen, die im Tel- und Diencephalon Ncam2 exprimieren hat sich vergrößert (Abbildung 15 B und C).

48 Stunden nach der Befruchtung ist eine bilateral-symmetrische Verteilung von Ncam2 im Tel- und Diencephalon zu erkennen (Abbildung 15 C). Neurone im Bereich der olfaktorischen Bulbi, weitere Zellpopulationen im Telencephalon, die auf Höhe der anterioren Kommissur liegen und Neurone im Bereich des Diencephalons exprimieren Ncam2. Die anteriore Kommissur (aK) zeigt auch im Stadium von 48 hpf eine Immunfärbung gegen Ncam2 (Abbildung 15 C). Der restliche Körper des Zebrafischembryos weist keine Signale in der Immunfärbung mit dem Ncam2-Antikörper auf (ohne Abbildung). Weitere Stadien wurden nicht analysiert, da die Expression von Ncam2 erst nach der Entwicklung der wichtigen Axontrakte beginnt und auf sekundäre Neurone im Vorderhirn beschränkt ist (Mizuno et al., 2001).

4.2 Polysialylierung der NCAM-Moleküle im Zebrafischembryo

4.2.1 Morpholino-Knockdown von *ncam1a* und *ncam1b*

NCAM1 wird in Säugetieren posttranslational mit dem Polysaccharid Polysialinsäure (polySia) modifiziert (Becker et al., 1996, Angata und Fukuda, 2003, Mühlhoff et al., 2009, Hildebrandt et al., 2010, Eggert et al., 2011). Um die Frage zu klären, ob die beiden Paraloge Ncam1a und Ncam1b im Zebrafischembryo posttranslational polysialyliert werden, wurden Morpholino-Knockdown-Experimente mit „Wholemount“-Immunfärbungen gegen polySia kombiniert. Dafür wurde zunächst die Effektivität der eingesetzten Morpholinos bezüglich der Inhibition der Proteinexpression mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen Ncam1a und Ncam1b überprüft. Es wurden jeweils zwei Morpholinos gegen *ncam1a* und *ncam1b* getestet (siehe Tabelle 7). Einer der Morpholinos bindet direkt am Start-Codon und ein weiterer an einer Sequenz, die sich „upstream“ vom Start-Codon in der 5'-UTR („untranslated region“/nicht-translatierter Bereich) befindet. Beide Morpholinos blockieren die Translation der Ziel-mRNA. Im Fall von *ncam1a* zeigt sich kein

Unterschied zwischen den Morpholinos, bezüglich des Knockdown-Effekts und des Überlebens der Embryonen. Für die folgenden Versuche wurde der *ncam1a*-Morpholino verwendet, der in der 5'UTR bindet, da dieser für die anschließenden „Rescue“-Experimente besonders geeignet ist.

Der *ncam1b* 5'-UTR-Morpholino führte zu einer stark erhöhten Letalität der Embryonen und keinem deutlichen Phänotyp. Für den Knockdown von *ncam1b* wurde deshalb in dieser Studie ein Morpholino eingesetzt, das direkt am Start-Codon bindet (Tabelle 7). Die spezifische Inhibition der Translation der Ziel-mRNA wurde durch die Injektion der Morpholinos mit anschließender Immunfärbung gegen die Proteine Ncam1a bzw. Ncam1b getestet (siehe Abbildung 16).

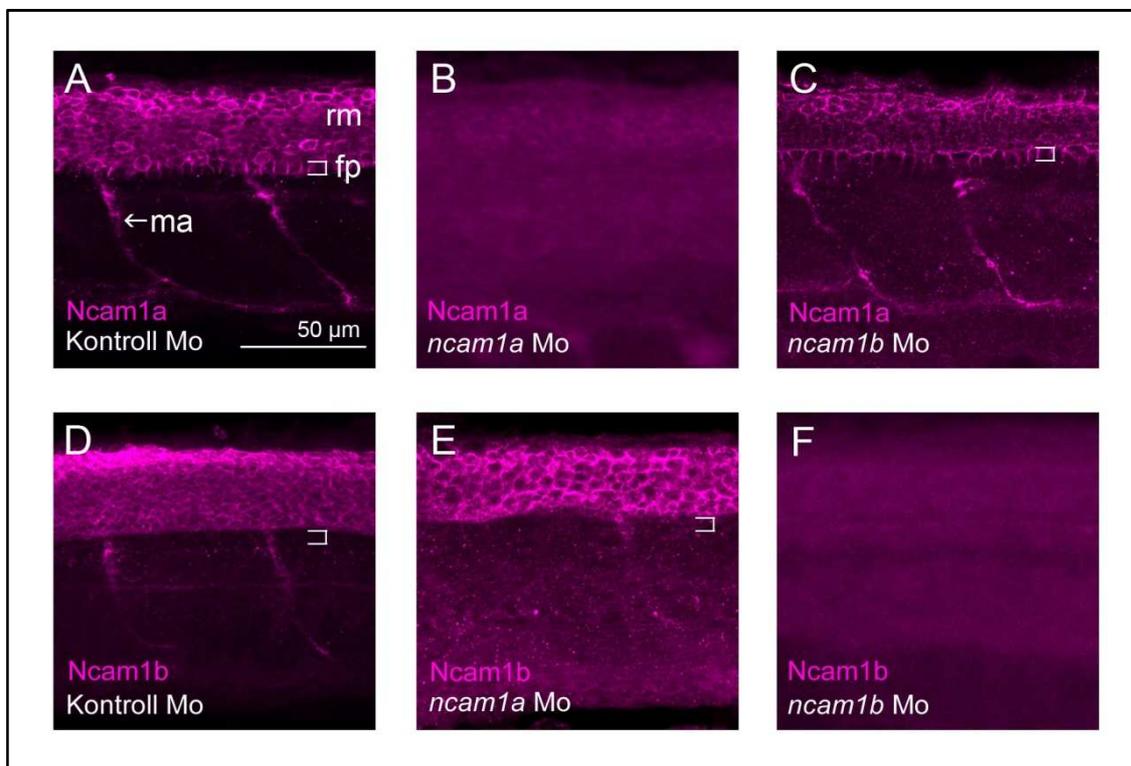


Abbildung 16: Spezifische Inhibition der Proteinexpression durch die Morpholinos gegen *ncam1a* bzw. *ncam1b*

A-F) Konfokale Aufnahmen von Zebrafischembryonen (36 hpf), nach Morpholino-Injektion und Immunfärbungen gegen Ncam1a (A-C) oder Ncam1b (D-F). Es wird jeweils ein Abschnitt im Zebrafischschwanz von lateral gezeigt (cranial befindet sich links im Bild). **A, D)** Die Expression von Ncam1a (A) bzw. Ncam1b (D) nach Injektion des Kontroll-Morpholino, zeigt sich wie im WT-Embryo. **B, C)** Nach Injektion des *ncam1a*-Morpholinos kann Ncam1a nicht mehr mit dem spezifischen Antikörper detektiert werden (B). Im Gegensatz dazu sind die Signale mit dem Ncam1a-Antikörper nach Injektion des *ncam1b*-Morpholinos weiterhin in den Embryonen zu erkennen (C). **E, F)** Die Expression von Ncam1b wird durch den *ncam1a*-Morpholino unterdrückt (F), nicht jedoch durch die Injektion des *ncam1a*-Morpholinos (E).

Der Maßstabsbalken in A gilt für A-F.

Abkürzungen: fp: Floorplate, ma: Motoraxon, Mo: Morpholino, rm: Rückenmark, WT: Wildtyp.

Nach Injektion eines Standard-Kontrollmorpholinos weist die Immunfärbung gegen Ncam1a (siehe Abbildung 16 A) und Ncam1b (siehe Abbildung 16 D) Signale wie im Wildtyp-Embryo auf (siehe Abbildung 12 G, H). Ncam1a und Ncam1b werden im Rückenmark (rm) und auf den Motoraxonen (ma) exprimiert, mit Ausnahme der Floorplate (fp), die nur in der Immunfärbung gegen Ncam1a zu sehen ist (Abbildung 16 A und D).

Anhand der Ncam1a-Immunfärbungen wird gezeigt, dass der Morpholino gegen *ncam1a* erfolgreich die Expression von Ncam1a blockiert (Abbildung 16 B), während die Injektion des *ncam1b*-Morpholinos die Ncam1a-Expression nicht beeinflusst (Abbildung 16 C). Ebenso zeigt die Immunfärbung gegen Ncam1b, dass die Injektion des *ncam1b*-Morpholinos (Abbildung 16 F), nicht jedoch die Injektion des *ncam1a*-Morpholinos (Abbildung 16 E), die Expression von Ncam1b unterdrückt. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die beiden eingesetzten Morpholinos, trotz ähnlicher Gensequenz von *ncam1a* und *ncam1b*, spezifisch die Expression des gewünschten Proteins verhindern.

Zur Analyse der Effekte durch die Morpholino-Injektion wurde auch eine Statistik zum Überleben der Zebrafischembryonen erstellt (siehe Abbildung 17). In drei verschiedenen Stadien wurden die lebenden Embryonen gezählt, um zu erfassen, in welchem Zeitraum die meisten Embryonen sterben. Die Anzahl der Embryonen zu Beginn der Zählung wurde auf 100 % gesetzt. Wildtyp(WT)-Embryonen wurden in die Statistik mit aufgenommen, um die Zebrafisch(ZF)-Eier zu erfassen, die z.B. aufgrund fehlender Befruchtung sterben. Der Vergleich der WT-Embryonen mit den Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden, ermöglicht die Erfassung des Effekts der Injektion. Im Stadium von 36 hpf leben 88,6 % der WT-Embryonen (siehe Abbildung 17). Das bedeutet, dass 11,4 % der Embryonen aufgrund mangelnder Qualität des Geleges sterben. Von den Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden, leben 78,3 % im Stadium von 36 hpf (Abbildung 17). Dies zeigt, dass nur aufgrund des Vorgangs der Injektion ca. 10 % der Embryonen sterben. Durch die Injektion des *ncam1a*-Morpholinos sterben bis zum Stadium von 36 hpf 34,6 % der Embryonen. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Statistik nach Injektion des *ncam1b*-Morpholinos, hier sterben 33 % der Embryonen (Abbildung 17). Nach Injektion beider Morpholinos, in jeweils der halben Konzentration, sterben 30,4 % der Embryonen (Abbildung 17). Diese Auswertung zeigt, dass, im Vergleich mit den Kontroll-Embryonen, ca. 10 % der ZF-Embryonen aufgrund der spezifischen Morpholinos sterben.

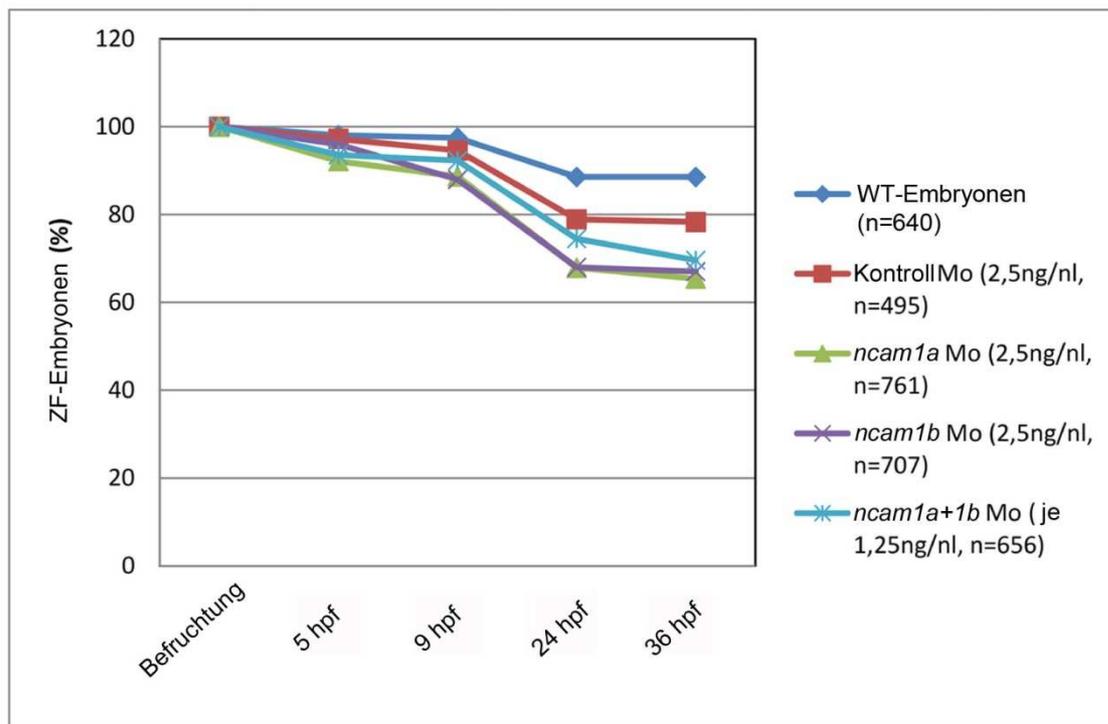


Abbildung 17: Überlebensstatistik der Zebrafischembryonen

In dieser Abbildung wird die prozentuale Auswertung der lebenden Zebrafischembryonen, nach Morpholino-Injektion gezeigt. Nicht-injizierte Wildtyp-Embryonen wurden in die Auswertung mit aufgenommen, da auch nicht befruchtete Eier innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Befruchtung sterben und dies die Statistik verfälschen würde. Die Injektion der Morpholinos fand jeweils im 1-2 Zellstadium statt, d.h. 0-1 Stunde nach der Befruchtung (hours post fertilization/hpf). Im Stadium von 36 hpf leben noch 88,6 % der WT-Embryonen, 78,3 % der Kontroll-Morpholino injizierten Embryonen, 69,6 % der Embryonen, die mit *ncam1a*- und *ncam1b*-Morpholino injiziert wurden, 67 % der Embryonen, die mit dem *ncam1b*-Morpholino injiziert wurden und 65,4 % der Embryonen, die mit dem *ncam1a*-Morpholino injiziert wurden.

Abkürzungen: hpf: „hours post fertilization“/Stunden nach der Befruchtung, Mo: Morpholino, WT: Wildtyp, ZF: Zebrafisch.

4.2.2 PolySia, eine posttranslationale Modifikation von Ncam1a und Ncam1b

Um die Frage zu klären, ob die Paraloge Ncam1a und Ncam1b polysialyliert werden, wurden Morpholino-Knockdown-Experimente mit Immunfärbungen gegen polySia kombiniert (siehe Abbildung 18). Die Immunfärbungen gegen polySia wurden in dieser Arbeit immer mit dem monoklonalen Antikörper 735 durchgeführt und werden in rot dargestellt (Abbildung 18, linke Spalte). Der Effekt der Morpholinos in Bezug auf die Proteinexpression der beiden Zelladhäsionsmoleküle wurde mittels Immunfärbung mit

dem polyklonalen Antikörper 704 detektiert (magenta, Abbildung 18). Die Immunfärbungen werden in einem Schwanzabschnitt von Morpholino-injizierten Zebrafischembryonen (36 hpf) gezeigt. Die Injektion eines Standard-Kontrollmorpholinos verändert die polySia-Verteilung im Vergleich zum WT-Embryo nicht (Abbildung 18 A).

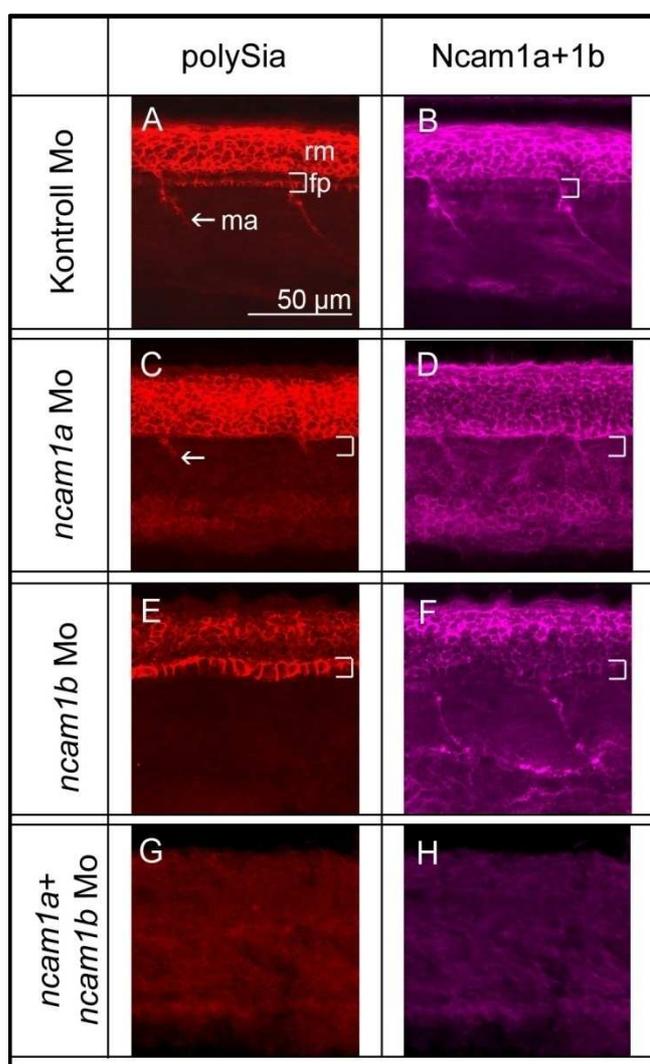


Abbildung 18: PolySia, eine posttranslationale Modifikation von Ncam1a und Ncam1b

A-H) Laterale Ansicht eines Schwanzabschnitts von Morpholino-injizierten und immungefärbten Zebrafischembryonen (36 hpf). In der linken Spalte ist die Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper (mAk) 735 gegen polySia in rot zu sehen und in der rechten Spalte die Immunfärbung mit dem polyklonalen Ak 704 gegen Ncam1a+1b in magenta. **A, B)** polySia- und Ncam1a+1b-Expression nach Injektion des Kontroll-Morpholinos, wie im Wildtyp auf den Zellen im Rückenmark, inklusive der Floorplate (eckige Klammer) und auf den Motoraxonen. **C, D)** Nach *ncam1a*-Knockdown keine Immunfärbung auf den Floorplate-Zellen zu detektieren. Die Neurone im Rückenmark und die Motoraxone werden weiterhin angefärbt. **E)** Die polySia-Expression im Rückenmark nach dem *ncam1b*-Knockdown reduziert und auf den Motoraxonen unterhalb des Detektionslevels. Die polySia-Expression auf den Floorplate-Zellen ist deutlich zu erkennen. **F)** Ncam1a-Expression auf den Neuronen im Rückenmark und auf den Motoraxonen vorhanden. **G, H)** Embryonen nach Doppelknockdown weisen mit beiden Antikörpern keine Signale auf.

Der Maßstabsbalken in Bild A gilt für die Bilder A-H.

Auf den Zellen im Rückenmark (rm), inklusive der Floorplate (fp, eckige Klammer) und auf den Motoraxonen (ma) ist eine Immunfärbung gegen polySia erkennbar (rot, Abbildung 18 A). Die gleiche Verteilung zeigt sich auch bezüglich der Zelladhäsionsmoleküle in der Immunfärbung mit dem polyklonalen Antikörper 704 (magenta, Abbildung 18 B).

Durch die Injektion eines Morpholinos gegen *ncam1a* bzw. *ncam1b*, entstehen spezifische polySia-Expressionsmuster im Zebrafischembryo. Dies ist in der lateralen Ansicht des Zebrafischschwanzes zu erkennen (siehe Abbildung 18, C und E). Nach dem Knockdown von *ncam1a* werden die Zellen der Floorplate nicht mehr gegen polySia gefärbt (siehe eckige Klammer in Abbildung 18 C). Die polySia-Expression auf den restlichen Zellen im Rückenmark und auf den Motoraxonen (siehe Pfeil in Abbildung 18 C) bleibt bestehen. Das gleiche Muster findet man mit dem polyklonalen Antikörper (pAk) 704, der nun nur die Expression von Ncam1b aufzeigt (Abbildung 18 D). Das Fehlen der Floorplate-Detektion in beiden Immunfärbungen weist darauf hin, dass nur Ncam1a und nicht Ncam1b in diesem Bereich exprimiert wird und, dass Ncam1a auf den Floorplate-Zellen polysialyliert vorliegt.

Nach Injektion des *ncam1b*-Morpholinos ist die Immunfärbung gegen polySia auf den Motoraxonen nicht mehr zu detektieren und auf den Zellen des Rückenmarks (mit Ausnahme der Floorplate) deutlich reduziert (Abbildung 18 E). Die Immunfärbung gegen polySia tritt nach dem *ncam1b*-Knockdown auf den Zellen der Floorplate besonders deutlich hervor (Abbildung 18 E). Die Immunfärbung mit dem Antikörper 704 zeigt nach dem *ncam1b*-Knockdown die Expression von Ncam1a auf. Es ist eine gleichmäßige Verteilung von Ncam1a auf allen Zellen des Rückenmarks, inklusive der Floorplate, und auf den Motoraxonen erkennbar (Abbildung 18 F). Der Unterschied zur polySia-Expression in Abbildung E, ist möglicherweise ein Hinweis dafür, dass nicht alle Ncam1a-Moleküle polysialyliert sind. Durch die Injektion beider Morpholinos wird die Expression von Ncam1a und Ncam1b unterdrückt (Abbildung 18 H). Die Färbung mit dem polyklonalen Antikörper 704 zeigt damit die Effektivität der Morpholinos bezüglich der Inhibition der Expression von Ncam1a und Ncam1b. In den Doppel-Knockdown-Embryonen ist keine polySia-Expression im Bereich des Rückenmarks zu detektieren (Abbildung 18 G). Die leichte Rotfärbung des Embryos ist entweder auf eine unspezifische Fluoreszenz, die durch den Vorgang der Fixierung entsteht, oder auf ungebundenen, nicht herausgewaschenen Sekundärantikörper zurückzuführen.

Die Ergebnisse dieses Versuchs weisen darauf hin, dass die Ncam1-Paraloge, Ncam1a und Ncam1b, im Zebrafischembryo polysialyliert vorliegen und, dass sie die Hauptträger von polySia im Zebrafischembryo sind.

4.2.3 PolySia-Ncam1a überwiegt im cranialen und polySia-Ncam1b im caudalen Teil des Zebrafisch-Nervensystems

Um eine genaue Vorstellung über die räumliche Verteilung von polySia-Ncam1a und polySia-Ncam1b zu bekommen, wurde eine Quantifizierung mit Hilfe eines EndoN-GFP-

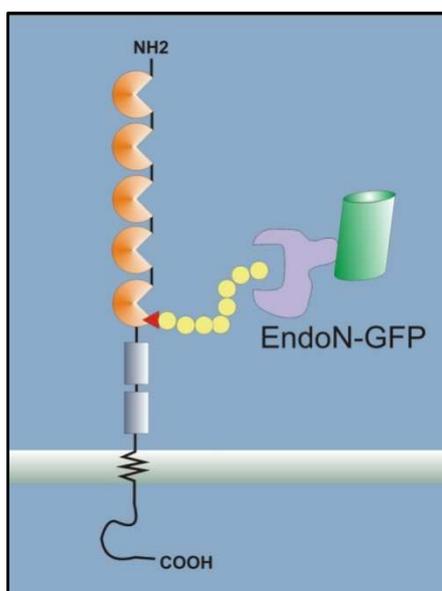


Abbildung 19: Schema der EndoN-GFP Reaktion

Das Schema zeigt ein Zelladhäsionsmolekül der NCAM-Familie, aufgebaut aus 5 Ig-Domänen (orange), 2 Fibronektin-Domänen (dunkelgrau), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne. EndoN-GFP (lila) bindet an das Ende der polySia-Kette (gelbe Kreise). Die Detektion erfolgt über GFP.

Reporterproteins durchgeführt, das von A. Jokilammi hergestellt wurde (Jokilammi et al., 2004). EndoN ist ein Enzym das spezifisch an die polySia-Kette bindet und diese degradiert (siehe Schema in Abbildung 19) (Rutishauser et al., 1985, Hallenbeck et al., 1987). Das hier verwendete Enzym wurde so modifiziert, dass es polySia binden kann, dieses jedoch nicht abbaut. Desweiteren wurde EndoN an das Reportermolekül GFP gekoppelt, um die Verbindung polySia-EndoN quantitativ auswerten zu können. Durch die Bindung nur eines Enzymmoleküls je polySia-Modifikation, findet keine Verstärkung des polySia-Signals, wie bei einer Immunfärbung statt. Die Reaktion erfolgt im Gegensatz zur Immunfärbung in nur einem Schritt. Das Signal ist abhängig von der Konzentration des eingesetzten Enzyms. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde immer die gleiche Konzentration verwendet und die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitätsanalyse der injizierten Zebrafischembryonen erfolgte mit der Software „LSM Image Examiner“. Um Schwankungen in der EndoN-GFP-Konzentration zu egalisieren wurden die Werte

der mit dem Kontroll-Morpholino injizierten ZF-Embryonen (36 hpf) bei jedem Versuch separat auf 100 % gesetzt.

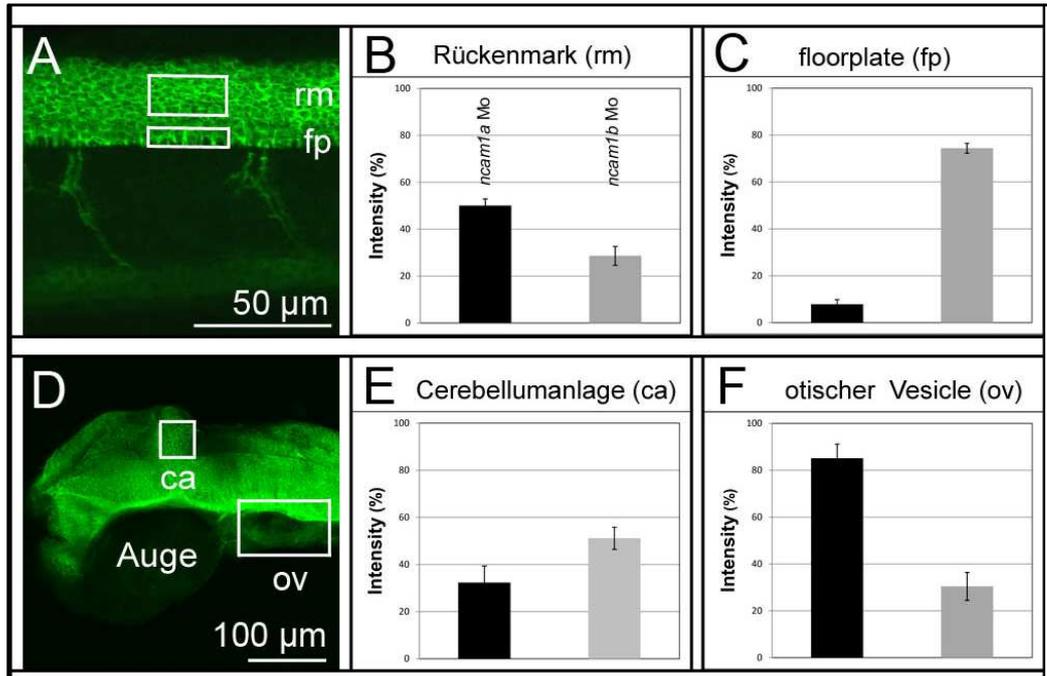


Abbildung 20: Quantifizierung der polySia-Expression in verschiedenen Bereichen des Zebrafisch-Nervensystems (36 hpf)

A, D) Laterale Ansicht des Schwanzes (A) bzw. des Kopfes (D) eines mit Kontroll-Morpholino injizierten und mit EndoN-GFP inkubierten ZF-Embryos (36 hpf). Die Rechtecke markieren die ausgewerteten Bereiche. **B, C, E, F)** Die Auswertung der EndoN-GFP-Fluoreszenz erfolgte mit der Software LSM-Image-Examiner. Die Fluoreszenzintensität der, mit dem Kontroll-Morpholino injizierten, Embryonen wurde auf 100 % gesetzt und ist in den Diagrammen nicht enthalten. Die schwarzen Balken zeigen die Fluoreszenzintensität (%) nach Injektion des *ncam1a*-Morpholinos und die grauen Balken nach Injektion des *ncam1b*-Morpholinos **B)** Im Rückenmark reduziert sich die Fluoreszenzintensität auf 50,1 % nach Injektion des *ncam1a*-Morpholinos und nach Injektion des *ncam1b*-Morpholinos auf 28,6 %. **C)** Im Bereich der Floorplate-Zellen reduziert sich die Fluoreszenzintensität auf 7,8 % (*ncam1a*-Mo) bzw. auf 74,4 % (*ncam1b*-Mo). **E)** Durch die Injektion des *ncam1a*-Morpholinos reduziert sich die Fluoreszenzintensität auf 32,3 % in der Cerebellumanlage (ca) und durch die Injektion des *ncam1b*-Morpholinos auf 52,5 %. **F)** Im otischen Vesikel reduziert sich die Intensität nach Injektion des *ncam1a*-Morpholinos auf 85,1 % und nach Injektion des *ncam1b*-Morpholinos auf 30,5 %.

In Abbildung 20 A und D, sind die Bereiche gezeigt, die bei der Auswertung untersucht wurden. Die laterale Ansicht des Zebrafischschwanzes (siehe Abbildung 20 A) eines mit Kontroll-Morpholino injizierten und mit EndoN-GFP behandelten ZF-Embryos zeigt die Zellen des Rückenmarks (rm), inklusive der Floorplate (fp). Beide Bereiche wurden separat analysiert. Im cranialen Teil des Nervensystems wurde die Cerebellumanlage und der otische Vesikel mit dieser Methode untersucht (siehe Abbildung 20 D). Die Abbildungen B, C, E und F zeigen jeweils die Auswertungsdiagramme.

Die schwarzen Balken indizieren die Fluoreszenz-Intensitätswerte in % nach *ncam1a*-Knockdown und die grauen Balken die %-Werte nach *ncam1b*-Knockdown.

Im Bereich des Rückenmarks führt die Injektion des *ncam1b*-Morpholinos zu einer stärkeren Reduktion der Fluoreszenzintensität, im Vergleich zum *ncam1a*-Morpholino (siehe Abbildung 20 B). Durch den Knockdown von *ncam1a* wird die Fluoreszenzintensität auf 50,1 % reduziert, wohingegen der Knockdown von *ncam1b* die Intensität auf 28,6 % reduziert. Dies zeigt, dass polySia im Bereich des dorsalen Rückenmarks hauptsächlich gebunden an Ncam1b vorliegt. Auf den Zellen der Floorplate ist nicht Ncam1b sondern Ncam1a das Trägerprotein für polySia (siehe Abbildung 20 C), da hier die Fluoreszenzintensität nach *ncam1a*-Knockdown (auf 7,8 %) stärker reduziert wird, als nach dem *ncam1b*-Knockdown (74,4 %). Dies bestätigt die Ergebnisse der Immunfärbung (Abbildung 18).

In der sich entwickelnden Cerebellumanlage reduziert sich die Fluoreszenzintensität stärker nach dem Knockdown von *ncam1a* (auf 32,3 %) als nach dem Knockdown von *ncam1b* (auf 52,5 %) (Abbildung 20 E). PolySia-Ncam1a wird im rostralen Teil des Nervensystems stärker exprimiert, als polySia-Ncam1b. Dies entspricht dem mittels Immunfärbung detektierten Start der Ncam1a-Expression im Alter von 11-12 hpf (Abbildung 20 A). Die Ausnahme im rostralen Teil des Nervensystems ist der otische Vesikel. Hier reduziert sich die Fluoreszenzintensität stärker durch den *ncam1b*-Knockdown (auf 30,5 %) als durch den *ncam1a*-Knockdown (auf 85,1 %) (Abbildung 20 F).

Die folgende Tabelle soll eine Übersicht über die Expression von Ncam1a und Ncam1b, bzw. deren Modifikation mit polySia im Wildtyp-Zebrafischembryo im Stadium von 36 hpf geben. Die verschiedenen Körperbereiche werden von cranial nach caudal angegeben. Im rostralen Teil des Nervensystems überwiegt die Expression von polySia-Ncam1a. Während eine deutliche polySia-Ncam1b-Expression im cranialen Teil des Nervensystems lediglich auf den Zellen im Übergang zwischen Diencephalon und Mesencephalon und auf den Zellen des otischen Vesikels zu finden ist. Im caudalen Bereich des Nervensystems überwiegt die Expression von polySia-Ncam1b mit Ausnahme der Floorplate-Zellen. Sie exprimieren ausschließlich polySia-Ncam1a.

Im zentralen Nervensystem wird nur auf einem Axontrakt polySia exprimiert, der posterioren Kommissur. PolySia liegt hier gebunden an Ncam1a vor. Im peripheren Nervensystem wird polySia auf den spinalen Motoraxonen, den Cranialnerven nV, nVII, nIX und nX und auf dem Seitenliniennerv exprimiert. Auf den Motoraxonen ist Ncam1b der Hauptträger von polySia, während auf den Cranialnerven und dem Seitenliniennerv polySia-Ncam1a überwiegt.

Im Verlauf der Evolution kam es zur Aufteilung der Expressionsbereiche und damit zur Diversifizierung der beiden Ncam1-Paraloge im Zebrafischembryo, die möglicherweise zu deren Konservierung beigetragen hat.

Tabelle 10: PolySia-Verteilung im Wildtyp-Zebrafischembryo (36 hpf)

Wildtyp-Zebrafischembryo (36 hpf)	Ncam1a / Ncam1b	PolySia- Ncam1a / polySia- Ncam1b
Olfaktorische Plakode	Ncam1a	vereinzelt polySia-Ncam1a
Olfaktorischer Bulbus	Ncam1a, Ncam1b, Ncam2	polySia vorhanden
Posteriore Kommissur	Ncam1a	polySia-Ncam1a
Dorsales Diencephalon/ anteriores Mesencephalon	Ncam1b > Ncam1a	polySia-Ncam1b
Cerebellumanlage	Ncam1a > Ncam1b	polySia-Ncam1a > polySia- Ncam1b
Cranialnerven	Ncam1a > Ncam1b	polySia-Ncam1a > polySia- Ncam1b
Otischer Vesikel	Ncam1b > Ncam1a	polySia-Ncam1b > polySia- Ncam1a
Dorsales Rückenmark	Ncam1b > Ncam1a	polySia-Ncam1b > polySia- Ncam1a
Floorplate	Ncam1a	polySia-Ncam1a
Motoraxone	Ncam1a, Ncam1b	polySia-Ncam1b > polySia- Ncam1a
Seitenliniennerv	Ncam1a, Ncam1b	polySia-Ncam1a > polySia-Ncam1b

4.2.4 Kein Hinweis für eine Polysialylierung von Ncam2 (OCAM)

NCAM2 wird in der Maus nicht polysialyliert (Yoshihara et al., 1997). Um zu untersuchen, ob Ncam2 das dritte Mitglied der NCAM-Familie im Zebrafisch polysialyliert wird, wurde ein Doppel-Knockdown von *ncam1a* und *ncam1b* mit anschließender Immunfärbung gegen Ncam2 und polySia durchgeführt (siehe Abbildung 21).

Nach dem Doppelknockdown von *ncam1a* und *ncam1b* weist die Expression von Ncam2 (grün, Abbildung 21 A) leichte Veränderungen zur WT-Expression im Stadium von 36 hpf auf (siehe Abbildung 15 B). Vermutlich wird die Entwicklung des Zebrafischembryos durch

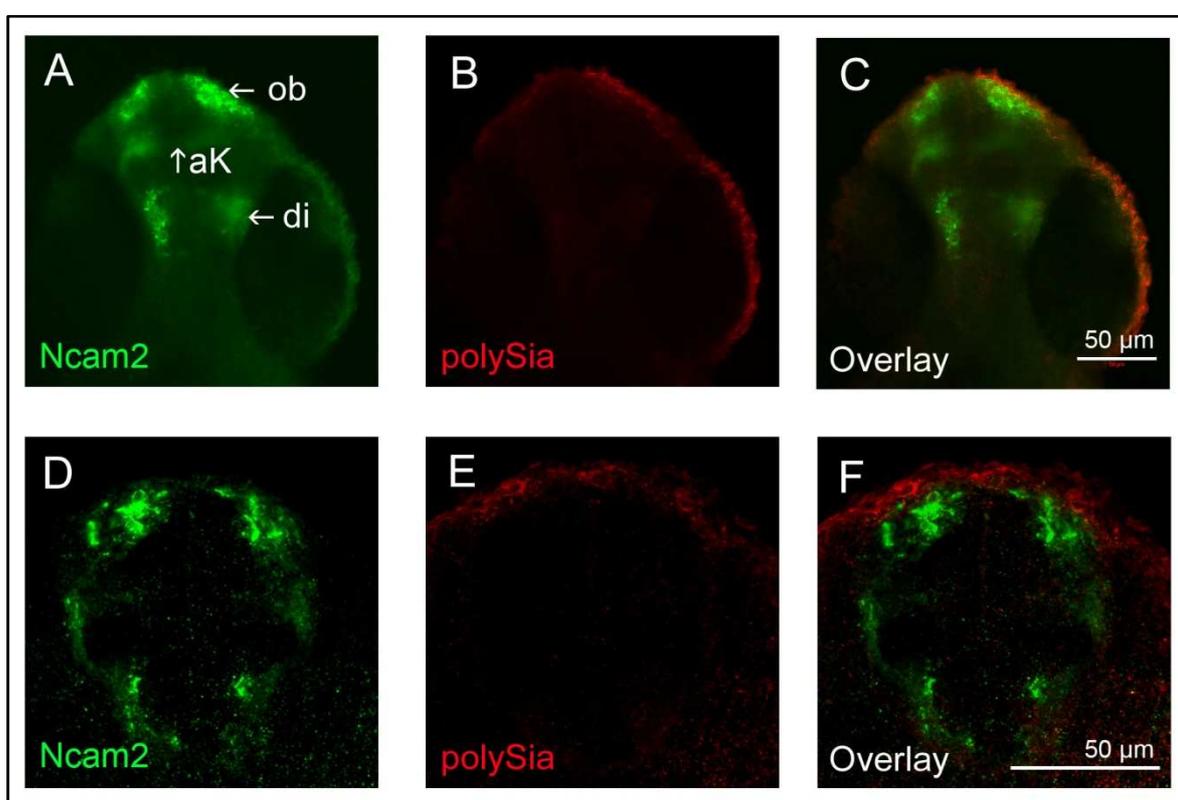


Abbildung 21: Keine Kolo-kalisation von Ncam2 mit polySia

A)-F) Ventrale Ansicht auf den Kopf von *ncam1a*- und *ncam1b*-Doppelknockdown-Embryonen (36 hpf) mit einer Immunfärbung gegen Ncam2 (grün) und polySia (rot). 20x Vergrößerung in A-C und 40x Vergrößerung in D-F. **A)** Ncam2 wird im olfaktorischen Bulbus (ob), im Bereich der anterioren Kommissur (aK) und auf Zellen des Diencephalons (di) exprimiert. **B)** Die Expression von polySia kann in den Doppelknockdown-Embryonen nicht mehr im Bereich des Gehirns detektiert werden. Es ist lediglich eine Restfluoreszenz auf der Oberfläche der Embryonen zu erkennen, die vermutlich durch unspezifische Ablagerungen des Sekundärantikörpers hervorgerufen werden. **C)** Im Overlay wird deutlich, dass keine Kolo-kalisation von Ncam2 und polySia vorliegt. **D)** Ncam2-Expression im olfaktorischen Bulbus und im Bereich des Diencephalons. **E)** leichte Rotfärbung auf der Oberfläche des Embryos, vermutlich durch den Sekundärantikörper. **F)** Im Overlay ist keine Kolo-kalisation von Ncam2 mit polySia zu erkennen.

Der Maßstabsbalken in C gilt für die Bilder A-C und der Maßstabsbalken in F für die Bilder D-F.

den Doppel-Knockdown verlangsamt, was zu einer Ncam2-Expression führt, die einem Entwicklungsstadium zwischen 30 hpf und 36 hpf entspricht (Abbildung 15). Im olfaktorischen Bulbus (ob), im Bereich der anterioren Kommissur (aK) und auf Zellen des Diencephalons (di) ist eine Ncam2-Färbung zu sehen (Abbildung 21 A). Die Immunfärbung gegen polySia (Abbildung 21 B) ist durch den Doppel-Knockdown stark reduziert. Ein leichtes Signal ist noch auf der Oberfläche des Embryos zu erkennen, das vermutlich durch eine unspezifische Ablagerung des Sekundärantikörpers hervorgerufen wird. Im Overlay der beiden Färbungen (Abbildung 21 C) ist keine Kolokalisation der Signale von Ncam2 und polySia zu erkennen.

Ein weiterer Doppelknockdown-Embryo ist in Abbildung 21 D-F zu sehen. Diese Aufnahmen zeigen eine ventrale Ansicht der Gehirnbereiche mit einer höheren Vergrößerung (40x). Auch hier ist im Overlay (Abbildung 21 F) keine Kolokalisation von Ncam2 und polySia zu erkennen. Der immunhistochemische Ansatz gibt keinen Hinweis für eine Polysialylierung von Ncam2.

Für die Polysialylierung von NCAM1 in der Maus sind bestimmte Sequenzen und Strukturen in der Fibronectin(FN)1-TypIII-Domäne wichtig (Foley et al., 2010). Die Aminosäureabfolge Glutamin-Valin-Glutamin, auch QVQ-Sequenz genannt, und die α -Helix in der FN1-Domäne werden z.B. in Verbindung gebracht mit der Positionierung der Polysialyltransferasen (Foley et al., 2010). Da die α -Helix und die QVQ Sequenz im NCAM2-Protein in der Maus fehlen und NCAM2 nicht polysialyliert wird, könnte dies ein möglicher Grund für die fehlende Polysialylierung sein (Foley et al., 2010).

Um die Wahrscheinlichkeit einer polySia-Modifikation für Ncam2 im Zebrafisch abzuschätzen, wurde die Aminosäuresequenz der FN1-Domäne von Ncam2 mit den Sequenzen von NCAM2 und NCAM1 der Maus verglichen:

```
NCAM1 (Maus)      DTPSSP.SID QVEPYSSTAQ VQFDEPEATG GVPILKYKAE WRAVGEEVWH
NCAM2 (Maus)      DVPSSPRGVK IIELSQTTAK ISFNKPESHG GVPIHHYQVD VMEETSETWK
Ncam2 (Zebrafisch) DVPSNPYSVF LSSVAQRVAT VTFTKPDSHG GVPISHYLVK VKDISSQDWK
```

```
NCAM1      SKWYDAKEAS MEGIVTIVGL KPETTYAVRL AALNGKGLGE ISAASEFKTQ
NCAM2      ....IVRSHG VQTTVVLSSL EPNTTYEVRV AAVNGKGQGD YSKIEIFQTL
Ncam2      ....DVKSLG TQTIVLLTNL EPNTTYEVRV SAVNGKVQGE FSHTESFQTL
```

```
NCAM      PVQGE
NCAM2     PVRE.
Ncam2     PI...
```

Die hier gezeigten Sequenzen verdeutlichen, dass Ncam2 im Zebrafisch die für die Positionierung der Polysialyltransferasen notwendigen Aminosäuren, wie beim NCAM2-Protein in der Maus, fehlen. Die Aminosäureabfolge **QVQ** ist nicht vorhanden, wie auch die α -Helix mit den Aminosäuren **AKEASMEG**.

Nicht nur die posttranslationale Modifikation der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle wurde in der vorliegenden Studie untersucht, sondern auch deren Funktion.

4.3 Die Funktion der Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie im Zebrafischembryo

4.3.1 Ncam1a und Ncam1b besitzen eine unterschiedliche Funktion an der posterioren Kommissur

Die posteriore Kommissur (pK) ist eine dorsale Kommissur, die am Übergang zwischen Vorderhirn und Mittelhirn lokalisiert ist (Chitnis et al., 1992). Sie entsteht 20 bis 24 hpf und enthält Axone von Neuronen des anterioren Tegmentums (Chitnis und Kuwada, 1990, Chitnis et al., 1992). Die Neurone des anterioren Tegmentums liegen in 2 Gruppen vor: dem lateralen und dem ventralen „Cluster“ (Chitnis und Kuwada, 1990, Chitnis et al., 1992). Ausgehend von diesen beiden Neuronengruppen wachsen Axone in Richtung dorsal und kreuzen anschließend die Mittellinie, den Übergang zwischen den Hemisphären (Chitnis und Kuwada, 1990). Im Stadium von 48 hpf besteht die pK aus ca. 1700 Axons (Wilson et al., 1990).

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass das Wachstumsmuster der posterioren Kommissur im Zebrafisch durch die Entfernung von polySia verändert wird (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Die Injektion von EndoN (zum enzymatischen polySia-Verdau) in den Ventrikel von 20 hpf-Embryonen, wie auch der Knockdown der Polysialyltransferase *st8sia2* führt zu einer Aufspaltung der posterioren Kommissur in mehrere Bündel (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Da Ncam1a und Ncam1b im Bereich der Kommissur exprimiert werden und beide Proteine posttranslational mit polySia modifiziert werden, wurde zunächst die Verteilung von polySia und den beiden Zelladhäsionsmoleküle in diesem Bereich genauer analysiert. Durch anschließende Knockdown-Versuche wurde die Funktion der beiden Moleküle bezüglich der Ausbildung der posterioren Kommissur untersucht.

4.3.1.1 Komplementäre Expression von *Ncam1a* und *Ncam1b* im Bereich der posterioren Kommissur

Die Expression von *Ncam1a*, *Ncam1b* und deren Modifikation polySia wurde anhand von Immunfärbungen in Zebrafischembryonen 36 hpf analysiert. In diesem Stadium ist die posteriore Kommissur deutlich in einer Dorsalansicht des Gehirns zu erkennen (Abbildung 22 A-I; rostral liegt in den Bildern oben und caudal unten). Eine Immunfärbung mit dem monoklonalen Antikörper 735 gegen polySia zeigt, dass polySia auf den Axonen der posterioren Kommissur (pK) und den darunterliegenden Zellen exprimiert wird (Abbildung 22 A). Im Overlay mit einer Immunfärbung gegen Tag-1, ein axonales Glykoprotein, wird die Lage der Kommissur deutlich. Sie befindet sich posterior der Epiphyse und spannt sich komplett über beide Gehirnhemisphären (Abbildung 22 D).

Die Expressionsstudie von *Ncam1a* und *Ncam1b* demonstriert eine unterschiedliche Verteilung der beiden Proteine im Bereich der posterioren Kommissur (siehe Abbildung 22). Der polyklonale Antikörper gegen *Ncam1a* färbt deutlich die Axone der posterioren Kommissur und schwächer die darunterliegenden Zellkörper, der Neurone im dorsalen Di- und Mesencephalon (Abbildung 22 B). Im Overlay mit der Immunfärbung gegen Tag-1 erkennt man eine Kolokalisation von Tag-1 und *Ncam1a* auf den Axonen (Abbildung 22 E). *Ncam1b* wird ebenfalls im Bereich der posterioren Kommissur exprimiert (Abbildung 22 C). Die Immunfärbung zeigt sich jedoch nicht auf den Axonen der posterioren Kommissur, sondern nur auf den Zellkörpern im Übergang zwischen Di- und Mesencephalon und auf der Epiphyse (e) (Abbildung 22 C). Im Overlay ist ebenfalls zu erkennen, dass *Ncam1b* nicht auf den Axonen exprimiert wird, da die Färbung gegen Tag-1 grün bleibt (Abbildung 22 F).

Um zu ermitteln, ob *Ncam1a* und *Ncam1b* im Bereich der Kommissur im Stadium von 36 hpf polysialyliert vorliegen, wurden Morpholino-Knockdownversuche mit anschließender Immunfärbung gegen polySia kombiniert (Abbildung 22 G-I). Da *Ncam1a* und *Ncam1b* die Hauptträger von polySia im Zebrafischembryo sind, lässt sich durch den Knockdown von *ncam1a* die Expression von polySia-*Ncam1b* ermitteln. Nach dem *ncam1a*-Knockdown zeigt sich eine polySia-Färbung auf den Zellkörpern der Neurone im Bereich der Kommissur (Abbildung 20 H). Dies entspricht der Färbung mit dem polyklonalen Antikörper gegen *Ncam1b* (Abbildung 22 C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass *Ncam1b* auf den Neuronen im Bereich der Kommissur polysialyliert vorliegt, auf den Axonen der Kommissur aber nicht exprimiert wird.

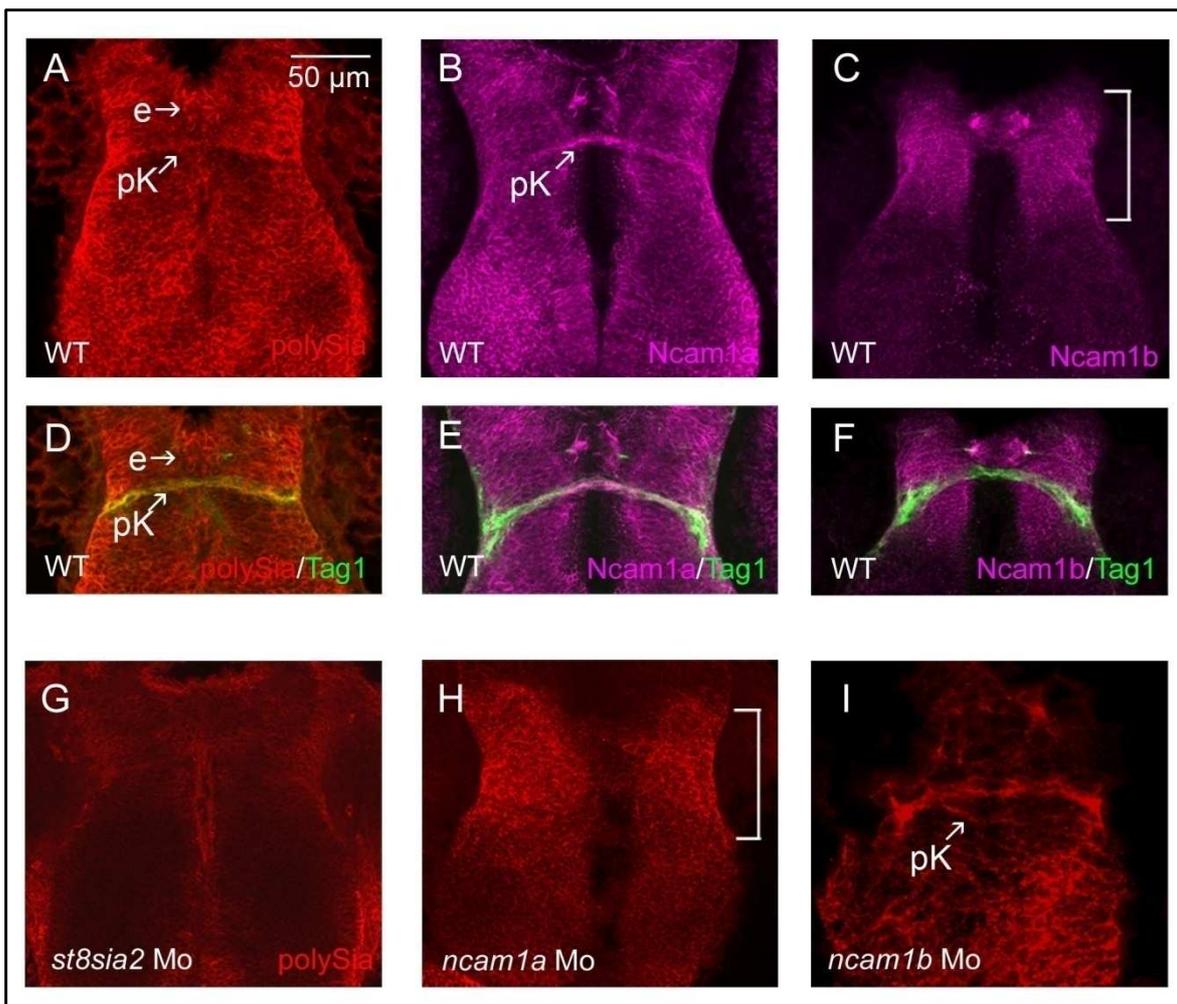


Abbildung 22: Komplementäre Expression von Ncam1a und Ncam1b im Bereich der posterioren Kommissur

A-I) Dorsalansicht des Gehirns (rostral liegt oben im Bild) von Zebrafischembryonen (36 hpf) immungefärbt gegen polySia (rot), Tag-1 (grün), Ncam1a (magenta) oder Ncam1b (magenta). Es handelt sich hierbei um Wildtyp- (A-F) bzw. Knockdown-Embryonen (G-I). **A, D)** Eine polySia-Expression wird sowohl auf den Zellkörpern des Pro- und Mesencephalons, wie auch auf den Axonen der posterioren Kommissur (pK) detektiert. Der Overlay demonstriert die Kolo-kalisation von Tag-1 und polySia auf den Axonen der Kommissur in gelb. **B, E)** Ncam1a wird auf den Axonen der Kommissur und auf den darunterliegenden Neuronen exprimiert. **C, F)** Eine Immunfärbung gegen Ncam1b erscheint auf den Zellkörpern der Neurone unter der Kommissur (siehe eckige Klammern). **G)** Die Expression von polySia wird durch den *st8sia2*-Knockdown nahezu unterdrückt. **H)** *ncam1a*-Knockdownembryonen weisen eine polySia Expression auf den Neuronen im Bereich der Kommissur auf. Da Ncam1a und Ncam1b die Hauptträger von polySia im Zebrafischembryo sind, lässt sich daraus schließen, dass polySia hier gebunden an Ncam1b vorliegt. **I)** Bei den *ncam1b*-Knockdownembryonen zeigt sich eine polySia-Ncam1a-Expression auf den Axonen der Kommissur und auf Zellkörpern von Neuronen im Umfeld der Kommissur.

Maßstabsbalken in A) gilt für die Bilder A)-I).

Abkürzungen: e: Epiphyse, Mo: Morpholino, pK: posteriore Kommissur, WT: Wildtyp.

Die Immunfärbung gegen polySia nach dem Knockdown von *ncam1b* demonstriert die Verteilung von polySia-Ncam1a (Abbildung 22 I). Es ist ein Signal auf den Axonen der Kommissur, nicht aber auf den darunterliegenden Neuronen zu erkennen (Abbildung 22 I). Die Färbung im unteren Bildbereich zeigt Nervenzellkörper im dorsalen Mesencephalon, die ebenfalls polySia-Ncam1a exprimieren und den Bereich der Kommissur umgeben (Abbildung 22 I).

Der Knockdown von *st8sia2*, der Polysialyltransferase die während der Entwicklung des Zebrafischembryos die Produktion von polySia hauptsächlich übernimmt (Marx et al., 2007) führt dazu, dass die polySia-Expression auf den Axonen der pK und auf den darunterliegenden Zellen im Bereich der Kommissur nahezu komplett unterdrückt wird (Abbildung 22 G).

Durch diese Immunfärbungen konnte gezeigt werden, dass Ncam1a, Ncam1b und deren Modifikation polySia komplementäre Expressionsmuster im Bereich der posterioren Kommissur besitzen.

4.3.1.2 PolySia-Ncam1a und Ncam1b besitzen unterschiedliche Funktionen in Bezug auf die Entwicklung der posterioren Kommissur

Die unterschiedliche Verteilung von polySia-Ncam1a und polySia-Ncam1b im Bereich der Kommissur lässt eine spezifische Funktion der beiden Moleküle vermuten. Zur Untersuchung dieser These wurden Morpholino-Knockdownversuche mit anschließender Immunfärbung gegen Tag-1, zur Analyse der Axone, durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunfärbung gegen Tag-1 nach dem Knockdown sind in Abbildung 23 A-F gezeigt. Es wurden drei verschiedene Phänotypen beobachtet:

1. Kommissur liegt faszikuliert vor (siehe blaues Quadrat in Abbildung 23 G),
2. Kommissur liegt aufgespalten in mehrere Bündel vor (rotes Quadrat in Abbildung 23 G),
3. Wachstumsstopp der Axone im lateralen Bereich der Kommissur (grünes Quadrat in Abbildung 23 G).

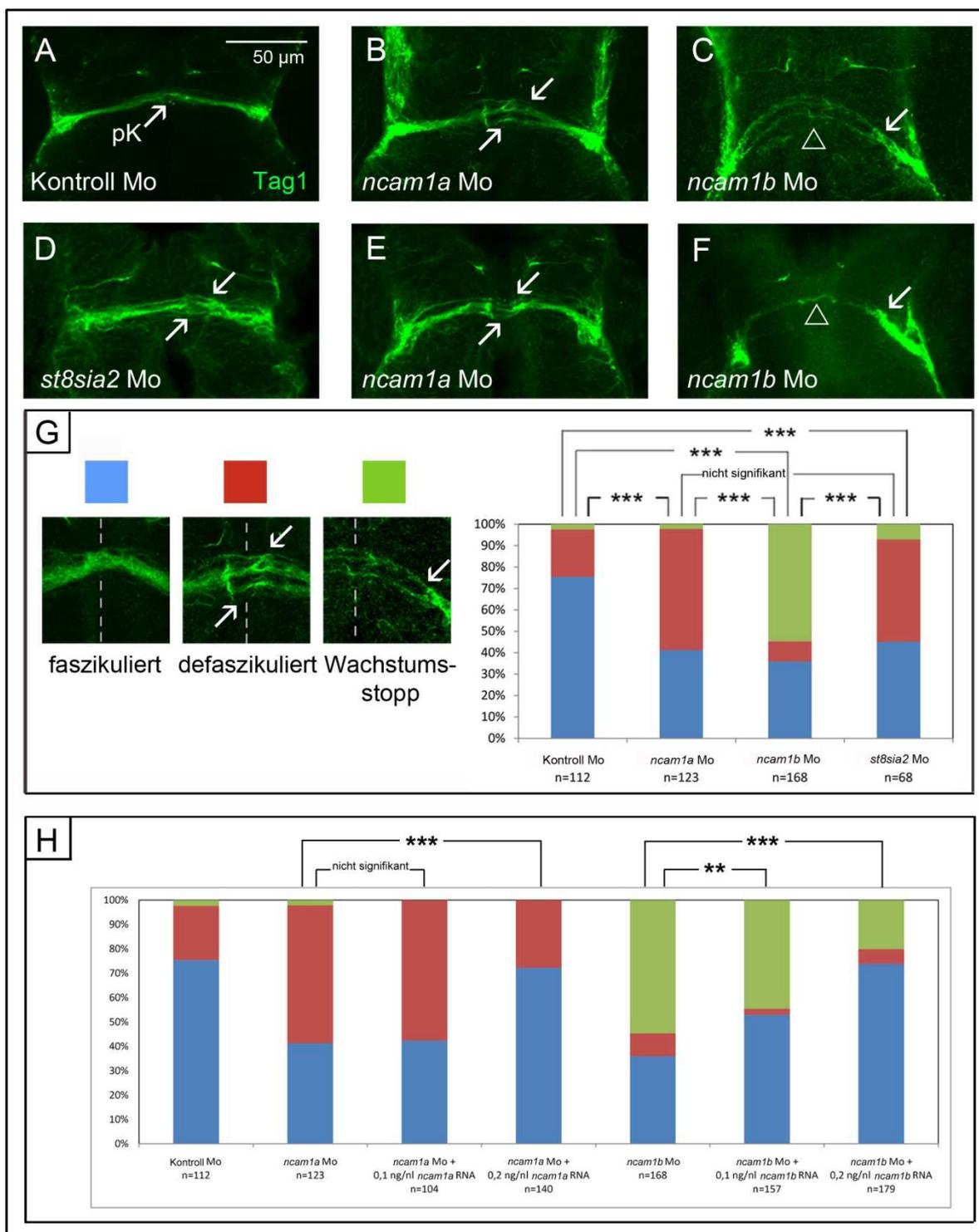


Abbildung 23: Ncam1a, Ncam1b und polySia beeinflussen die Ausbildung der posterioren Kommissur (pK)

(A-F) Dorsale Ansicht der posterioren Kommissur (rostral liegt oben im Bild) von Zebrafischembryonen (36 hpf) immungefärbt gegen Tag-1, nach Morpholino-Injektion. Maßstabsbalken in A) gilt für die Bilder A-F. **A**) Phänotyp nach Injektion des Kontroll-Morpholinos: Axone der posterioren Kommissur liegen bei mehr als 75 % der Embryonen faszikuliert vor. **B, E**) Phänotyp nach Injektion des *ncam1a*-Morpholinos: posteriore Kommissur ist aufgespalten in mehrere Axonbündel bei 56,6 % der Embryonen. **C, F**) Phänotyp nach Injektion des *ncam1b*-Morpholinos: die Axone der posterioren Kommissur stoppen ihr Wachstum in dem Bereich, indem normalerweise polySia-Ncam1b exprimiert wird. **G**) Statistische Auswertung der Wachstumsmuster der posterioren Kommissur nach Morpholino-Knockdown in 3 verschiedenen Klassen: **faszikuliert** (wie im Wildtyp), **defaszikuliert** (aufgespalten in mehrere Axonbündel) und **Wachstumsstopp** (nur wenige Axone kreuzen die Mittellinie). Die Signifikanzanalyse wurde mit dem χ^2 -Test nach Brandt-Snedecor durchgeführt. **H**) Die Co-Injektion von *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-mRNA in verschiedenen Konzentrationen zeigt einen „Rescue“-Effekt. Die Signifikanzanalyse wurde wie bei G) durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Wachstumsmuster befindet sich ebenfalls in Abbildung 23 G. Nach Injektion des Kontroll-Morpholinos liegen die Axone der posterioren Kommissur bei 75,4 % der Embryonen (36 hpf) faszikuliert (siehe Abbildung 23 A und G), wie im Wildtyp-Embryo, vor. Der Unterschied zwischen dem Phänotyp nach Injektion des Kontroll-Morpholinos im Vergleich zum Phänotyp nach *ncam1a*-, *ncam1b*- oder *st8sia2*-Knockdown ist signifikant auf dem 0,001 Niveau (siehe Auswertung in Abbildung 23 G). Die Signifikanzanalyse wurde nach dem χ^2 -Test nach Brandt-Snedecor ($p < 0.001$) durchgeführt. Der Knockdown von *ncam1a* führt bei 56,6 % der Embryonen zu einem defaszikulierten Wachstumsmuster der Axone (siehe Abbildung 23 B und E). Die Kommissur wird breiter, da die Axone aufgeteilt in mehreren Bündeln vorliegen (siehe Pfeile in Abbildung 23 B und E).

PolySia-Ncam1a, das auf den Axonen der Kommissur exprimiert wird, ist vermutlich notwendig für ein faszikuliertes Wachstumsmuster der Axone. Der Phänotyp nach *ncam1a*-Knockdown ist hochsignifikant in Bezug zum Phänotyp nach Injektion des Kontroll- oder *ncam1b*-Morpholinos (siehe Auswertung in Abbildung 23 G). Es besteht aber kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den *st8sia2*-Knockdown. Die Entfernung von polySia im kompletten Zebrafischembryo führt zum gleichen Effekt wie der Knockdown von polySia-Ncam1a auf den Axonen der Kommissur.

Bei 54,7 % der Embryonen zeigt sich nach *ncam1b*-Knockdown ein Abbruch des axonalen Wachstums im lateralen Bereich der Kommissur (siehe Pfeile in Abbildung 23 C und F). Nur wenige Axone überkreuzen die Mittellinie (siehe Pfeilspitze in Abbildung 23 C und F). Dies demonstriert, dass Ncam1b für das Wachstum der Axone über die Mittellinie notwendig ist. Der Phänotyp nach *ncam1b*-Knockdown ist hochsignifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich gegenüber dem Phänotyp der anderen Morpholino-Injektionen (siehe Auswertung in Abbildung 23 G).

Zur Absicherung der Ergebnisse durch die Morpholino-Injektion und zum Ausschluß eines „off-target“-Effekts wurden „Rescue“-Experimente durchgeführt. Bei diesen Experimenten wird die Ziel-mRNA in verschiedenen Konzentrationen mit dem Morpholino co-injiziert, um eine schrittweise Abschwächung des Phänotyps zu erkennen und um zu zeigen, dass der Morpholino die Translation der Ziel-mRNA und nicht einer anderen RNA inhibiert. Die Auswertung der „Rescue“-Experimente wird in Abbildung 23 H gezeigt. Damit der Morpholino nicht an die co-injizierte RNA bindet wurden Mutationen in die Bindungsstelle eingeführt. Bei der *ncam1a*-mRNA war dies nicht notwendig, da der Morpholino in der 5'UTR bindet.

Die Co-Injektion des *ncam1a*-Morpholinos mit 0,1 ng/nl *ncam1a*-mRNA zeigt keine signifikante Änderung des Phänotyps im Vergleich zur alleinigen Injektion des *ncam1a*-

Morpholinos. Der Anteil an Zebrafischembryonen mit defaszikulierter posteriorer Kommissur liegt noch bei 57,7 % (siehe Abbildung 23 H). Erst mit einer Konzentration von 0,2 ng/nl *ncam1a*-RNA zeigt sich eine signifikante Veränderung der Verteilung der Phänotypen und der Anteil an Embryonen mit faszikulierter Kommissur steigt auf 72,1 % (Abbildung 23 H).

Bei der Co-Injektion von 0,1 ng/nl *ncam1b*-RNA mit dem *ncam1b*-Morpholino zeigt sich eine signifikante Veränderung der Phänotypen auf dem 0,01 % Niveau. Der Anteil an Embryonen mit faszikulierter posteriorer Kommissur steigt auf 52,9 % (Abbildung 23 H). Durch die Erhöhung des Anteils an *ncam1b*-RNA in der Injektionslösung auf 0,2 ng/nl, steigt der Anteil weiter auf 73,7 % (Abbildung 23 H). Diese Veränderung ist signifikant auf dem 0,001 % Niveau im Vergleich zur *ncam1b*-Morpholinoinjektion ohne RNA. Die Co-Injektion von *ncam1a*- bzw. *ncam1b*- mRNA „rettet“ also den durch die Morpholino-Injektion hervorgerufenen Phänotyp. Es handelt sich daher nicht um einen unspezifischen Effekt der Morpholinos.

Im Rahmen dieser Studie wurde nicht nur die Funktion von Ncam1a und Ncam1b im Bereich der posterioren Kommissur untersucht, sondern auch deren Funktion bezüglich der Ausbildung der Motoraxone im peripheren Nervensystem.

4.3.2 PolySia-Ncam1b beeinflusst das Wachstum der Motoraxone

Im Zebrafisch gibt es 3 verschiedene Typen (CaP, MiP, RoP) primärer Motoneurone im Rückenmark (Myers et al., 1986). Die Motoneurone projizieren in unterschiedliche Regionen der sie umgebenden Muskulatur. Die ersten Motoraxone erscheinen im Stadium von etwa 18-20 hpf (Myers et al., 1986). Die sekundären Motoneurone folgen den primären Motoneuronen etwa 5-6 Stunden später (Myers et al., 1986). Mittels Immunfärbungen konnte gezeigt werden, dass nur die sekundären Motoneurone im Zebrafischembryo ab 30 hpf polySia tragen (Marx, 1999). Die Immunfärbungen in der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass Ncam1a und Ncam1b auf den nach ventral projizierenden Motoraxonen im Zebrafischembryo im Alter von 36 hpf exprimiert werden (Abbildung 12 G und H). Vermutlich handelt es sich hierbei um sekundäre Motoneurone, da in der Immunfärbung im Alter von 24 hpf keine spinalen Axone gefärbt werden (Abbildung 11). Durch die Kombination von Immunfärbungen mit Morpholino-Knockdownversuchen wurde ermittelt, dass Ncam1b auf den Motoraxonen der Hauptträger von polySia ist (Abbildung 18). Zur Untersuchung der Funktion von Ncam1a

und *Ncam1b* bezüglich der Ausbildung der Motoraxone wurden ebenfalls Knockdownversuche mit anschließender Immunfärbung der Axone gegen Tag-1 („transient axonal glycoprotein“) durchgeführt. Die statistische Auswertung dieser Versuche wird in Abbildung 24 gezeigt.

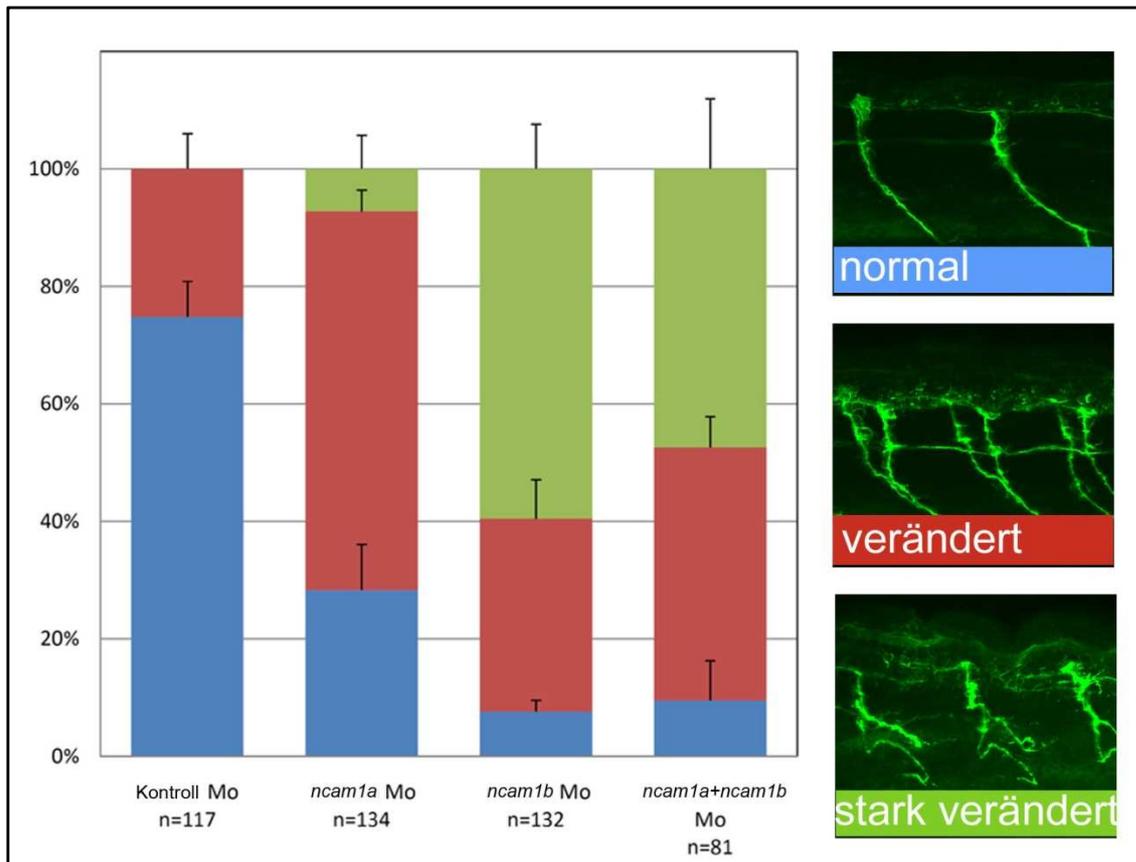


Abbildung 24: Verändertes Wachstumsmuster der spinalen Motoraxone nach *ncam1b*-Knockdown

In diesem Diagramm wird die statistische Verteilung der verschiedenen Motoraxon-Phänotypen in % aufgezeigt. In **blauen** Balkenabschnitten werden die Embryonen mit leicht gebogenem Verlauf der Axone erfasst. In **rot** dargestellt werden die Embryonen mit Axonen, die leichte Unregelmäßigkeiten aufweisen und in **grün** zeigen sich die Embryonen mit deutlich auffällig veränderten Axonen. Die Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden, weisen in 25,2 % leicht veränderte Axonverläufe auf. Der Anteil an Embryonen mit veränderten Axonverläufen ist größer in den *ncam1a*-Knockdownembryonen (64,5 %) und starke Veränderungen zeigen 7,2 % dieser Embryonen. Die *ncam1b*-Knockdownembryonen besitzen in 59,5 % der Fälle stark veränderte Axone. Nur 7,6 % der *ncam1b*-Embryonen zeigen einen unveränderten Verlauf der Motoraxone. Nach dem Doppel-Knockdown von *ncam1a* und *ncam1b* besitzen 47,4 % der Embryonen starke und 43,1 % leichte Veränderungen bezüglich der Axonverläufe.

Die Fehlerbalken zeigen die Auswertung der Standardfehler.

Es wurde zwischen drei Phänotypen unterschieden:

1. Axone beschreiben einen leichten Bogen (siehe in Abbildung 24: „normal“),
2. Axone weisen leichte Unregelmäßigkeiten im Verlauf auf (siehe Abbildung 24: „verändert“) oder
3. Axone zeigen starke Veränderungen (siehe Abbildung 24 „stark verändert“).

In Wildtyp-Embryonen (36 hpf) beschreiben die Motoraxone einen leichten Bogen nach caudal. Der Bogen verläuft ohne Unregelmäßigkeiten. Den gleichen Phänotyp besitzen 74,8 % der Zebrafischembryonen nach Kontroll-Morpholinoinjektion. Bei 25,2 % der Embryonen sind leichte Unregelmäßigkeiten im Bogenverlauf zu erkennen (siehe Abbildung 24: „verändert“). Nach dem Knockdown von *ncam1a* sinkt der Anteil an Zebrafischembryonen mit „normalem“ Verlauf der Motoraxone auf 28,3 % und der Anteil an Embryonen mit leichten Unregelmäßigkeiten steigt auf 64,5 %. Ein kleiner Anteil an Embryonen (7,2 %) zeigt sogar stark veränderte Motoraxone. Durch den Knockdown von *ncam1b* wird das Wachstumsmuster bei 92,4 % der Embryonen verändert. 32,9 % der Embryonen zeigen eine leichte und 59,5 % eine starke Veränderung des Wachstumsmusters der Motoraxone. Durch den Doppelknockdown von *ncam1a* und *ncam1b* wird der Phänotyp nicht verstärkt. Die prozentuale Verteilung der verschiedenen Phänotypen ist ähnlich, wie bei den *ncam1b*-Knockdownembryonen. 43,1 % der Doppelknockdown-Embryonen besitzen leichte Unregelmäßigkeiten im Wachstumsmuster der Motoraxone und 47,4 % zeigen eine deutliche Veränderung. Der χ^2 -Signifikanz-Test nach Brandt und Snedecor hat ergeben, dass die Veränderungen nach *ncam1a*-, *ncam1b*- bzw. Doppel-Knockdown hoch signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$) in Bezug auf die Veränderungen in den Kontroll-Embryonen sind. Kein signifikanter Unterschied besteht zwischen den *ncam1b*- und den Doppel-Knockdownembryonen.

Um den Phänotyp der veränderten Motoraxonausbildung in den *ncam1b*-Knockdownembryonen zu verdeutlichen, wurden weitere Aufnahmen der Motoraxone hier eingefügt (Abbildung 25). Die Motoraxone nach *ncam1b*-Knockdown weisen unterschiedliche Veränderungen der Motoraxone auf. Es kommt häufig zu einem zickzackartigen Verlauf der Axone (siehe Pfeile in Abbildung 25 A und C), zu aberranten Verzweigungen (rote Pfeile in Abbildung 25 A und C) oder zu Aufspaltungen der Axonbündel (siehe Pfeilspitzen in Abbildung 25 B und C).

Der Phänotyp nach *ncam1b*-Knockdown ist stärker ausgeprägt als nach dem Knockdown von *ncam1a*, möglicherweise weil *Ncam1b* auf den Motoraxonen stärker als *Ncam1a* exprimiert wird.

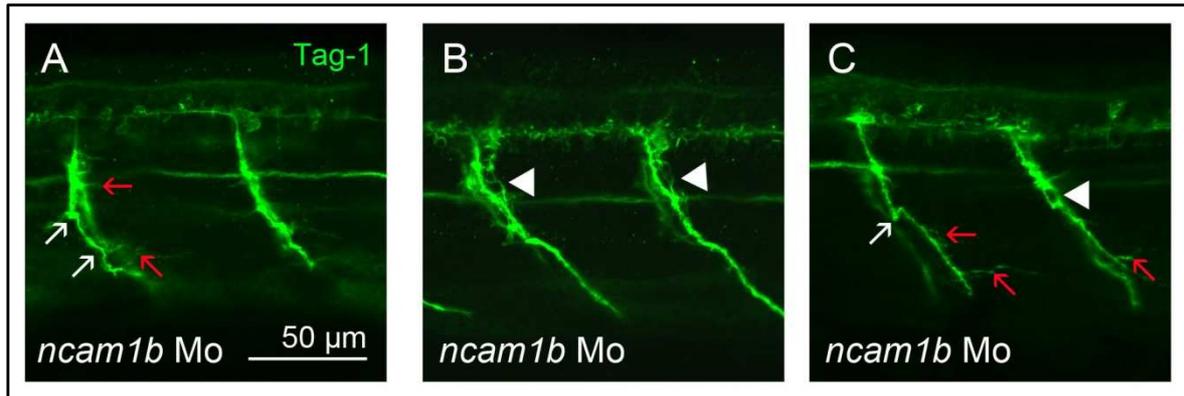


Abbildung 25: Veränderungen an den Motoraxonen nach *ncam1b*-Knockdown

Laterale Ansicht eines Abschnittes im Zebrafischschwanz; rostral befindet sich links im Bild (20er Objektiv, 2x Zoom). Die ZF-Embryonen wurden mit dem *ncam1b*-Morpholino injiziert und im Stadium von 36 hpf fixiert und immungefärbt gegen Tag-1 („transient axonal glycoprotein“). **A-C)** Die Axone nach *ncam1b*-Knockdown weisen unterschiedliche Auffälligkeiten auf:

1. Zickzackartiger Motoraxonverlauf (siehe Pfeile in A und C).
2. Aufspaltung der Axonbündel (siehe Pfeilspitzen in B und C) und
3. Ungewöhnliche Verzweigungen (siehe rote Pfeile in A und C).

Maßstabsbalken in A gilt für die Bilder A-C.

Abkürzung: Mo: Morpholino

In den Knockdownembryonen treten noch weitere Veränderungen im peripheren Nervensystem auf. Um die Daten zu vervollständigen wurden die folgenden Beobachtungen in die vorliegende Arbeit integriert. Sie konnten jedoch nicht mehr komplett statistisch ausgewertet werden.

4.3.3 Ganglion des posterioren Seitenliniennervs und Nervus vagus in den *ncam1b*-Knockdownembryonen verändert

Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters von Ncam1a und Ncam1b auf dem posterioren Seitenliniennerv, inklusive dessen Ganglion (Abbildungen 13 und 14), wurde dieser Bereich gesondert in den Knockdownembryonen analysiert. Für diesen Versuch wurden Zebrafischembryonen im 1-2-Zellstadium mit Morpholinos injiziert und im Stadium von 36 hpf gegen polySia (rot) und Tag-1 (grün) immungefärbt. Die Ausbildung des Ganglions in den Knockdownembryonen wurde mit dem Phänotyp in den Embryonen verglichen, die mit dem Kontroll Morpholino injiziert wurden (Abbildung 26).

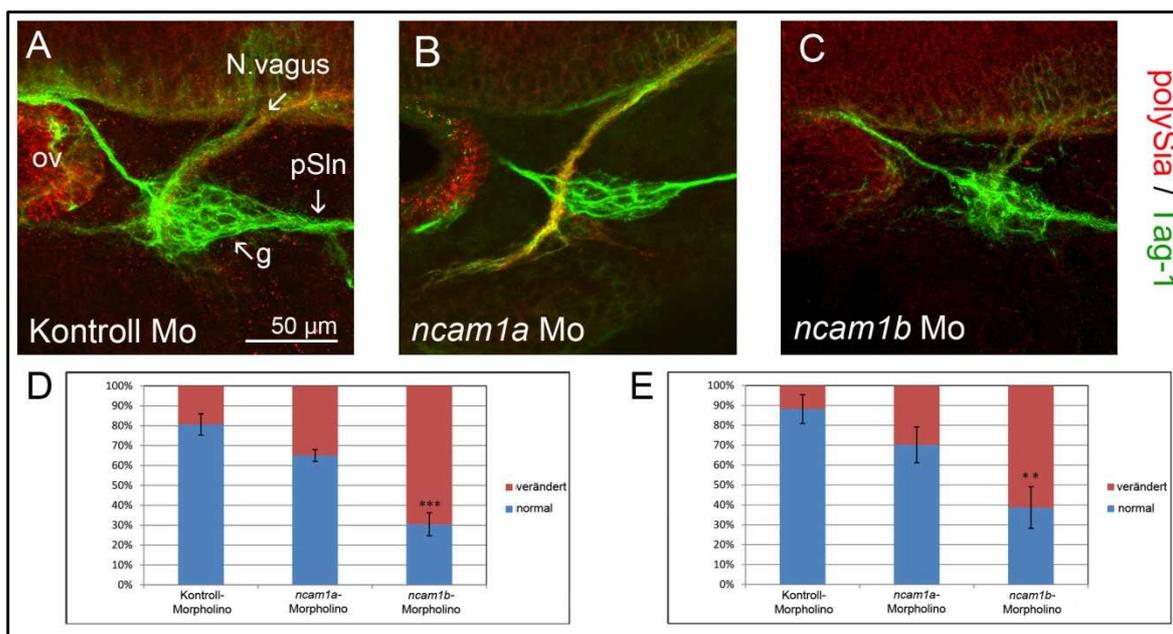


Abbildung 26: Ganglion des posterioren Seitenliniennervs und N. vagus in den *ncam1b*-Knockdownembryonen verändert

A-C) Laterale Ansicht des Ganglions (g) des posterioren Seitenliniennervs (pSlN) in Zebrafischembryonen (36 hpf) nach Morpholino-Injektion und Immunfärbung gegen polySia (rot) und Tag-1 (grün). Totalprojektionen aus Z-Stack-Aufnahmen am LSM 510. **A)** ZF-Embryo nach Injektion des Kontroll-Morpholinos zeigt die Ausbildung des Ganglions (g) und des Nervus vagus wie im Wildtyp-Embryo. **B)** Nach *ncam1a*-Knockdown zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ausbildung des Ganglions und des N.vagus. **C)** Die Größe des Ganglions des posterioren Seitenliniennervs ist reduziert und der N. vagus ist häufig aufgespalten in mehrere Axonbündel in den *ncam1b*-Knockdownembryonen. **D)** Statistische Auswertung der Veränderungen bezüglich der Ausbildung des Ganglions in den Knockdownembryonen. Signifikanter Unterschied ($p < 0,001$; zweiseitiger T-Test) zwischen Kontroll-Embryonen ($n = 114$) und *ncam1b*-Knockdownembryonen ($n = 142$). Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Embryonen und *ncam1a*-Knockdownembryonen ($n = 103$). **E)** Statistische Auswertung (zweiseitiger T-Test) der Veränderungen am N.vagus. Signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den Kontroll-Embryonen ($n = 69$) und den *ncam1b*-Knockdownembryonen ($n = 100$). Kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll-Embryonen und den *ncam1a*-Knockdownembryonen ($n = 75$).

Maßstabsbalken in A gilt für die Abbildungen A-C.

Abkürzungen: g: Ganglion, Mo: Morpholino, n: Nervus, ov: otischer Vesikel, pSlN: posteriorer Seitenliniennerv.

Die Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino (Mo) injiziert wurden ($n = 114$), zeigen eine Ansammlung von Nervenzellkörpern auf Höhe des Nervus vagus, die in Verbindung mit dem Seitenliniennerv stehen (Abbildung 26 A). Bei diesen Nervenzellkörpern handelt es sich um das Ganglion (g) des posterioren Seitenliniennervs (pSlN).

Die *ncam1a*-Knockdownembryonen ($n = 103$) weisen eine leichte Verkleinerung des Ganglions auf (Abbildung 26 B). Die Veränderungen sind jedoch nicht signifikant im Vergleich mit den Kontroll-Embryonen (Auswertung in Abbildung 26 D). Die Embryonen

nach *ncam1b*-Knockdown (n=142) besitzen ein deutlich verkleinertes Ganglion (Abbildung 26 C). Die Anzahl der Zellkörper innerhalb des Ganglions ist stark reduziert und dessen Gesamtform ist verändert. Der Phänotyp in den *ncam1b*-Knockdownembryonen ist hochsignifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich im Vergleich mit den Kontroll-Embryonen (Auswertung in Abbildung 26 D). Die statistische Auswertung wurde mit einem zweiseitigen T-Test durchgeführt.

Im Bereich des Ganglions befindet sich im Zebrafischembryo auch der Nervus vagus, der zu den Cranialnerven gehört. Auch hier konnte eine Veränderung in den *ncam1b*-Knockdownembryonen detektiert werden. Die Faszikulierung der Axone des N. vagus ist reduziert nach Injektion eines Morpholinos gegen *ncam1b* (Abbildung 26 C). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) in den *ncam1b*-Knockdownembryonen (n=100). Die *ncam1a*-Knockdownembryonen (n=75) weisen ebenfalls zum Teil eine Aufspaltung des Nervus vagus auf. Der Phänotyp ist aber im Vergleich mit den Kontroll-Embryonen (n=69) nicht signifikant (Auswertung in Abbildung 26 E). Da *Ncam1a* und *Ncam1b* ebenfalls auf den Cranialnerven V, VII und IX exprimiert werden (Abbildung 12 C, D), stellt sich natürlich die Frage, ob es auch hier zu einer Aufspaltung der Axonbündel wie beim Cranialnerv X (Nervus vagus) kommt. Um dies zu untersuchen wurden

Knockdownembryonen gegen *polySia* immungefärbt, da man mit dieser

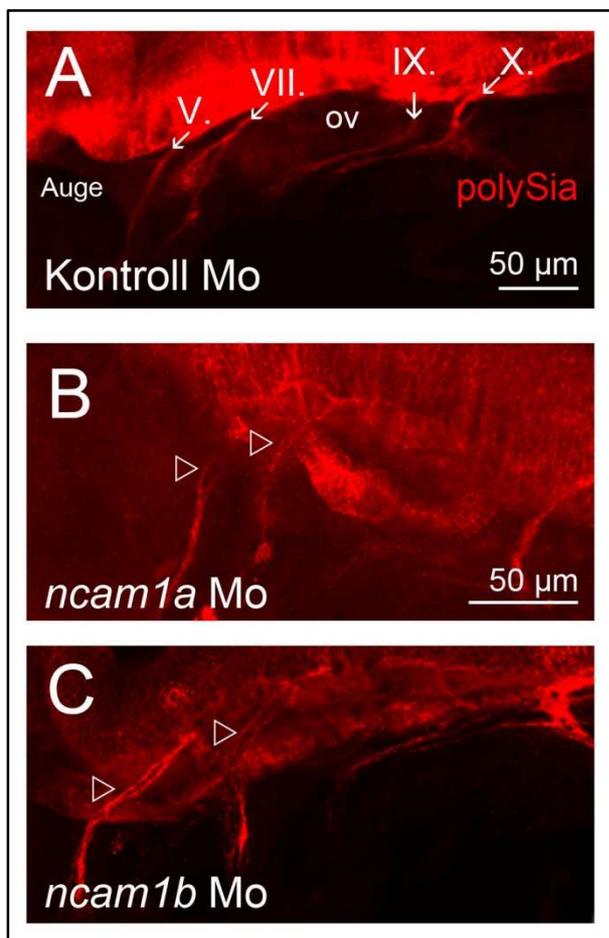


Abbildung 27: Defaszikulierung der Cranialnerven V und VII in den Knockdownembryonen

A-C) Laterale Ansicht von Morpholino-injizierten Zebrafischembryonen (36 hpf) immungefärbt gegen *polySia* (rot). Die Cranialnerven V.-X. befinden sich posterior vom Auge und anterior bzw. posterior vom otischen Vesikel (ov). **A)** Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden, zeigen eine *polySia*-Expression auf den Cranialnerven V, VII, IX und X. Die Axone dieser Nerven liegen faszikuliert vor. **B)** Nach *ncam1a*-Knockdown zeigen sich leichte Veränderungen an den Cranialnerven V und VII (Pfeilspitzen). **C)** In den *ncam1b*-Knockdownembryonen sind die Axone der Cranialnerven deutlich in mehrere Bündel aufgespalten (Pfeilspitzen in C).

Der Maßstabsbalken in B gilt für die Abbildung B und C.

Abkürzungen: Mo: Morpholino, ov: otischer Vesikel.

Immunfärbung gleichzeitig den Knockdown verfolgen kann, wie auch den Verlauf der Axone sieht (siehe Abbildung 27). Die Embryonen, die mit einem Kontroll-Morpholino injiziert wurden weisen eine polySia-Expression auf den Cranialnerven V, VII, IX und X auf. Die Axone liegen faszikulierte vor (siehe Pfeile in Abbildung 27 A). Nach dem Knockdown von *ncam1a* zeigen sich leichte Aufspaltungen in den Axonbündeln der Cranialnerven (siehe Pfeilspitzen in Abbildung 27 B). In den *ncam1b*-Knockdownembryonen ist das defaszikulierte Wachstumsmuster ausgeprägter als nach *ncam1a*-Knockdown. Die Aufspaltungen der Axonbündel sind länger und deutlicher (Pfeilspitzen in Abbildung 27 C). Eine statistische Auswertung der Phänotypen wurde hier nicht durchgeführt, da dies bereits für den N.vagus erfolgt ist.

4.3.4 Verändertes Bewegungsmuster nach *ncam1b*-Knockdown

Um den Einfluss von Ncam1a bzw. Ncam1b auf die Motorik der ZF-Embryonen zu studieren, wurden Knockdown-Embryonen über mehrere Tage bei 28,5 °C in E3-Medium gehalten. Die Knockdown-Embryonen schlüpfen später als die Kontroll-Embryonen. Im Alter von 72 hpf sind 28,6 % der *ncam1a*- (n=105) und 41 % der *ncam1b*- (n=99) Knockdownembryonen noch nicht geschlüpft. Im Vergleich dazu sind 98 % der Kontroll-Morpholino-Embryonen (n=78) nach 72 Stunden und 100 % der WT-Embryonen (n=148) nach 48 Stunden geschlüpft. Möglicherweise ist das Schlüpfen der Embryonen aus dem Chorion aufgrund eingeschränkter Beweglichkeit reduziert. Dass auch die Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden eine Verzögerung aufweisen zeigt, dass durch die Injektion die Entwicklung der Embryonen verlangsamt ist.

Desweiteren wurde das Schwimmverhalten der Knockdown-Embryonen im Stadium von 72 hpf getestet. Die Embryonen wurden mit einer Pinzette berührt, um eine Fluchtreaktion auszulösen. Ein Teil der *ncam1b*-Knockdownembryonen zeigt ein kreisförmiges Schwimmmuster (siehe Abbildung 28 A-I). Nach der Berührung schwimmen sie nicht so schnell wie möglich, geradlinig davon, sondern in Form eines Kreises. Dieses Bewegungsmuster ist unterschiedlich ausgeprägt und variiert von bogen- bis kreisförmig. Es wurden auch Embryonen beobachtet, die gar nicht davonschwammen, sondern nur die Brustflossen bewegten. Diese Phänotypen wurden in den durchgeführten Langzeitversuchen nie bei *ncam1a*-Knockdownembryonen oder Kontroll-Embryonen beobachtet. Eine statistische Auswertung der Verteilung der verschiedenen Phänotypen, wird Teil zukünftiger Projekte sein.

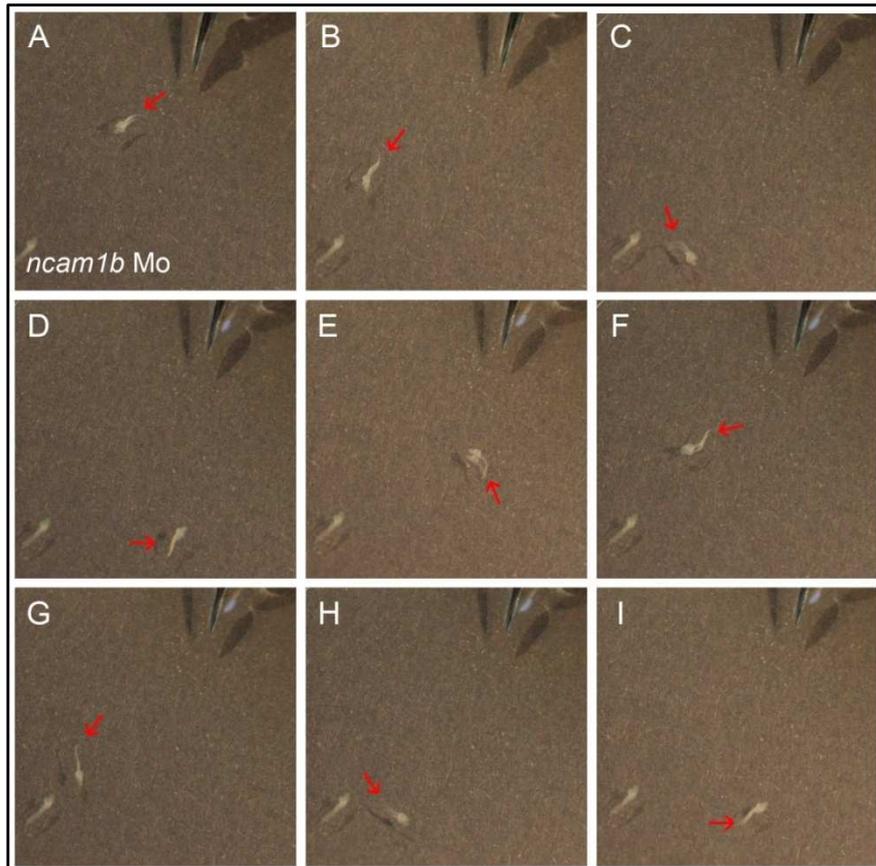


Abbildung 28:
Bogenförmiges
Schwimmverhalten
der *ncam1b*-
Knockdown-
Embryonen

A-I) Digitale Aufnahmen eines im Kreis schwimmenden Zebrafischembryos (72 hpf) in einer Petrischale mit E3-Medium. Die Bilder wurden im Abstand von 1/500 sec. aufgenommen. Die roten Pfeile zeigen die jeweils vorausgegangene Schwimmbewegung auf.

Möglicherweise ist das veränderte Schwimmverhalten auf eine Veränderung des Seitenlinienorgans zurückzuführen, da hier *Ncam1a* und *Ncam1b* ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen (siehe Abbildung 13 und 14). Um dies zu untersuchen wurden die *ncam1b*-Knockdownembryonen, die bogenförmig schwimmen im Stadium von 72 hpf fixiert und immungefärbt gegen Tag-1 (Abbildung 29). Die Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden, weisen ein eiförmiges Ganglion (g) auf (Abbildung 29 A). Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der Ausbildung des Seitenliniennerv-Ganglions in den *ncam1b*-Knockdownembryonen. Die Größe des Ganglions ist zum Teil so stark reduziert, dass es in den Bild-Projektionen nicht mehr erkennbar ist (Abbildung 29 B-C). Der Bereich in dem das Ganglion normalerweise liegt wurde nochmals vergrößert und ist jeweils unten rechts im Bild eingefügt.

Um eine Erklärung für das kreisförmige Schwimmverhalten der *ncam1b*-Knockdownembryonen zu bekommen wurden die Ganglien auf beiden Seiten eines ZF-Embryos miteinander verglichen. In Abbildung 29 D und D' sind die beiden Ganglien eines *ncam1b*-Knockdownembryos zu sehen. Auf der einen Seite besteht das Ganglion aus 2-3 Zellkörpern (D) während es auf der anderen Seite (D') deutlich größer ausfällt. Der *ncam1b*-Knockdownembryo in Abbildung 29 E und E' zeigt ein ähnliches Bild.

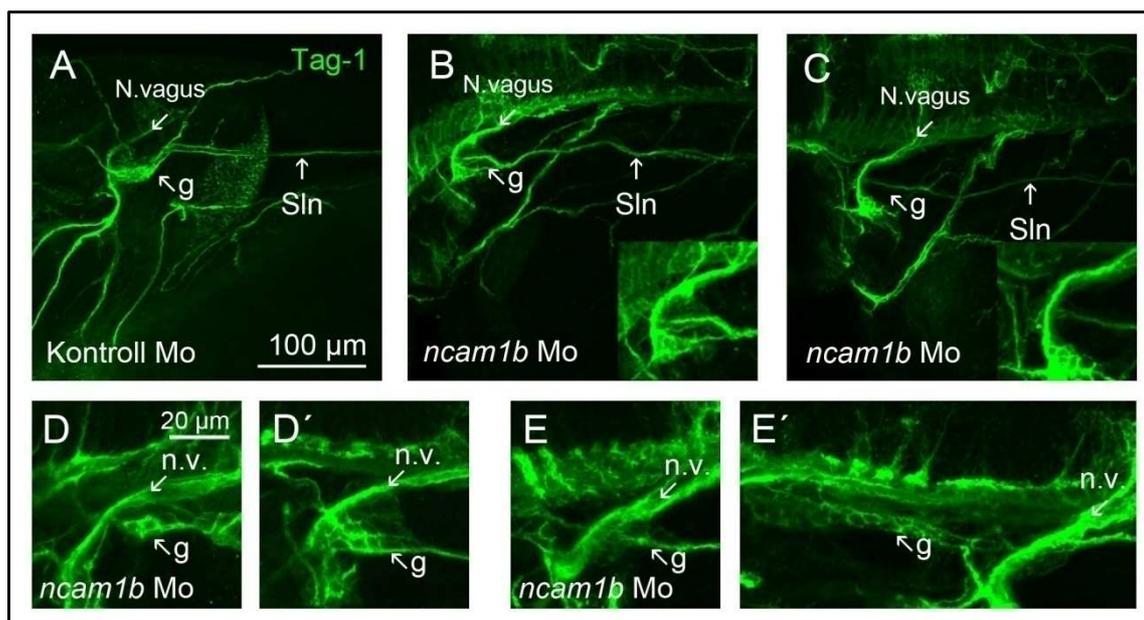


Abbildung 29: Einseitig stark reduziertes Ganglion führt zu verändertem Schwimmverhalten nach *ncam1b*-Knockdown

A-C) Übersichtsaufnahmen von lateral, über den Bereich caudal vom otischen Vesikel. Die Zebrafischembryonen wurden mit Morpholinos injiziert und gegen Tag-1 immungefärbt. **D-E')** Laterale Ansicht des Ganglions des posterioren Seitenliniennervs jeweils auf beiden Seiten eines Embryos.

A) In den Embryonen, die mit dem Kontroll Morpholino injiziert wurden, liegt das Ganglion (g) des posterioren Seitenliniennervs caudal vom Nervus vagus als eiförmige Struktur vor. **B, C)** In *ncam1b*-Knockdownembryonen kommt es zu einer starken Reduktion des Ganglions. Um den Bereich des Ganglions besser zu erkennen, wurde dieser Bereich vergrößert, siehe kleine Abbildungen jeweils unten rechts im Bild. **D, D')** Die Aufnahmen der Ganglien auf beiden Seiten eines *ncam1b*-Knockdownembryos zeigen, dass auf einer Seite das Ganglion bis auf 1-3 Zellkörper reduziert ist (D) während auf der anderen Seite eine Ansammlung von Nervenzellkörpern (auch unterhalb des N.vagus) vorhanden ist (D'). **E, E')** Der hier gezeigte *ncam1b*-Knockdownembryo besitzt auf einer Seite kein erkennbares Ganglion (E) und auf der anderen Seite besteht das Ganglion aus kettenförmig aufgereihten Zellkörpern (E').

Maßstabsbalken in A) gilt für die Abbildungen A-C) und der Maßstabsbalken in D) gilt für die Abbildungen D-E'.

Abkürzungen: g: Ganglion, N.: Nervus, Mo: Morpholino, Sln: Seitenliniennerv.

Auf einer Seite ist das Ganglion so stark reduziert, dass es nicht mehr erkennbar ist (E) und auf der anderen Seite besteht das Ganglion aus kettenförmig aufgereihten Zellkörpern (E'). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Ausbildung des Ganglions und dem Schwimmverhalten besteht.

Ncam1b wird nicht nur auf dem Ganglion des posterioren Seitenliniennervs exprimiert, sondern auch auf dem Neuromasten-Primordium (siehe Abbildung 14). Daher besteht die

Möglichkeit, dass auch die Ausbildung der Neuromasten in den Knockdownembryonen gestört ist. Mit Hilfe der vorliegenden Immunfärbungen können diese jedoch nicht detektiert werden.

Im Vergleich mit den Kontroll-Embryonen zeigen die *ncam1b*-Knockdownembryonen auch eine Verbreiterung des Nervus vagus (Abbildung 29 B und C). Vermutlich kommt es in Folge der Aufspaltung des N.vagus in mehrere Axonbündel (siehe Abbildung 26 C) zu dieser Verbreiterung.

4.3.5 Reduzierte Stabilität der Knockdown-Embryonen

Nach dem Knockdown von *ncam1a* oder *ncam1b* kommt es nicht nur zu einer Veränderung bezüglich der Axonausbildung, sondern auch zu einer Reduktion der „Stabilität“ der Zebrafischembryonen. Dies fällt insbesondere beim Einbetten der Embryonen in die zähflüssige Lösung Mowiol auf. Bei den Wildtyp- oder Kontroll-Embryonen bleibt der Kopf als dreidimensionale Struktur beim Einbetten erhalten, während er bei den Knockdownembryonen weich ist und in sich zusammensinkt. Im Schwanzbereich fällt die Instabilität insbesondere bei den *ncam1b*-Knockdownembryonen auf. Bei Ihnen wird der Schwanz häufig beim Einbetten verdreht, während er bei den Wildtyp- oder Kontroll-Embryonen (36 hpf) starr, wie ein Stab, lateral liegen bleibt. Um einen kleinen Einblick in den vorhandenen Phänotyp zu geben wurden Aufnahmen von lateral auf den Schwanz von morpholino-injizierten, immungefärbten Zebrafischembryonen (36 hpf) gemacht. Die Immunfärbung wurde gegen polySia (rot) und Tag-1 (grün) durchgeführt, um den Knockdown anhand der polySia-Expression zu verfolgen und in Kombination dazu die Lage der Motoraxone zu detektieren.

Die Zebrafischembryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden, weisen eine polySia-Expression auf allen Zellen im Rückenmark und auf den Motoraxonen auf (Abbildung 30 A), wobei sich die Immunfärbung der Motoraxone gegen Tag-1 (grün) mit der polySia-Färbung (rot) überlagert. Die Motoraxone ziehen in einem leichten Bogen nach caudal.

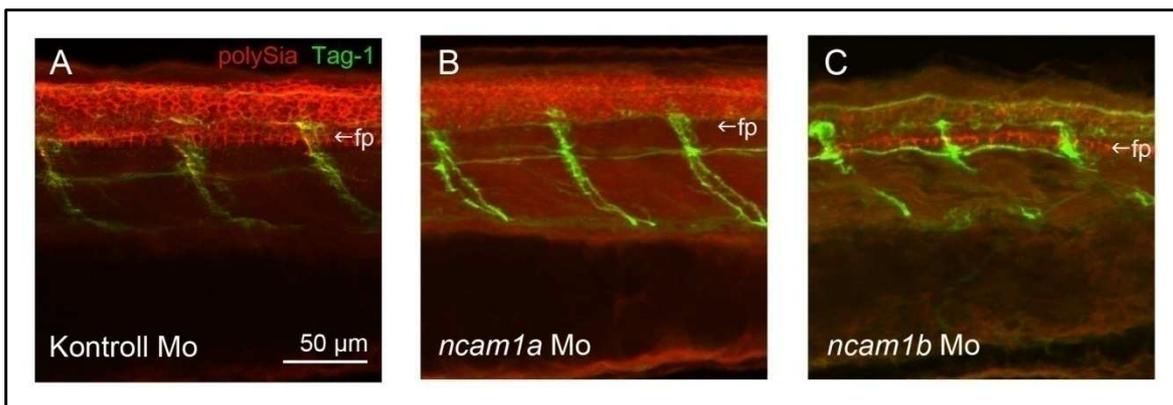


Abbildung 30: Reduzierte „Stabilität“ entlang des Rückenmarks nach *ncam1b*-Knockdown

A-C) Laterale Ansicht eines Schwanzabschnitts von Morpholino-injizierten-Zebrafischembryonen (36 hpf) immungefärbt gegen polySia (rot) und Tag-1 (grün). **A)** Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino injiziert wurden zeigen eine wildtypartige Immunfärbung und eine normale Lage der Motoraxone. **B)** *Ncam1a*-Knockdownembryo weist keine Immunfärbung gegen polySia auf den Floorplate-Zellen auf und es zeigen sich leichte Unregelmäßigkeiten in der Lage der Motoraxone. **C)** Nach dem *ncam1b*-Knockdown ist eine deutliche Veränderung der Lage des Schwanzes zu erkennen. Die Axone liegen wellenartig im Schwanzbereich und verschwinden teilweise im Gewebe.

Maßstabsbalken in A gilt für die Bilder A-C. Abkürzung: fp: Floorplate, Mo: Morpholino.

Nach Injektion des *ncam1a*-Morpholinos fehlt die polySia-Expression auf den Floorplate(fp)-Zellen im ventralen Teil des Rückenmarks und auf den Motoraxonen ist die Expression reduziert (Abbildung 30 B). Dadurch tritt die Immunfärbung der Motoraxone gegen Tag-1 in einem hellen Grün deutlicher, als in Abbildung 30 A, hervor. Desweiteren wird die Lage der Axone in der Immunfärbung gegen Tag-1 deutlich. Nach dem *ncam1a*-Knockdown zeigen sich leichte Unregelmäßigkeiten bei den Axonen, aber der Schwanz liegt ähnlich wie im Kontroll-Embryo in Abbildung 30 A. Die Stabilität ist nur leicht reduziert, möglicherweise aufgrund der fehlenden *ncam1a*-Expression auf den Floorplate-Zellen (siehe Abbildung 30 B). In den *ncam1b*-Knockdown-Embryonen, dagegen zeigt sich eine starke Veränderung im Zebrafischschwanz (siehe Abbildung 30 C). Der Verlauf der Motoraxone ist unregelmäßig, wellenförmig und zum Teil nicht komplett erkennbar. Sie scheinen manchmal ins Gewebe „einzutauchen“. Möglicherweise ist die Expression von *ncam1b* auf den Zellen im Rückenmark notwendig, um den Embryo in diesem Bereich zu stabilisieren.

Die Funktion von Ncam2 im Zebrafisch wurde nicht in der vorliegenden Arbeit untersucht, da dies bereits von einer anderen Arbeitsgruppe analysiert wird (Miyasaka et al., 2009).

4.4 Funktion der CPE-Sequenzen in der 3'UTR von mRNA im Zebrafischembryo

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nicht nur die Funktion der Vertreter der NCAM-Familie im Zebrafischembryo untersucht werden, sondern auch deren Expressionsregulation. Im Nervensystem des Zebrafischembryos bestehen verschiedene Polysialylierungsmuster. Die meisten Neurone tragen polySia nur auf dem Zellkörper und nicht auf ihrem Axon. Ausnahmen dazu sind die posteriore Kommissur, die Cranialnerven V, VII, IX und X und die Motoraxone im Schwanz (Marx et al., 2001). Unklar ist bisher, wie dieses Expressionsmuster reguliert wird. Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür liefert die Existenz von sogenannten CPE-Sequenzen in der 3'UTR von *ncam1a*, *ncam1b* und der Polysialyltransferase *st8sia2* (Marx, 2002, Dietzsch, 2008). Im Huhn wurde bereits 2002 gezeigt, dass die mRNA des EphA2-Rezeptors über die CPE-Sequenz ins Axon transportiert wird, um dort lokal translatiert zu werden (Brittis et al., 2002). Möglicherweise wird auch im Zebrafisch die mRNA von *ncam1a*, *ncam1b* und *st8sia2* in manche Axone über das CPE transportiert, während sie in anderen Neuronen ausschließlich im Zellkörper translatiert wird.

Die Funktion der CPE-Sequenzen wird in dieser Studie mit Hilfe von Reporterkonstrukten aus dem Tol2kit untersucht werden. Der Tol2kit wurde entwickelt, um transgene Zebrafischembryonen mit einer hohen Erfolgsrate herzustellen (Kwan et al., 2007). Die Vektoren enthalten Transposon-Elemente, die für die Integration der DNA ins Zebrafischgenom wichtig sind (Kwan et al., 2007). Die Reporterkonstrukte bestehen aus 3 Komponenten: dem 5'Element mit dem Promotor, dem Reportergen in der Mitte und dem 3'Element. In den 5'Bereich wurde der Hb9-Promotor kloniert, damit das Konstrukt in den Motoneuronen exprimiert wird (Nakano et al., 2005), dem natürlichen Expressionsort von *ncam1a*, *ncam1b* und *st8sia2* (Mizuno et al., 2001, Marx et al., 2007). Die Reporterproteine wurden nach ihrem Expressionsort ausgewählt und im 3'Bereich des Expressionsvektors wurde die 3'UTR mit oder ohne CPE-Sequenzen eingesetzt.

4.4.1 Die CPE-Sequenz der 3'UTR von *st8sia2*-mRNA verhindert die Expression des Reporterkonstrukts

Für die Funktionsanalyse der CPE-Sequenz der *st8sia2*-mRNA wurde ein spezifisches Reportergen eingesetzt. Eine Kombination aus *egfp* („enhanced green fluorescent protein“) und der Golgi-Lokalisationssequenz der Polysialyltransferase *st8sia2* wurde kloniert. Dadurch soll das Reporter-Protein, wie das Enzym St8Sia2, in der Golgi-Membran exprimiert werden. Im 3'Vektor wurde die komplette 3'UTR der *st8sia2*-mRNA,

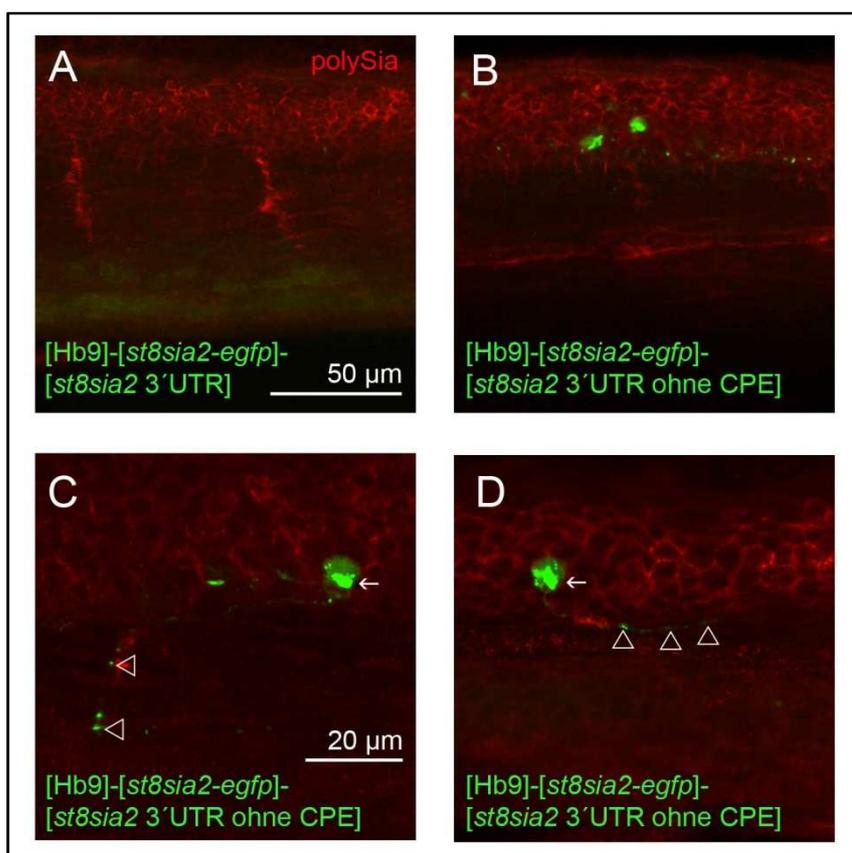


Abbildung 31: CPE-Sequenz der *st8sia2*-mRNA blockiert Translation

A-D) Laterale Ansichten eines Schwanzabschnitts von transfizierten Zebrafischembryonen (36 hpf) die gegen polySia immungefärbt wurden. **A)** Embryonen, die mit dem Reporterkonstrukt [Hb9-Promotor]-[*st8sia2-egfp*]-[*st8sia2* 3'UTR] injiziert wurden zeigen keine grüne Fluoreszenz. **B)** Embryonen, die mit dem Reporterkonstrukt [Hb9-Promotor]-[*st8sia2-egfp*]-[*st8sia2* 3'UTR ohne CPE] injiziert wurden zeigen eine *st8sia2-egfp*-Expression in manchen Motoraxonen. **C,D)** *st8sia2-egfp*-Expression im Golgi-Apparat der Motoraxone sichtbar im Zellkörper (siehe Pfeil) und entlang des Axons (siehe Pfeilspitze).

Der Maßstabsbalken in A gilt für A+B und der Maßstabsbalken in C gilt für C+D.

einmal mit und einmal ohne CPE-Sequenz eingesetzt. Zebrafischembryonen wurden im 1-2 Zellstadium mit den Reporterkonstrukten injiziert und im Stadium von 36 hpf fixiert und gegen polySia immungefärbt. Die Färbung erleichtert die Lokalisation des Rückenmarks und damit der Zellkörper der Motoneurone. Nach der Injektion des Reporterkonstrukts [Hb9-Promotor]-[*st8sia2-egfp*]-[*st8sia2* 3'UTR] konnte keine *st8sia2-egfp*-Expression in den ZF-Embryonen festgestellt werden (Abbildung 31 A). In einer lateralen

Ansicht eines Abschnitts im Zebrafischschwanz zeigt sich nur die Immunfärbung gegen polySia auf den Zellen des Rückenmarks und auf den Motoraxonen. Anscheinend wird die Expression des Reporterproteins St8Sia2-EGFP durch das Anhängen der 3'UTR der *st8sia2*-mRNA blockiert.

Nach Injektion des Reporterkonstrukts [Hb9-Promotor]-[*st8sia2-egfp*]-[*st8sia2* 3'UTR ohne CPE] zeigt sich eine *st8sia2-egfp*-Expression. Grünleuchtende Zellkörper innerhalb des mit dem polySia-Antikörper immungefärbten Rückenmarks sind zunächst zu erkennen (Abbildung 31 B). Da der Hb9-Promotor für das Reporterkonstrukt verwendet wurde, kann man davon ausgehen, dass es sich um den Zellkörper von Motoneuronen handelt. Um eine genauere Lokalisation der *st8sia2-egfp*-Expression zu ermitteln wurden weitere Embryonen mit einer höheren Vergrößerung (C-Apochromat 40x/1.2 W Korr) aufgenommen. Die Aufnahmen zeigen eine *st8sia2-egfp*-Expression in einem Teil des Zellkörpers, wobei es sich möglicherweise um den Golgi-Apparat handelt (siehe Pfeil in Abbildung 31 C und D). Desweiteren ist eine Fluoreszenz in kleinen Strukturen, die in Reihen hintereinander zu liegen scheinen, zu erkennen (siehe Pfeilspitzen in Abbildung 31 C und D). Vermutlich wurde St8Sia2-EGFP ebenfalls in Membrankompartimente des Golgi-Apparates innerhalb des Axons eingebaut.

4.4.2 Funktion der CPEs in der 3'UTR von *ncam1a* und *ncam1b*?

Zur Funktionsanalyse der CPE-Motive in der *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-mRNA wurden in früheren Untersuchungen Morpholinos gegen die CPE-Elemente injiziert (Dietzsch, 2008). Die Zebrafischembryonen zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich des Wachstumsmusters der Motoraxone oder bezüglich der polySia-Expression (Dietzsch, 2008). Um eine mögliche Erklärung für die fehlende Reaktion auf die CPE-Morpholinos zu finden, wurden die 3'UTR-Sequenzen von mir nochmals genauer analysiert. Im Folgenden sind die 3'UTR-Sequenzen der *ncam1a*- und *ncam1b*-mRNA gezeigt (Dietzsch, 2008). Die unterstrichenen Sequenzen zeigen die Bindungsstelle der CPE-Morpholinos und die CPE-Motive sind rot markiert. CPE-ähnliche Sequenzen werden in grün gezeigt. Für eine funktionsfähige CPE-abhängige Regulation der Translation in *Xenopus* Oocyten ist neben der CPE-Sequenz auch eine sogenannte Hexanukleotid-Sequenz (AUUAAA bzw. AAUAAA) notwendig (Kim und Richter, 2006, Richter, 2007). Deshalb wurde in der folgenden 3'UTR der *ncam1a*- und *ncam1b*-mRNA auch die Hexanukleotid-Sequenz in orange markiert. Da die vorliegende Sequenz aus der Dissertation von M. Dietzsch, 2008

übernommen wurde, ist hier, obwohl es sich um mRNA handelt die Base Uracil (U) durch Thymin (T) ersetzt.

Ncam1a-3'UTR:

```
TGGGAAATCAGCAGACAGTCGCAGACAGACAGCACCACACCACCACCACCTTCTCAGATACAAGGCTTTCAGTAACTGTGTCTTCTTTGA
GTTTCGCAGAACAAAACACATCTGTAGATGTATAGAGCACCTAAAGAGCTCGCACACTTGCCTTTGATTTTGTACTTTTCATTTGTTATC
ACTATTGAAATGTCGTTTCTTTCAAAAACGCAAGAAGGAAAGATTCTTCACCTCTAGCACAGTCTCCTTGACCTCTGTGAGTAAGACCA
GCATCTTTCAAGTACACTCAGTTTTTGTFTTTTGTAGGAAGAGAAATTTTGCTTTTACACATTCAGCCCAGCGAGATGTTTCAGTTAAGT
CCCGTCTTATAACATGCAGTATTGCCATCATTATTGTCTGCCACATTCTTATTCTTTTGGGAACATTTTTAATGTTTACTTGTGTTTAA
ATAATGTACAAAAACAACCGCCTTTTTATTTTATTTTTTTCACATGATTTTAGCGCTAGATTTTGTAGCAGCTTGCCTTGCAGAATGATT
CCAGCCCTGAGTATTTCACAGCATTCTTACTTTGATAAAACCTGCTGTTTGCCTCACAGAAGATTACACAACTAAAGGTCTGAACTAGTGG
TTAGGTTTGAATAAAAAATCGCCACTTTATTTCTGTTTTACACATACTTTCATTTTACAACACATGCCGTTTCTCTGAGCCTCAGGGT
TCCTTCCATTTAGTTTTGGTTTTTGTAGAGCAGGATTGAGAGTCAAATAGGTCTCCACAGTGATCTTTGCTTAAAAACGTCCCGCAAGTCC
TTTTAAAAACATTAGGAACAACCTCGGAGCTCTTAGATATGGATCGAATGGCTCCTTGAGAGG
```

Die CPE-Sequenz wird in der Literatur variabel mit der folgenden Sequenz erwähnt: UUUUUA₁₋₃U (Fox et al., 1989, McGrew et al., 1989, McGrew und Richter, 1990). Daher findet man in der *ncam1a*-3'UTR ein weiteres vollausgeprägtes CPE-Motiv (rot markiert) und 2 Sequenzen die dem CPE sehr ähneln (grün markiert). Möglicherweise müssen beide vollständigen CPE-Motive in der 3'UTR der *ncam1a*-mRNA blockiert oder entfernt werden, um einen Effekt zu erkennen. Dies wird mit dem Einsatz von Reporterkonstrukten untersucht. Desweiteren gibt es eine Hexanukleotid-Sequenz, auch Polyadenylierungssequenz genannt, in der *ncam1a*-3'UTR.

Ncam1b-3'UTR:

```
AACCACCGATGGAGAAGAAAAGTGTATGACCATGAACGTGTTGTTAATCAGTGCCCTTAAAGATTTTCTCAAACGAAACGGTGT
ATATTTCTATACAGAAGTCTCATTATAATGTGCATTTTCCTTTTATTTTGGAGTAAAGATTTCAGTAAACTTCCAGAAGCTTCTATTTTGA
GGACTTAAATCAAATTCATTTAAAACAAAATGCTTTGTAGAACTCTTGTGTGTTTTTGTATTTTATTTTATTTCTTTTCTTTGATG
ATCCAACAGGGCAAGCTATTTCAGGAGAATTATATATTCAGTAATATGTTTTATTTCGCATAAAACATGTTAAAATGTAATGATTTCTGA
TATTTTTTATCTTGAGTGTGTTGAGGGCTAGGTTTGGTTTGTCTTTTTATTAAATTTTATCATTATGTTTTAATTACAGTAACTGTTTTG
CCTCTGGATGATAAATTAATCACTGATGGCAGTTATGTAACACAAAAATATCTTAAAGATTTTAACTACTGTTATGACCAAGGATCT
GTAAAGATTTCAAGTTAGCCATTTGATTGGTTGAAGTCTTATTAGATCAGTTTTTTACAGTTTTGTCGGTGTATTTCTAATATCTGAGA
TTTAATACTTTCAATCATTCTTCCACGTGC
```

Die 3'UTR-Sequenz der *ncam1b*-mRNA enthält nur ein komplettes CPE-Motiv, an das auch der verwendete Morpholino bindet (siehe unterstrichene Sequenz). Es gibt aber noch 6 weitere Sequenzabfolgen, die dem CPE sehr ähneln (grün markiert). Das Hexanukleotid in der *ncam1b*-3'UTR ist unvollständig. Es fehlt eine Adenin-Base am 5'Ende. Eine Mutation führte wahrscheinlich zum Austausch der Basen (A -> G). Ob die Hexanukleotid-Sequenz noch funktionsfähig ist bleibt unklar. Der Abstand zum CPE-Motiv ist ähnlich wie in der *ncam1a*-3'UTR. Dies deutet auf eine ehemals funktionierende Einheit hin.

Die Experimente zur Funktion der CPE-Sequenzen in den 3'UTRs von *ncam1a* und *ncam1b* wurden in einer von mir angeleiteten Diplomarbeit durchgeführt (Fischer, 2010).

Mit Hilfe des Tol2-Systems wurden die folgenden Reporterkonstrukte hergestellt: [Hb9-Promotor]-[prenyliertes EGFP]-[3'UTR der *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-mRNA mit oder ohne CPE-Sequenzen]. Die posttranslationale Modifikation des Reporterproteins EGFP mit einem hydrophoben Terpenrest (Prenylierung) führt zur Intergration des Proteins in die Plasmamembran oder in die Membran von Organellen (Amaya et al., 2011). Nach Injektion der verschiedenen Konstrukte (mit oder ohne CPE-Sequenzen) zeigte sich die Expression von prenyliertem EGFP immer im Zellkörper und in den Axonen der Motoneurone (Fischer, 2010). Möglicherweise weist dies darauf hin, dass die Translation von *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-mRNA nicht über die CPE-Sequenzen reguliert wird.

Da für die CPE-Sequenz der *st8sia2* bereits eine Blockierung der Translation mittels Reporterkonstrukte gezeigt wurde (Langhauser, 2008), wurde das Reporterprotein prenyliertes EGFP auch mit der 3'UTR von *st8sia2*-mRNA kombiniert. Die anschließende Injektion des Reporterkonstrukts [Hb9-Promotor]-[prenyliertes EGFP]-[3'UTR der *st8sia2*-mRNA] zeigte, dass auch hier keine Inhibition der Expression des Reporterproteins durch die 3'UTR der *st8sia2*-mRNA (inklusive CPE-Sequenz) stattfindet (Fischer, 2010).

Im Vergleich mit dem Reporterkonstrukt [Hb9-Promotor]-[*st8sia2*-egfp]-[3'UTR der *st8sia2*-mRNA] dessen Expression durch das Anhängen der 3'UTR der *st8sia2*-mRNA unterdrückt wird (Abbildung 29), liegt der Rückschluß nahe, dass prenyliertes EGFP ein ungeeignetes Reporterprotein für die Analyse der CPE-Funktion ist.

5 Diskussion

Zelladhäsionsmoleküle sind nicht nur die Grundlage für den Aufbau von Geweben, sondern sie übermitteln auch Signale von extra- nach intrazellulär und beeinflussen damit die Zellkommunikation, die z.B. für die Ausbildung des Nervensystems eine wichtige Rolle spielt (Gumbiner, 1996, Bonfanti, 2006, Hildebrandt et al., 2007). Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie im Modellorganismus Zebrafisch spezifische Funktionen bezüglich der Bildung von Axontrakten im Nervensystem besitzen. Die zwei Paraloge *Ncam1a* und *Ncam1b* werden in einem unterschiedlichen, zum Teil überlappenden, Muster während der Entwicklung des Nervensystems exprimiert. Beide Proteine werden posttranslational mit einem Polysaccharid, Polysialinsäure (polySia) genannt, modifiziert und besitzen differierende Funktionen innerhalb des Nervensystems im Zebrafischembryo.

Eine Analyse der homologen *NCAM*-Gensequenzen und ihrer Entstehung im Verlauf der Evolution zeigt, dass sie in zwei Gengruppen unterteilt werden können: *NCAM1* und *NCAM2* (Abbildung 32). Ein weiterer Duplikationsvorgang führte zu den paralogenen Genen *ncam1a* und *ncam1b* im Genom der Knochenfische (Teleostier). Die Gengruppe *NCAM1* kodiert im Zebrafisch für die Proteine *Ncam1a* (früher: zNCAM) und *Ncam1b* (früher: zPCAM) wohingegen die Gengruppe *NCAM2* für das Protein *Ncam2* (früher: zOCAM) kodiert. Die Duplikation des *ncam1*-Gens fand vermutlich im Rahmen der Strahlenflosser-spezifischen-Genomduplikation vor ungefähr 350 Millionen Jahren statt (Amores et al., 1998, Christoffels et al., 2004, Jaillon et al., 2004, Vandepoele et al., 2004, Meyer und Van de Peer, 2005). Weshalb es zur Konservierung von duplizierten Genen kommt, kann auf verschiedene Mechanismen beruhen:

- Eines der Gene bekommt eine neue, für den Organismus günstige Funktion und es kommt deshalb zu einer positiven Selektion, während das andere Gen die alten Funktionen behält (Ohno, 1970)
- die Funktionen werden unter den duplizierten Genen aufgeteilt und es kommt deshalb zur Genkonservierung (Force et al., 1999)
- die Genkonservierung findet aufgrund einer Subfunktionalisierung mit anschließender Etablierung neuer Funktionen statt (Lynch und Force, 2000, He und Zhang, 2005).

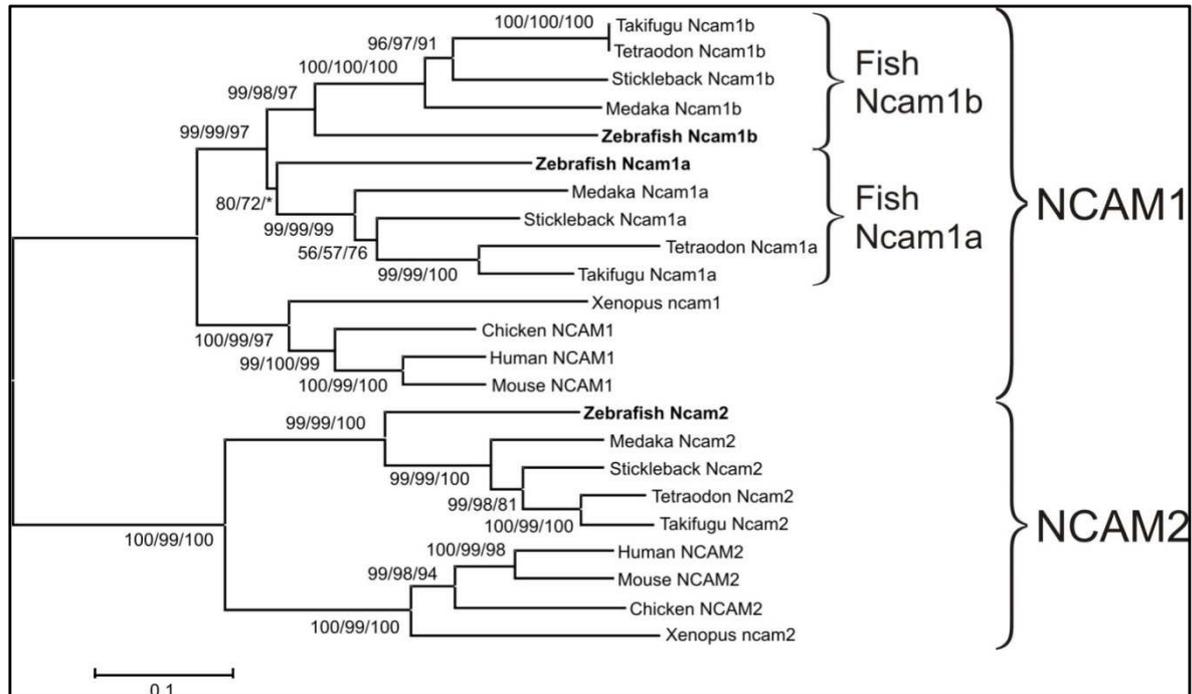


Abbildung 32: Evolutionsbedingte Verwandtschaftsbeziehungen der homologen *NCAM*-Genfamilie

In dieser Abbildung werden die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen homologen *NCAM*-Sequenzen in Knochenfischen und einigen Tetrapoden nach einer „unrooted neighbour joining“-Analyse gezeigt. Die Länge der Äste steht im direkten Verhältnis zum evolutionsbedingten Verwandtschaftsgrad der Gene zueinander (siehe Skala). Die Zahlen an den Verzweigungsstellen zeigen die sogenannten „bootstrap“ Werte für verschiedene Analysemethoden („neighbour joining“, „minimum evolution“, „maximum parsimony“). In Knochenfischen, wie dem Zebrafisch, besteht die *NCAM*-Genfamilie aus 3 Mitgliedern: *ncam1a*, *ncam1b* und *ncam2*, während im Genom von Tetrapoden nur die Sequenzen *NCAM1* und *NCAM2* vorhanden sind.

Möglicherweise blieben im Zebrafisch die Gene *ncam1a* und *ncam1b* aufgrund einer Subfunktionalisierung im Verlauf der Evolution erhalten. Für diese Theorie spricht das unterschiedliche und nur zum Teil überlappende Expressionsmuster von *ncam1a* und *ncam1b* im Zebrafischembryo. Eine Duplikation des *ncam2*-Gens konnte nicht gefunden werden. Dass diese Duplikation nicht stattfand ist eher unwahrscheinlich, da das komplette Genom dupliziert wurde. Möglicherweise kam es jedoch nach der Genomduplikation nicht zur Konservierung von *ncam2a* bzw. *ncam2b*. Eine mögliche Erklärung für das fehlende, duplizierte *ncam2*-Gen gibt das sogenannte klassische Modell. Es geht davon aus, dass eine Akkumulation von degenerativen Mutationen die Wahrscheinlichkeit der Genkonservierung reduziert (Ohno, 1970, Force et al., 1999).

Die taxonomischen Untersuchungen (Abbildung 32) zur Topologie der *NCAM*-Gene zeigen bei einer „unrooted neighbour joining“-Analyse eine etwas größere Homologie von *ncam1a* bezüglich des Vertebraten *NCAM1*-Gens, im Gegensatz zu *ncam1b*. Eine

Analyse zur Syntenie, die „maximum parsimony analyses“, dagegen demonstriert, dass genomische Veränderungen etwa gleich häufig in der Umgebung beider Gene stattgefunden haben, im Vergleich zu den NCAM1-Genen in Tetrapoden. Dies wurde als * bei der Abzweigung zu Zebrafisch Ncam1a in Abbildung 32 gekennzeichnet. Man kann daher davon ausgehen, dass die Gene *ncam1a* und *ncam1b* ungefähr gleich viele Unterschiede in Bezug zum Ursprungsgen besitzen, und dass sie den gleichen evolutionsbedingten Kräften ausgesetzt wurden. Durch die genetischen Veränderungen kam es wahrscheinlich zu den unterschiedlichen Expressionsmustern von Ncam1a und Ncam1b.

5.1 Die Expression von Ncam1a und Ncam1b im Zebrafischembryo

5.1.1 Differierende Expressionsmuster im sich entwickelnden Nervensystem

Der Einsatz spezifischer Antikörper gegen Ncam1a und Ncam1b ermöglicht einen detaillierten Einblick in die räumlich-unterschiedliche Expression der beiden Proteine im Nervensystem des sich entwickelnden Zebrafischs. Die ersten Signale sind in der Immunfärbung 11-12 Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilization/hpf) in den Zebrafischembryonen zu detektieren. Die Immunfärbung gegen Ncam1a weist ein auf den anterioren Bereich des Neuralrohrs beschränktes Signal auf, während die Ncam1b-Expression, in Form von zwei parallelen Streifen entlang des Neuralrohrs, nahezu die komplette Länge des Embryos umfasst.

Auch 17 hpf zeigt sich eine auf den rostralen Bereich des Nervensystems beschränkte Expression von Ncam1a. Die Immunfärbung gegen Ncam1b dagegen weist Signale im Bereich des Rückenmarks und auf den Zellen des otischen Vesikels auf. In der Dorsalansicht des Neuralrohrs wird deutlich, dass die Expression von Ncam1a und Ncam1b streifenförmig entlang des Neuralrohrs erfolgt. Wie es zu diesem Expressionsmuster kommt, kann durch die verschiedenen Entwicklungsschritte des Neuralrohrs erklärt werden. Während der Bildung der kielförmigen Struktur aus der Neuralplatte, kommt es im Zebrafischembryo zunächst zu zwei bilateral symmetrischen Verdickungen, die anschließend mit der medialen Verdickung fusionieren und den Kiel bilden (SCHMITZ et al., 1993). Die beiden bilateral symmetrischen Verdickungen sind 11-12 hpf in der Immunfärbung gegen Ncam1b von dorsal aus zu erkennen. Das

Auftreten einer medialen Verdickung entspricht dem dreistreifigen Expressionsmuster von Ncam1a und Ncam1b 17 Stunden nach der Befruchtung.

Im Gegensatz zu den vorherigen Immunfärbungen ist die Expression von Ncam1a 24 hpf auf allen Zellkörpern des zentralen Nervensystems (ZNS) zu detektieren, weist jedoch Unterschiede im Expressionslevel auf. Besonders deutliche Signale sind im Bereich des olfaktorischen Systems, den Rhombomeren 5-7 des Hinterhirns, dem anterioren Teil des otischen Vesikels und auf Neuronen im Rückenmark zu erkennen. Eine leichte Färbung zeigt sich im Bereich des Auges und auf dem posterioren Seitenliniennerv, inklusive dessen Ganglion. Die Ncam1b-Detektion erfolgt, im Kontrast zu den umfangreichen Signalen der Ncam1a-Färbung, nur in Teilbereichen des ZNS. Die Neurone im Übergang zwischen Di- und Mesencephalon, dem otischen Vesikels und innerhalb des Rückenmarks exprimieren Ncam1b. In der lateralen Ansicht eines Abschnitts im Zebrafischschwanz (24 hpf) zeigt sich ebenfalls ein unterschiedliches Expressionsmuster, das auf eine funktionelle Diversifizierung der beiden Zelladhäsionsmoleküle hinweist. Die Floorplate-Zellen im ventralen Bereich des Rückenmarks werden nur mit dem Antikörper gegen Ncam1a detektiert. Da diese Zellen in wichtige Prozesse, wie zum Beispiel die bilateralsymmetrische Anordnung von longitudinalen Axontrakten und die Führung kommissuraler Axone über die Mittellinie (Hatta, 1992, Bernhardt et al., 1992, Marx et al., 2001) involviert sind, besteht hier möglicherweise eine spezifische Funktion von Ncam1a.

36 Stunden nach der Befruchtung kann die Proteinexpression von Ncam1a und Ncam1b deutlich den verschiedenen Strukturen im sich entwickelnden Nervensystem zugeordnet werden. Ncam1a wird relativ gleichmäßig auf den Zellkörpern im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, wobei die Signale im Bereich des olfaktorischen Bulbus und der olfaktorischen Plakode, wie 24 hpf, etwas stärker hervortreten. Die Ncam1b-Expression ist weiterhin auf spezifische Bereiche im Nervensystem beschränkt. Neuronale Zellkörper im Bereich des olfaktorischen Bulbus, der Epiphyse, dem dorsalen Di- und Mesencephalons, der Cerebellumanlage und dem Hinterhirn weisen Signale mit dem Antikörper gegen Ncam1b auf. Die axonale Expression der Zelladhäsionsmoleküle erfolgt 36 hpf in einem spezifischen Muster. Die Axone der posterioren Kommissur sind die einzigen Axone im ZNS, die in den Immunfärbungen erfasst werden. Sie werden aber nur mit dem Antikörper gegen Ncam1a detektiert. Im peripheren Nervensystem sind beide Zelladhäsionsmoleküle auf den Cranialnerven V, VII, IX und X und den spinalen Motoraxone vorhanden. Das unterschiedliche Expressionsmuster im Bereich der posterioren Kommissur deutet auf eine funktionelle Diversifizierung der Zelladhäsionsmoleküle hin.

Im Bereich des otischen Vesikels ist ein weiterer Unterschied bezüglich der Expression der Zelladhäsionsmoleküle zu erkennen. Ncam1b wird auf allen Zellen des otischen Vesikel exprimiert, während Ncam1a nur auf Zellen im cranialen Bereich exprimiert wird. Dies weist ebenfalls auf eine Subfunktionalisierung der Proteine im Verlauf der Evolution hin.

Mit Hilfe der Immunfärbung gegen Ncam1a und Ncam1b konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine unterschiedliche Expressionsmuster innerhalb des Nervensystems im Zebrafischembryo besitzen. Die Ncam1a-Expression beginnt rostral und die Ncam1b-Expression entlang des sich entwickelnden Rückenmarks. Ein weiterer Unterschied ist, dass Ncam1a in den untersuchten Stadien relativ gleichmäßig auf den Zellkörpern des ZNS exprimiert wird, während Ncam1b ein lokal beschränktes Expressionsmuster aufweist. Spezifische Unterschiede konnten im Bereich der posterioren Kommissur, den Floorplate-Zellen im ventralen Rückenmark und auf den Zellen des otischen Vesikels detektiert werden. Ein weiterer Bereich des Nervensystems, das posteriore Seitenliniensystem, besitzt ebenfalls ein unterschiedliches Expressionsmuster bezüglich Ncam1a und Ncam1b.

5.1.2 Diversifizierung der Expressionsmuster von Ncam1a und Ncam1b entlang des posterioren Seitenlinienorgans

Das Seitenliniensystem des Zebrafischs wird in zwei Bereiche unterteilt, den anterioren und posterioren Teil (Chitnis et al., 2011). Sichtbar ist in den Immunfärbungen der vorliegenden Studie nur der posteriore Teil des Seitenliniensystems, da hier eine Expression von Ncam1a und Ncam1b detektiert wurde. Das Seitenliniensystem besteht aus mechanosensorischen Organen, den Neuromasten sowie dem Seitenliniennerv der die sensorischen Informationen zum Gehirn weiterleitet bzw. Informationen vom Gehirn zu den Neuromasten übermittelt (Chitnis et al., 2011). Ncam1a wird auf dem posterioren Seitenliniennerv, inklusive dem Ganglion, 24-48 hpf exprimiert. Die Ncam1b-Immunfärbung auf dem Seitenliniennerv ist nur 22 hpf deutlich zu erkennen. Bereits 24 hpf wird die Expression von Ncam1b auf dem Seitenliniennerv herunterreguliert. Dennoch konnte in diesem Alter eine schwache Ncam1b-Expression auf dem Primordium des Seitenlinienorgans detektiert werden. Das Primordium des Seitenlinienorgans entwickelt sich aus der Plakode des posterioren Seitenlinienorgans, die caudal vom

otischen Vesikel sitzt (Chitnis et al., 2011). Von dort aus wandert das Primordium entlang des horizontalen Myoseptums bis zur Schwanzspitze des Zebrafischembryos und bildet in regelmäßigen Abständen die Neuromasten. Die Wanderung erfolgt im Zebrafischembryo 20-40 hpf (Chitnis et al., 2011). Der Seitenliniennerv steht in Kontakt mit dem Primordium und folgt ihm entlang des Embryos (Chitnis et al., 2011). Die Expression von Ncam1b innerhalb des Seitenlinienorgans, während des Starts der Wanderung des Primordiums lässt eine spezifische Funktion vermuten.

Die zeitlich und räumlich unterschiedliche Expression von Ncam1a und Ncam1b im Bereich des posterioren Seitenliniennervs ist ein weiterer Hinweis für eine funktionelle Diversifizierung der beiden Zelladhäsionsmoleküle.

5.2 PolySia, die posttranslationale Modifikation von Ncam1a und Ncam1b im Zebrafischembryo

NCAM1 ist bei Säugetieren das Hauptakzeptor-Protein für polySia. Dies konnte durch die nahezu komplette Abwesenheit von polySia in NCAM1-Knockoutmäusen gezeigt werden (Cremer et al., 1994). In niederen Vertebraten (Xenopus, Salamander, Scheibenzüngler, Hühnchen) ist NCAM1 ebenfalls polysialyliert, ob dies jedoch das einzige Akzeptorprotein für polySia ist, wurde hier nicht untersucht (Sunshine et al., 1987, Becker et al., 1993b, Becker et al., 1993a, Williams et al., 1996). PolySia-NCAM1 wird bei Säugetieren und niederen Vertebraten insbesondere während der Entwicklung des Nervensystems exprimiert und ist in adulten Stadien nur in Gehirnbereichen zu finden, die mit Plastizität und Neurogenese verbunden werden (Rothbard et al., 1982, Chuong und Edelman, 1984a, Sunshine et al., 1987, Theodosis et al., 1991, Seki und Arai, 1993). Im Zebrafisch findet man ebenfalls ein mit der Entwicklung des Nervensystems korrelierendes polySia-Expressionsmuster (Marx et al., 2001, Marx, 2002). Ab dem Stadium von 17 hpf, kurz nach der Ausbildung der ersten Axone, kann polySia im sich entwickelnden Nervensystem detektiert werden (Trevarrow et al., 1990, Marx et al., 2001). Ab 48 hpf, nachdem die meisten Axone und Axontrakte ihr Zielgebiet erreicht haben, wird die polySia-Expression herunterreguliert (Marx et al., 2001, Marx, 2002).

Über die Akzeptor-Moleküle für polySia im Zebrafisch ist zu Beginn dieser Studie nichts Genaues bekannt. Mögliche Glykosilierungsstellen von Ncam1a, Ncam1b und Ncam2 sind vorhanden (Mizuno et al., 2001). Ob diese jedoch polysialyliert sind, wurde noch

nicht untersucht (Mizuno et al., 2001). Desweiteren wurde eine Kolokalisation von Ncam1a mit polySia in der Zebrafisch-Retina detektiert (Kustermann et al., 2010). Bisherige Knockdown-Versuche gegen Ncam1a und Ncam1b führten nicht zur kompletten Entfernung von polySia im Nervensystem des Zebrafischembryos (Dietzsch, 2008). Erst der Einsatz geeigneter Morpholinos und die Kontrolle des Knockdowns mit Hilfe spezifischer Antikörper in der vorliegenden Arbeit, ermöglichte eine fundierte Untersuchung zur Polysialylierung im Zebrafischembryo. Es konnte gezeigt werden, dass beide Paraloge Ncam1a und Ncam1b posttranslational mit polySia modifiziert werden. In welchen neuronalen Strukturen Ncam1a und/oder Ncam1b polysialyliert vorliegen, wurde anhand von Immunfärbungen im caudalen Bereich des Nervensystems im Zebrafischschwanz aufgezeigt und in spezifischen Teilbereichen des Nervensystems im Zebrafischembryo quantifiziert.

Die Detektion der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle erfolgte mit dem polyklonalen Antikörper 704 (Marx et al., 2001, Marx, 2002, Dietzsch, 2008) und die Detektion der Polysialinsäure (polySia) mit dem monoklonalen Antikörper 735 (Frosch et al., 1985). Der Knockdown von *ncam1a* führt im Vergleich zum Kontrollembryo zu einer veränderten Immunfärbung mit beiden Antikörpern. Die spinalen Motoraxone weisen nur noch schwache Signale auf und die Floorplate-Zellen im ventralen Teil des Rückenmarks werden in den *ncam1a*-Knockdownembryonen überhaupt nicht mehr detektiert. Daraus können mehrere Schlussfolgerungen getroffen werden. Ncam1a wird im Zebrafischembryo polysialyliert und es ist das einzige Protein, das auf den Floorplate-Zellen polysialyliert vorliegt. Es gibt mindestens ein weiteres Protein das im Zebrafischembryo polysialyliert wird, da die Immunfärbung gegen polySia Signale im dorsalen Teil des Rückenmarks aufzeigt.

Die *ncam1b*-Knockdownembryonen besitzen im Vergleich zu den Kontroll-Embryonen ebenfalls eine differierende Immunfärbung. Der polySia-Antikörper detektiert nach dem *ncam1b*-Knockdown die Floorplate-Zellen im ventralen Teil des Rückenmarks und einen Teil der Neurone im dorsalen Rückenmark. Dies bedeutet, dass polySia-Ncam1b von Neuronen im dorsalen Rückenmark exprimiert wird, nicht jedoch von den Floorplate-Zellen. Hier liegt polySia-Ncam1a vor. Die spinalen Motoraxone werden in der Immunfärbung der *ncam1b*-Knockdownembryonen gegen polySia nicht detektiert. Der Unterschied im Vergleich zu der Immunfärbung der Motoraxone in den *ncam1a*-Knockdownembryonen weist darauf hin, dass Ncam1b der Hauptträger von polySia auf den Motoraxonen ist. Desweiteren fällt der Unterschied zwischen der Immunfärbung mit dem pAk 704 und dem mAk 735 nach *ncam1b*-Knockdown auf. Mit dem pAk 704 werden die Motoraxone angefärbt, während sie in der polySia-Immunfärbung nicht erkennbar

sind. Im Bereich des Rückenmarks entspricht die Färbung gegen polySia nach *ncam1b*-Knockdown ebenfalls nicht den Signalen mit dem pAk 704. Mit dem polySia-Antikörper wird nur ein Teil der Neurone im dorsalen Rückenmark angefärbt, während der pAk 704 die meisten Neurone erfasst. Dies deutet daraufhin, dass nicht alle Moleküle, die mit dem polyklonalen Antikörper 704 detektiert werden polysialyliert vorliegen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um nicht polysialylierte Ncam1a-Moleküle. Da im Zebrafisch verschiedene Isoformen von Ncam1a beschrieben wurden (Marx et al., 2001, Mizuno et al., 2001, Schober, 2011) besteht die Möglichkeit, dass 36 hpf verschiedene Ncam1a-Isoformen exprimiert werden, die zum Teil polysialyliert und zum Teil nicht polysialyliert vorliegen, wie dies auch für NCAM1 im Gehirn der Maus nachgewiesen wurde (Galuska et al., 2006, Oltmann-Norden et al., 2008). PolySia liegt in der Maus postnatal gebunden an die NCAM1-Isoformen 140 und 180 vor (Galuska et al., 2006, Oltmann-Norden et al., 2008, Mühlhoff et al., 2009), während die Isoform mit 120 kDa erst im Alter von fünf Tagen in Oligodendrocyten und Myelinscheiden exprimiert und meist nicht polysialyliert wird (Oltmann-Norden et al., 2008, Mühlhoff et al., 2009).

Nach dem Doppel-Knockdown von *ncam1a* und *ncam1b* weisen die Zebrafischembryonen im caudalen Teil des Nervensystems keine Immunfärbungen mit den verwendeten Antikörpern auf. Dies zeigt, dass der Knockdown durch die Morpholinos in diesem Bereich vollständig erfolgt ist und, dass Ncam1a und Ncam1b die Hauptträger für polySia im Zebrafischembryo (36 hpf) sind. Diese Ergebnisse demonstrieren ebenfalls, dass die beiden Gene *ncam1a* und *ncam1b* nicht dahingehend verändert wurden, dass beide oder eines der daraus resultierenden Proteine nicht mehr posttranslational mit polySia modifiziert werden. Aufgrund der Konservierung dieser Modifikation bestehen im Zebrafisch zwei Akzeptormoleküle für polySia, während bei Säugetieren nur ein Hauptakzeptor-Molekül für polySia, nämlich NCAM1, vorhanden ist (Cremer et al., 1994).

Im Kopfbereich der Doppel-Knockdownembryonen konnte teilweise noch Polysialinsäure detektiert werden. Dies kann auf einen unvollständigen Knockdown zurückzuführen sein oder es besteht die Möglichkeit, dass hier ein weiteres Molekül polysialyliert vorliegt. In der Maus wird im Gehirn beispielsweise das polysialylierte Protein SynCAM1 exprimiert (Galuska et al., 2010). Im Zebrafisch werden ebenfalls *synCAM*-Gene im Nervensystem exprimiert (Pietri et al., 2008). Ob diese polysialyliert werden, wurde jedoch noch nicht untersucht.

Um eine möglichst quantitative Messung der polySia-Expression nach *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-Knockdown zu erreichen, wurde das Reporterkonstrukt EndoN-GFP eingesetzt. Der Einsatz von EndoN-GFP ermöglicht die Quantifizierung über eine dosisabhängige, einstufige Reaktion ohne Signalverstärkung (Jokilampi et al., 2004). Die polySia-

Verteilung nach *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-Knockdown demonstriert die Expression von polySia-Ncam1a bzw. polySia-Ncam1b in verschiedenen Bereichen des Zebrafisch-Nervensystems 36 hpf. Im rostralen Teil des Nervensystems, in der vorliegenden Quantifizierung im Bereich der Cerebellumanlage gemessen, zeigt sich eine stärkere Reduktion der EndoN-GFP-Expression nach *ncam1a*-Knockdown. Dies weist darauf hin, dass im rostralen Teil des Nervensystems mehr polySia-Ncam1a als polySia-Ncam1b exprimiert wird. Eine Ausnahme dazu bildet der otische Vesikel, auf dessen Zellen eine stärkere Expression von polySia-Ncam1b durch die Quantifizierung ermittelt wurde. Im caudalen Bereich des Nervensystems des Zebrafischembryos kommt es zu einer starken Reduktion der EndoN-GFP-Expression nach *ncam1b*-Knockdown, was auf eine deutliche polySia-Ncam1b-Expression zurückzuführen ist. Auch im caudalen Bereich des Nervensystems gibt es eine Ausnahme: die Floorplate-Zellen innerhalb des Rückenmarks. Hier zeichnet sich eine nahezu ausschließliche Ncam1a-Expression ab. Dieses Ergebnis bestätigt die fehlende polySia-Färbung auf den Floorplate-Zellen nach *ncam1a*-Knockdown.

Mit Hilfe der polySia-Quantifizierung konnte eine spezifische Verteilung von polySia-Ncam1a und polySia-Ncam1b innerhalb des Zebrafisch-Nervensystems ermittelt werden. Ob die posttranslationale Modifikation der Zelladhäsionsmoleküle mit Polysialinsäure zu einer ähnlichen Funktion innerhalb des Nervensystems führt, wurde ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

5.3 Die Funktion von Ncam1a und Ncam1b im Nervensystem des sich entwickelnden Zebrafischs

5.3.1 PolySia-Ncam1a und Ncam1b beeinflussen das axonale Wachstumsmuster der posterioren Kommissur

NCAM1 wird insbesondere während der Entwicklung des Nervensystems polysialyliert, und ist z.B. an der Ausbildung des Gedächtnisses, der Migration und Differenzierung von Nervenzellen, wie auch der Faszikulierung von Axonen beteiligt (Tang et al., 1992, Tang et al., 1994, Becker et al., 1996, Vutskits et al., 2001, Prag et al., 2002, Senkov et al., 2006, Röckle et al., 2008, Kochlamazashvili et al., 2010). Ncam1a wird auch im Zebrafisch mit der Gedächtnisfunktion in Verbindung gebracht (Pradel et al., 2000). Zur

Aufgabe von Ncam1a und Ncam1b bezüglich der Entwicklung des Nervensystems im Zebrafischembryo ist jedoch zu Beginn der vorliegenden Studie nichts bekannt.

Die Funktion von Polysialinsäure wurde im Zebrafischembryo über den Knockdown der Polysialyltransferase *st8sia2* oder durch enzymatischen Verdau von polySia mittels EndoN-Injektion untersucht (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Durch die Entfernung von polySia kommt es zu Veränderungen verschiedener Axontrakte im Zebrafisch-Nervensystem (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Aufgrund dieser Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit insbesondere die dort beschriebenen Axontrakte, wie z.B. die posteriore Kommissur, untersucht. Die posteriore Kommissur entsteht im Zebrafischembryo im Alter von 20-22 hpf aus Neuronenpopulationen die lateral im Übergang zwischen Vorder- und Mittelhirn sitzen (Chitnis und Kuwada, 1990, Chitnis et al., 1992). Die Axone dieser Neuronenpopulationen wachsen von lateral aus in Richtung dorsal über beide Gehirnhemisphären (Chitnis und Kuwada, 1990, Chitnis et al., 1992). Im Bereich der posterioren Kommissur konnte eine spezifische Verteilung von polySia-Ncam1a und polySia-Ncam1b ermittelt werden. Eine schematische Übersicht über die Verteilung von polySia-Ncam1a (schwarz) und polySia-Ncam1b (violett) im Bereich der posterioren Kommissur ist in Abbildung 33 zu sehen. PolySia-Ncam1a-exprimierende Axone (Bündel aus schwarzen Strichen) wachsen über polySia-Ncam1b-exprimierende Zellen (violette Kreise) im dorsalen Diencephalon.

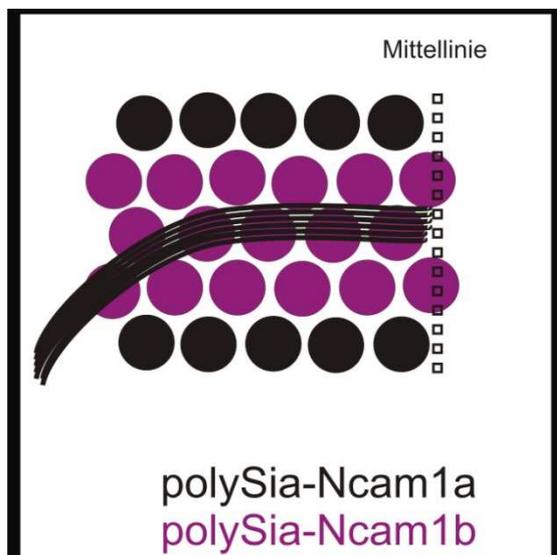


Abbildung 33: Schema zur Verteilung von polySia-Ncam1a und polySia-Ncam1b im Bereich der posterioren Kommissur

Schema einer dorsalen Ansicht der posterioren Kommissur (Bündel aus schwarzen Strichen) in einem Wildtyp-Zebrafischembryo im Stadium von 36 hpf. Die Kommissur spannt sich über beide Gehirnhemisphären, sie wird jedoch in dieser Abbildung nur bis zur Mittellinie gezeigt.

PolySia-Ncam1a wird auf den Axonen der posterioren Kommissur und auf Zellen (schwarze Kreise), die sich ausserhalb des Bereichs der Kommissur befinden, exprimiert. PolySia-Ncam1b befindet sich auf Zellen (violette Kreise) unterhalb der Axone der posterioren Kommissur.

Ein weiteres Zelladhäsionsmolekül das auf den Axonen der posterioren Kommissur exprimiert wird, ist L1, ebenfalls ein Mitglied der Ig-Superfamilie (Weiland et al., 1997).

Der Einsatz blockierender Antikörper gegen L1 führt zu einer komplett-defaszikulierten, verbreiterten posterioren Kommissur (Weiland et al., 1997). Die wenig assoziierten Axone liegen nebeneinander in Form eines einzelnen breiten Trakts (Weiland et al., 1997). Der Phänotyp nach polySia-Entfernung unterscheidet sich deutlich vom Phänotyp nach L1-Blockierung. Die Kommissur liegt nach dem Knockdown der Polysialyltransferase *st8sia2* oder dem enzymatischem polySia-Verdau aufgespalten in mehrere Bündel und nicht komplett defaszikuliert vor (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Dies ist ein eher unerwartetes Ergebnis nach der Entfernung von polySia, da aufgrund der Polysialylierung von Zelladhäsionsmolekülen die trans-Interaktion dieser Moleküle reduziert wird und der extrazelluläre Abstand zwischen den Zellmembranen vergrößert wird (Yang et al., 1992, Yang et al., 1994). Man würde daher eher davon ausgehen, dass die polySia-Entfernung zu einer stärkeren Zelladhäsion und damit zu einer engeren Verbindung der Axone zueinander führt. In den Publikationen von Marx et al., wird deshalb davon ausgegangen, dass aufgrund der polySia-Entfernung die adhäsiven Kräfte der umgebenden Zellen steigen, wodurch die ersten kommissuralen Axone auf abweichende Wege gelenkt werden. Die folgenden Axone faszikulieren mit den „Pionier“-Axonen und es kommt zu der Entstehung von mehreren Axonbündeln (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Der beschriebene Phänotyp nach polySia-Entfernung ähnelt dem Phänotyp nach *ncam1a*-Knockdown in dieser Studie. Die posteriore Kommissur der *ncam1a*-Knockdown-Embryonen liegt aufgespalten in mehrere Bündel vor. Durch den *ncam1a*-Knockdown kommt es zu einer Reduktion der polySia-Expression ausschließlich auf den Axonen der Kommissur. Dies zeigt, dass die Entfernung von polySia auf den Axonen, genauer gesagt der Knockdown der polySia-Ncam1a-Expression auf den Axonen, ausreicht um die Kommissur aufzuspalten. Daraus können mehrere Rückschlüsse gezogen werden. Die polySia-Expression auf den darunterliegenden Zellen ist nicht notwendig für das Wachstum und die Faszikulierung der Axone. Und die Funktion von Ncam1a besteht im Bereich der Kommissur darin, als Akzeptormolekül für polySia zu dienen. Durch die Entfernung von polySia-Ncam1a auf den Axonen kommt es wahrscheinlich, wie bei dem beschriebenen Mechanismus nach enzymatischem polySia-Verdau (Marx et al., 2001), zu einer stärkeren Adhäsion der Axone an die darunterliegenden Zellen, so dass die „Pionier“-Axone auf abweichende, unterschiedliche Bahnen gelenkt werden. Die folgenden Axone bilden Faszikel mit einem der „Pionier“-Axone und es kommt dadurch zu mehreren Axonbündeln.

Der Knockdown von *ncam1b* führt an der posterioren Kommissur zu einem neuen Phänotyp. Die Axone der Kommissur stoppen ihr Wachstum in dem Bereich, in dem im Wildtyp-Embryo normalerweise polySia-Ncam1b exprimiert wird. Nur einzelne oder wenige Axone in dünnen Faszikeln überkreuzen die Mittellinie. Da es nach der Entfernung

von polySia nicht zu einem Wachstumsstopp der Axone kommt (Marx et al., 2001), besitzt Ncam1b im Bereich der Kommissur eine von polySia unabhängige Funktion und unterscheidet sich damit deutlich von Ncam1a. Ncam1b ermöglicht das Wachstum der Axone über die Mittellinie. Der Interaktionspartner für Ncam1b auf den Axonen der Kommissur ist unbekannt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ncam1a nicht der Ligand ist, da die Entfernung von Ncam1a nicht zu einem Wachstumsstopp führt. PolySia gebunden an Ncam1b besitzt eine andere, bisher unbekannte Funktion.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es zu einer deutlichen Subfunktionalisierung von *ncam1a* und *ncam1b* im Verlauf der Evolution gekommen ist, ähnlich wie bei den paralogenen Genen *neurolin-a* und *neurolin-b*. Die beiden, ebenfalls zur Immunglobulin-Familie gehörenden, Zelladhäsionsmoleküle Neurolin-a und Neurolin-b werden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von retinalen Ganglienzellen exprimiert und besitzen divergierende Funktionen bezüglich der Entwicklung, Differenzierung und Axonwegfindung (Diekmann und Stuermer, 2009).

Vermutlich kommt es zu den verschiedenen Funktionen von Ncam1a und Ncam1b über die molekularen Unterschiede der cytoplasmatischen Domäne. Dieser Bereich ist aufgrund eines eingefügten Exons bei Ncam1b länger als bei Ncam1a und enthält wahrscheinlich Bindestellen für intrazelluläre Interaktionspartner, wie dies für NCAM1 gezeigt wurde (Büttner et al., 2003, Büttner et al., 2005, Maness und Schachner, 2007, Kleene et al., 2010). Die Einbindung der beiden Zelladhäsionsmoleküle in unterschiedliche Signalwege schafft damit die Grundlage für die Umsetzung der funktionellen Diversifizierung.

5.3.2 Ncam1b reguliert das Wachstumsmuster der spinalen Motoraxone

Nachdem es aus Voruntersuchungen erste Hinweise darauf gegeben hat, dass auch die Projektionen der spinalen Motoneurone von *ncam1b* abhängig sind (Dietzsch, 2008) wurde diese Axonpopulation in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht.

Auf den sekundären Motoneuronen im Zebrafischembryo (36 hpf) werden die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle Ncam1a und Ncam1b exprimiert. Beide Proteine liegen auf den Motoraxonen polysialyliert vor, wobei polySia hauptsächlich gebunden an Ncam1b und nicht an Ncam1a vorliegt. Die ventral verlaufenden spinalen Motoraxone bei Wildtyp-Embryonen (36 hpf) beschreiben einen leichten Bogen in Richtung caudal. Das Auftreten dieses Phänotyps ist nach *ncam1a*- oder *ncam1b*-Knockdown reduziert. Die *ncam1a*-

Knockdownembryonen zeigen meistens nur leichte Unregelmäßigkeiten im Verlauf der Motoraxone, während bei den *ncam1b*-Knockdownembryonen deutliche Veränderungen, wie z.B. Defaszikulierungen der Motoraxonbündel, aberrante Axonverzweigungen und ein unregelmäßiger, zickzackartiger Verlauf der Motoraxone auftreten.

Die Entfernung von polySia führt nicht zu einem veränderten Wachstumsmuster der Motoraxone (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Daher ist Ncam1b und nicht dessen polySia-Modifikation für ein korrektes Wachstumsmuster der Motoraxone in ihre Zielregion verantwortlich. Der dahinterstehende Mechanismus ist unbekannt. Möglicherweise interagiert Ncam1b mit Lenkungsmolekülen, die von der umgebenden Muskulatur exprimiert werden. Semaphorin 5A ist zum Beispiel ein solches Lenkungsmolekül und wurde bereits mit verändertem Wachstum der Motoraxone im Zebrafisch in Verbindung gebracht (Hilario et al., 2009). In den Knockdownembryonen kommt es durch die eingeschränkte Interaktion mit den Lenkungsmolekülen zu einer reduzierten Führung der Wachstumskegel, die zu den ständigen Richtungswechseln und aberranten Verzweigungen der Motoraxone führt. Die Defaszikulierung der Motoraxone in den Knockdownembryonen könnte ebenfalls durch fehlgeleitete Wachstumskegel oder durch eine gestörte Interaktion der Axone zueinander bedingt sein. Für L1, ein weiteres Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Familie, wurde bereits gezeigt, dass über die Interaktion mit Semaphorin3D die Faszikulierung von Axonen reguliert werden kann (Wolman et al., 2007).

5.3.3 Funktion von Ncam1b bezüglich der Axonfaszikulierung des Nervus vagus

Der Nervus vagus ist der zehnte Cranialnerv und er besitzt viele Funktionen, einschließlich der Kontrolle des Herzschlags und der Bewegungen des Magen-Darm-Trakts in Vertebraten (Taylor et al., 1999, Chandrasekhar, 2004). Die Zellkörper des N. vagus befinden sich im Zebrafisch in Rhombomer 8 des Hinterhirns (Taylor et al., 1999). PolySia wird auf dem Nervus vagus, wie auch auf den Cranialnerven III, V, VII, IX exprimiert (Marx et al., 2001, Marx, 2002). Hierbei handelt sich um die motorischen Komponenten der Cranialnerven, da polySia nur auf bestimmten Nervenästen zu finden ist und eine Kolokalisation mit dem Markergen für Motoneurone *islet-1* detektiert wurde (Marx et al., 2001, Marx, 2002).

Ncam1a und Ncam1b werden ebenfalls auf den Cranialnerven V, VII, IX und X exprimiert. Da beide Proteine 36 hpf polysialyliert vorliegen, handelt es sich hier ebenfalls um die

Motoraxone der Cranialnerven. Die Funktion der Zelladhäsionsmoleküle bezüglich der Ausbildung der Cranialnerven wurde über Knockdownexperimente untersucht. Der Knockdown von *ncam1b* führt zu einer Defaszikulierung der Axone des N. vagus, wie auch der Cranialnerven V und VII. Ob die Funktion des N. vagus dadurch beeinträchtigt ist, wurde nicht untersucht. Die reduzierte Ausbildung des N. vagus wird zum Beispiel in Verbindung mit dem plötzlichen Kindstod gebracht (Moon et al., 2007). Dies würde bedeuten, dass die Sterberate der Zebrafischembryonen innerhalb der ersten Tage erhöht ist. Bis zum Stadium von 36 hpf konnte dies jedoch nicht festgestellt werden.

Die Defaszikulierung der Axone des N. vagus ist auf die Entfernung von Ncam1b und nicht auf die posttranslationale Modifikation polySia zurückzuführen, da der Knockdown der Polysialyltransferase *st8sia2* im Zebrafischembryo nicht zu dem hier beschriebenen Phänotyp führt (Marx, 2002, Marx et al., 2007). Die Defaszikulierung des Nervus vagus ähnelt dem Phänotyp der nach *ncam1b*-Knockdown an den spinalen Motoraxone beobachtet wurde. Vermutlich besteht hier ein ähnlicher Mechanismus, der zu der reduzierten Faszikulierung der Axone zueinander führt.

5.3.4 *Ncam1b*-Knockdown führt zur Reduktion des Seitenliniennerv-Ganglions infolgedessen kommt es zu einem veränderten Schwimmverhalten der Embryonen

Das Seitenlinienorgan wird unterteilt in einen anterioren und einen posterioren Teil (Chitnis et al., 2011). Die Zelladhäsionsmoleküle Ncam1a und Ncam1b werden nur im posterioren Teil des Seitenlinienorgans detektiert. Desweiteren ist ihre Expression zeitlich unterschiedlich auf dem posterioren Seitenliniennerv zu finden. Während Ncam1a durchgehend in den untersuchten Stadien von 24-48 hpf auf dem posterioren Seitenliniennerv, inklusive dessen Ganglion, exprimiert wird, kann Ncam1b nur 22-24 hpf in diesem Bereich detektiert werden. Desweiteren wird Ncam1b (24 hpf) auf dem Primordium des Seitenlinienorgans exprimiert.

Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters der Zelladhäsionsmoleküle innerhalb des Seitenlinienorgans wurde dieser Bereich in den Knockdownembryonen (36 hpf) genauer analysiert. Die *ncam1a*-Knockdownembryonen zeigen eine Verkleinerung des Ganglions des posterioren Seitenliniennervs. Der Anteil an Embryonen mit diesem Phänotyp ist jedoch nicht signifikant im Vergleich mit den Embryonen, die mit dem

Kontroll-Morpholino injiziert wurden. Signifikante Veränderungen konnten aber bezüglich der Ausbildung des Ganglions in den *ncam1b*-Knockdownembryonen festgestellt werden. Im Wildtyp-Embryo besteht das Ganglion des Seitenliniennervs aus etwa 20 Zellen (Chitnis et al., 2011), während es in den *ncam1b*-Knockdownembryonen teilweise nur aus 2-3 Zellen aufgebaut ist. Desweiteren ist die Anordnung der Nervenzellkörper innerhalb des Ganglions verändert. In den Kontroll-Embryonen besitzt das Ganglion eine ovale, abgerundete Form. Im Gegensatz dazu fällt das Ganglion der *ncam1b*-Knockdownembryonen durch eine unregelmäßige, stark variierende äußere Form auf. Die Zellkörper können sogar „aufgereiht“, vergleichbar mit einer Perlenkette, angeordnet sein.

In den *st8sia2*-Knockdownembryonen wurden keine Veränderungen bezüglich der Ausbildung des Ganglions beschrieben (Marx, 2002, Marx et al., 2007). Dies lässt darauf schließen, dass Ncam1b für den hier beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist. Ncam1b reguliert am Ganglion des posterioren Seitenliniennervs die Zelladhäsion der Nervenzellkörper. Eine ähnliche Funktion wurde für die Zelladhäsionsmoleküle Cadherin-4 und -6 im Zebrafischembryo gezeigt (Wilson et al., 2007). Durch den Knockdown von Cadherin-4 kommt es, wie in den *ncam1b*-Knockdownembryonen, zu einer reduzierten Ausbildung des posterioren Seitenlinienganglions (Wilson et al., 2007). Die äußere Form ist verändert und es besteht aus weniger Zellkörpern im Vergleich zu den Kontroll-Embryonen (Wilson et al., 2007). Der Knockdown von Cadherin-6 führt zu einer reduzierten Ausbildung von cranialen Ganglien und Ganglien des Seitenliniennervs (Liu et al., 2011). Es wird spekuliert, dass die Reduktion der Ganglien aufgrund reduzierter Zellproliferation in den Knockdownembryonen zustande kommt (Liu et al., 2011). Bei Vorläuferzellen im Hippocampus von Säugetieren wird NCAM1 ebenfalls in Verbindung mit Zellproliferation gebracht (Amoureux et al., 2000). Es wird eine Korrelation zwischen reduzierter Zellproliferation und heterophilen NCAM1-Interaktionen beschrieben (Amoureux et al., 2000). Bezüglich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bedeutet dies, dass Ncam1b vermutlich über heterophile Interaktionen die Zellproliferation der Ganglienzellen beeinflusst.

In der durchgeführten Bewegungsstudie, konnte eine Veränderung bezüglich des Schwimmverhaltens bei den *ncam1b*-Knockdownembryonen beobachtet werden. Die Fluchtreaktion erfolgt bei einem Teil der *ncam1b*-Knockdownembryonen (72 hpf) durch eine Schwimmbewegung in Form eines Kreises, während die Kontroll-Embryonen meist geradeaus wegschwimmen oder ihre Schwimmrichtung verändern können. Da die *ncam1b*-Knockdownembryonen ein verändertes Ganglion besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass hier ein Zusammenhang zwischen dem Seitenlinienorgan und dem Schwimmverhalten besteht. Die Immunfärbung der *ncam1b*-Knockdownembryonen gegen

Tag-1 bestätigt eine unterschiedliche Entwicklung der Ganglien des posterioren Seitenliniennervs in den Embryonen, die im Kreis schwimmen. Aufgrund einer ungleichmäßigen Verteilung des injizierten Morpholinos kommt es auf einer Körperseite der *ncam1b*-Knockdownembryonen zu einer stärkeren Reduktion des Ganglions als auf der anderen Seite. Dies zeigt, dass ein morphologisch-verändertes Ganglion anders funktioniert, als die nicht beeinträchtigte Kontrolle im selben Fisch. Im Ganglion des posterioren Seitenliniennervs sitzen bipolare sensorische Nervenzellen, die die Haarzellen in den Neuromasten, den sensorischen Organen des Seitenlinienorgans, innervieren (Metcalf, 1985, Chitnis et al., 2011). Vermutlich kommt es in den *ncam1b*-Knockdownembryonen zu einer einseitig reduzierten Innervation der Neuromasten bzw. einer eingeschränkten Signalweiterleitung von den Neuromasten zum Gehirn.

Aufgrund einer *Ncam1b*-Expression auf den Zellen des Primordiums des Seitenlinienorgans 24 hpf, ist eine weitere Funktion bezüglich der Bildung der Neuromasten nicht auszuschließen. Vermutlich kommt es nicht nur innerhalb des Seitenliniennerv-Ganglions zu einer reduzierten Zelladhäsion, sondern auch in den sensorischen Organen des Seitenlinienorgans, den Neuromasten.

Die Beschränkung des hier beschriebenen Phänotyps im Bereich des posterioren Seitenlinienorgans auf die *ncam1b*-Knockdownembryonen ist eine weitere Bestätigung für die Subfunktionalisierung der beiden paralogenen Gene, die wahrscheinlich zu deren Konservierung geführt hat.

5.3.5 Reduzierte Stabilität der Zebrafischembryonen

Nicht nur verschiedene Axonpopulationen werden durch den Knockdown der Zelladhäsionsmoleküle *Ncam1a* und *Ncam1b* beeinflusst, sondern auch die Adhäsion der neuronalen Zellkörper. Es kommt in den Knockdownembryonen zu einer reduzierten Gesamtstabilität. „Stabilität“ ist, bezogen auf Embryonen, eine schwer messbare Eigenschaft. Die Veränderung wird durch eine Deformierung der Embryonen beim Einbetten in die zähflüssige Lösung Mowiol deutlich. Bei den Wildtyp- oder Kontroll-Morpholino-Embryonen bleibt der Körper stabil beim Einbetten erhalten, während er bei den Knockdownembryonen weich ist und in sich zusammensinkt. Die lateralen Ansichten des Zebrafischschwanzes geben lediglich einen kleinen Einblick bezüglich des vorliegenden Phänotyps. Die Embryonen nach *ncam1a*-Knockdown zeigen nur leichte Veränderungen bezüglich der Lage des Zebrafischschwanzes nach dem Einbetten,

während es bei den *ncam1b*-Knockdownembryonen zu deutlichen Unregelmäßigkeiten kommt. Der Verlauf des Seitenliniennervs beschreibt in den *ncam1b*-Knockdownembryonen Wellenlinien in der Immunfärbung der Axone gegen Tag-1 und die Motoraxone scheinen in das Gewebe einzutauchen und treten weiter ventral wieder auf.

Da Zell-Zelladhäsion die Grundlage für den Aufbau von Gewebe ist (Gumbiner, 1996) kommt es möglicherweise aufgrund des Knockdowns der Zelladhäsionsmoleküle *ncam1a* bzw. *ncam1b* zu einer reduzierten Zelladhäsion, die zu der eingeschränkten Stabilität der Embryonen führt. In den Publikationen von Marx et al. wurde keine Reduktion der Stabilität der Embryonen nach polySia-Entfernung erwähnt (Marx et al., 2001, Marx et al., 2007). Daher ist es wahrscheinlich, dass der vorliegende Phänotyp auf die Entfernung der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle *Ncam1a* und *Ncam1b* und nicht auf deren Modifikation polySia zurückzuführen ist. Vermutlich kommt es durch den Knockdown von *ncam1b* innerhalb des Rückenmarks zu einer reduzierten Zelladhäsion. Ob dies, wie beim Seitenliniennerv-Ganglion zu einer Reduktion der Zellen innerhalb des Rückenmarks führt ist unklar. Interessant wäre es hierzu, Querschnitte vom Rückenmark bezüglich der Anordnung und der Anzahl von Neuronen zu analysieren.

5.4 Das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül *Ncam2*

Ein weiteres Mitglied der NCAM-Familie im Zebrafischembryo ist *Ncam2*. Die Expression und Polysialylierung von *Ncam2* wurde ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Eine Funktionsanalyse wurde nicht durchgeführt, da dies bereits von einer anderen Arbeitsgruppe untersucht wird (Miyasaka et al., 2009).

Die Protein-Expression von *Ncam2* startet 30 hpf. Sie ist zunächst beschränkt auf kleine Zellpopulationen im Tel- und Diencephalon. Im Stadium von 48 hpf werden Zellkörper im sich entwickelnden olfaktorischen Bulbus und eine größere Anzahl an Neuronen im Tel- und Diencephalon mit dem *Ncam2*-Antikörper detektiert. Die *Ncam2*-Expression ist hauptsächlich auf Zellkörpern und nicht auf Axonen zu finden. Die einzige Ausnahme dazu sind die Axone der anterioren Kommissur, die *Ncam2* ab dem Stadium von 36 hpf exprimieren. Da die anteriore Kommissur bereits im Stadium von 24-28 hpf im Zebrafischembryo gebildet wird (Chitnis und Kuwada, 1990), scheint *Ncam2* nicht für ihre Ausbildung notwendig zu sein.

Um zu ermitteln, ob die Ncam2-exprimierende-Neurone im Bereich des Tel- und Diencephalons zum olfaktorischen System gehören und dessen Signale verarbeiten, wurden die Immunfärbungen mit den olfaktorischen Strukturen von Säugetieren verglichen. In der Ratte gelangen die olfaktorischen Informationen vom olfaktorischen Bulbus über den lateralen olfaktorischen Trakt zunächst in den olfaktorischen Cortex (Haberly, 2001). Er besteht aus dem anterioren olfaktorischen Cortex und dem piriformen Cortex (Haberly, 2001). Im Zebrafisch werden die olfaktorischen Signale, ebenfalls von den olfaktorischen Bulbi ausgehend, über den medialen und lateralen olfaktorischen Trakt zu Zellen im Telencephalon weitergeleitet (Miyasaka et al., 2009). Möglicherweise sind in der Ncam2-Immunfärbung Neurone des anterioren olfaktorischen Cortex im Telencephalon gefärbt, da diese Neurone bei Säugetieren über einen Teil der anterioren Kommissur miteinander verbunden sind (Lledo et al., 2005).

Im rostralen Diencephalon wird Ncam2 von Neuronen im Bereich der postoptischen Kommissur exprimiert. Ob diese Neurone auch zum olfaktorischen System gehören kann nicht abschließend beantwortet werden, da sich der Aufbau des Zebrafischgehirns zum Teil deutlich vom Säugetiergehirn unterscheidet. Bekannt ist, dass im Zebrafisch axonale Verbindungen, ausgehend von den sogenannten Mitralzellen in den olfaktorischen Bulbi, zu den Habenulae, den Epiphysenstielen im Diencephalon bestehen (Miyasaka et al., 2009). Ncam2 wird im sieben-Tage-alten Zebrafisch auf den Habenulae detektiert (Miyasaka et al., 2009), jedoch nicht 48 Stunden nach der Befruchtung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von Ncam2 im Zebrafischembryo (30-48 hpf) auf Nervenzellen im Prosencephalon und auf die Axone der anterioren Kommissur beschränkt ist. Möglicherweise ist die fehlende Konservierung des duplizierten *ncam2*-Gens auch auf das lokal eingeschränkte *ncam2*-Expressionsmuster zurückzuführen.

Ob Ncam2 wie bei Säugetieren unpolysialysiert vorliegt, wurde ebenfalls im Rahmen dieser Studie analysiert. In *ncam1a/ncam1b*-Doppelknockdownembryonen mit Immunfärbung gegen Ncam2 und polySia konnte gezeigt werden, dass nach der Entfernung der polySia-Akzeptormoleküle Ncam1a und Ncam1b keine Colokalisation von Ncam2 und polySia im Zebrafischembryo (36 hpf) zu finden ist. Dies ist ein erster Hinweis dafür, dass Ncam2 im Zebrafisch, wie in der Maus (Yoshihara et al., 1997), nicht polysialyliert wird. Der Sequenzvergleich zwischen Ncam2 und den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen in der Maus, NCAM1 und NCAM2, untermauert dieses Ergebnis. Es fehlen, die für die Positionierung der Polysialyltransferasen wichtigen Strukturen, wie z.B. die α -Helix in der FN1-Domäne (Foley et al., 2010). Die strukturellen Grundlagen, die für die Polysialylierung von NCAM1 notwendig sind, werden schon seit vielen Jahren

untersucht (Close et al., 2003, Mendiratta et al., 2005, Mendiratta et al., 2006, Foley et al., 2010, Thompson et al., 2011), trotzdem ist es immer noch nicht klar, welcher Mechanismus die Polysialylierung von Ncam2 in der Maus verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass sogar der Austausch der FN1-Domäne zwischen NCAM1 und NCAM2 nicht die Polysialylierung von NCAM1 verhindert. Es kommt lediglich zu kürzeren polySia-Ketten (Foley et al., 2010). Möglicherweise verhindert eine Substruktur der fünften Ig-Domäne von NCAM2 die Polysialylierung (Dr. Karen J. Colley/Universität von Illinois, Chicago, USA; persönliche Mitteilung).

5.5 Die Expressionsregulation der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle und deren polySia-Modifikation über die CPE-Sequenz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht nur die Expression, Glykosylierung und Funktion der Zelladhäsionsmoleküle der NCAM-Familie untersucht, sondern auch deren Expressionsregulation.

Im zentralen Nervensystem (ZNS) des Zebrafischembryos wird polySia meist nur auf den Zellkörpern (Somata) von Nervenzellen exprimiert (Marx et al., 2001). Spinale und craniale Motoneurone hingegen tragen polySia sowohl auf dem Zellkörper als auch auf dem Axon (Marx et al., 2001). Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen ist, dass die Transmembranproteine Ncam1a und Ncam1b im ZNS im Zellkörper in die Plasmamembran integriert werden und nicht über den Axonhügel in die axonale Membran gelangen. In den Motoneuronen kommt es zusätzlich zu einem CPE-abhängigen Transport der *ncam1a/1b*-mRNA, um eine lokale Expression innerhalb des Axons zu ermöglichen.

Das cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE) ist eine Sequenz in der 3'UTR einer Reihe von mRNAs. Über das CPE kann zum Beispiel der Zeitpunkt und der Ort der Translation während der Entwicklung von Oocyten, aber auch an Synapsen im Nervensystem reguliert werden (Wu et al., 1998, Si et al., 2003, Alarcon et al., 2004, Radford et al., 2008, Oe und Yoneda, 2010). Mittels CPE-bindender Proteine wird die mRNA innerhalb der Nervenzelle transportiert, um eine Translation in bestimmten Abschnitten der Nervenzelle zu ermöglichen (Brittis et al., 2002, Oe und Yoneda, 2010). Dieser Vorgang schafft die Voraussetzung für Axone auf lokale Signalmoleküle schnell und passend zu reagieren und wurde zum Beispiel in kommissuralen Axonen nach der

Überkreuzung der Mittellinie beobachtet (Brittis et al., 2002). Im Zebrafisch wurde die CPE-abhängige Translation bisher nur bei maternaler mRNA in Oocyten demonstriert (Suzuki et al., 2009, Zhang und Sheets, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *ncam1a*-, *ncam1b* und *st8sia2*-mRNA enthält ebenfalls CPE-Sequenzen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die mRNA der Zelladhäsionsmoleküle und der Polysialyltransferase *st8sia2* über einen CPE-abhängigen Mechanismus ins Motoraxon transportiert wird.

Um die Funktion der CPE-Sequenz in der 3'UTR der *st8sia2*-mRNA zu untersuchen, wurden Reporterkonstrukte mit dem Tol2kit kloniert. Für die Konstrukte wurde der Hb9-Promotor zur Expression der DNA in den Motoraxonen verwendet (Nakano et al., 2005). Als Reporter wurde die Golgi-Lokalisationssequenz der Polysialyltransferase *st8sia2* mit der *egfp*-Sequenz kombiniert, damit St8Sia2-EGFP wie das Enzym St8Sia2 in der Golgi-Membran verankert wird. Im 3'Bereich der Konstrukte wurde die 3'UTR der *st8sia2*-mRNA mit oder ohne CPE-Sequenz angehängt.

Mit Hilfe der Reporterkonstrukte konnte gezeigt werden, dass die CPE-Sequenz der *st8sia2*-mRNA eine regulatorische Funktion besitzt. Das Reporterkonstrukt mit der 3'UTR der *st8sia2*-mRNA, inklusive der CPE-Sequenz, wurde nicht exprimiert. Die Entfernung der CPE-Sequenz aus dem Reporterkonstrukt hingegen führte zur Expression von St8Sia2-EGFP in der Golgi-Membran von Motoneuronen (Zellkörper und Axon).

Die Expression der Reporterkonstrukte entspricht nicht den vorausgegangenen Erwartungen. Eigentlich war zu erwarten, dass das Reporterkonstrukt mit der 3'UTR der *st8sia2*-mRNA im Zellkörper und im Axon exprimiert wird, entsprechend dem normalen *st8sia2*-Expressionsmuster. Stattdessen wird durch das Anhängen der 3'UTR der *st8sia2*-mRNA die Expression des Reporters inhibiert. Desweiteren wurde erwartet, dass das Reporterkonstrukt ohne CPE-Sequenz ein auf den Zellkörper beschränktes Expressionsmuster aufweist, wie das Polysialylierungsmuster nach Injektion des CPE-Morpholinos. Im Gegensatz dazu kommt es durch die CPE-Sequenz in den Reporterkonstrukten zu einer „Alles oder Nichts“-Entscheidung. Möglicherweise sind die Reporterkonstrukte ungeeignet für den Nachweis der CPE-abhängigen Translation und es kommt durch den Hb9-Promotor zu einer Überexpression, die zu den Signalen im Zellkörper und im Axon führt. Die Klonierung des Promotors der *st8sia2* wäre daher ein guter Ansatz für neue Reporterkonstrukte.

Die Untersuchung der CPE-Sequenzen in der *ncam1a*- und *ncam1b*-mRNA erfolgte ebenfalls mit Reporterkonstrukten, die im Rahmen einer von mir angeleiteten Diplomarbeit kloniert wurden. Für die Reporterkonstrukte wurde, wie bei den Versuchen zur CPE-Sequenz in der *st8sia2*-mRNA, der Hb9-Promotor verwendet. Als Reporterprotein wurde

prenyliertes EGFP eingesetzt, das aufgrund der Prenylierung in die Zellmembran integriert wird. Im 3' Bereich der Reporterkonstrukte wurde die 3'UTR der *ncam1a* bzw. *ncam1b*-mRNA jeweils mit oder ohne die CPE-Sequenzen eingefügt (Fischer, 2010). Nach Injektion der verschiedenen Reporterkonstrukte konnte eine EGFP-Expression immer im Zellkörper und im Axon der Motoneurone festgestellt werden (Fischer, 2010). Dies spricht dafür, dass entweder die CPE-Sequenzen in der *ncam1a*- und *ncam1b*-mRNA keine regulatorische Funktion bezüglich der Expression von *ncam1a* und *ncam1b* besitzen oder, dass der Aufbau der Reporterkonstrukte nicht für die Versuche geeignet ist. Möglicherweise ist die Verwendung des Hb9-Promotors, wie bei den *st8sia2*-Konstrukten ungeeignet oder das Reporterprotein gelangt aufgrund der Prenylierung ungehindert in alle Membranen der Nervenzelle. Um zu testen, ob die Expression von prenyliertem EGFP über die 3'UTR der *st8sia2*-mRNA, mit und ohne CPE, beeinflusst wird, wurden zwei weitere Reporterkonstrukte kloniert und injiziert. Doch auch hier zeigte sich eine Expression des Reporterproteins im Zellkörper und im Axon (Fischer, 2010). Dies spricht dafür, dass prenyliertes EGFP nicht über die CPE-Sequenzen reguliert werden kann. Vielleicht gelangt prenyliertes EGFP aufgrund des kurzen lipophilen Rests ungehindert von der Plasmamembran des Zellkörpers über den Axonhügel ins Axon. Da Ncam1a und Ncam1b jedoch transmembrane Proteine sind lässt sich mit den vorhandenen Ergebnissen keine Aussage über die Kontrolle der *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-Expression mittels CPE-Sequenz treffen. Eine gute Ergänzung zu den erfolgten Versuchen wäre es daher prenyliertes EGFP durch eine Kombination aus dem Membrananteil der *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-Sequenz und der *egfp*-Sequenz zu ersetzen. Die Kombination ermöglicht, dass EGFP möglichst ähnlich wie Ncam1a bzw. Ncam1b aufgebaut ist, und als transmembranes Protein in die Plasmamembran integriert wird. Vielleicht erfolgt dann die Expression des Konstrukts [Hb9-Promotor]-[*ncam1a/b-egfp*]-[polyA] nur in der Membran des Zellkörpers und kann nicht, wie die Theorie besagt, über den Axonhügel in die axonale Membran gelangen. Nur das Konstrukt [Hb9-Promotor]-[Ncam1a/b-EGFP]-[3'UTR von *ncam1a/b*] sollte im Axon exprimiert werden, da hier eine CPE-Sequenz in der 3'UTR enthalten ist.

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt das Expressionsmuster, die Polysialylierung und die Funktion von Zelladhäsionsmolekülen der NCAM-Familie im Nervensystem des sich entwickelnden Zebrafischs. Interessanterweise ist es während der Evolution der Knochenfische zu einer Duplikation des bei höheren Vertebraten nur in Einzahl vorkommenden Gens *ncam1* gekommen. Es wird gezeigt, dass sich die Proteine Ncam1a und Ncam1b durch ihr Expressionsmuster und ihre Funktion unterscheiden. Gemeinsam ist beiden die posttranslationale Modifikation durch Polysialylierung. Insbesondere ist die Ausbildung einiger wichtiger Axontrakte von der Expression von *ncam1a* und *ncam1b* sowie von ihrer Polysialylierung abhängig, z.B. die der posterioren Kommissur, der spinalen und cranialen Motoraxone. Die vorliegende Arbeit bildet damit die Grundlage für weiterführende Experimente zur Klärung interessanter Aspekte wie z.B.

1. Die Entwicklung des otischen Vesikels

Die Ncam1b-Expression auf den Zellen des otischen Vesikels spricht für eine Funktion von Ncam1b bezüglich der Zelladhäsion innerhalb des Vesikels. Mit Hilfe von *in-situ* Hybridisierungen gegen anteriore und posteriore Markergene des otischen Vesikels (Hammond und Whitfield, 2011) könnten Veränderungen in *ncam1b*-Knockdown-Embryonen in weiterführenden Experimenten detektiert werden.

2. Die Entwicklung und Migration des Seitenlinienorgans

Der Einfluss von Ncam1a, Ncam1b und deren Polysialylierung bezüglich der Entwicklung des Seitenlinienorgans könnte mit Hilfe von transgenen Zebrafischembryonen, die GFP unter der Kontrolle des *claudin-B* Promotors exprimieren, untersucht werden (Haas und Gilmour, 2006). Zusätzliche Immunfärbungen gegen Proteine, die innerhalb der Neuromasten exprimiert werden, wie z.B. CXCR7b oder CXCR4b (Chitnis et al., 2011), können einen Aufschluß darüber geben, ob der Aufbau bzw. die Zelladhäsion nach *ncam1b*-Knockdown innerhalb der Neuromasten verändert ist.

3. Die Funktion von Ncam1a auf den Floorplate-Zellen

Kommissurale Axone im Hinterhirn benötigen die Expression von polySia auf den Floorplate-Zellen, um über die Mittellinie zu wachsen (Marx et al., 2001). Da Ncam1a das

einziges Akzeptormolekül für polySia auf den Floorplate-Zellen ist, besteht vermutlich der gleiche Phänotyp in den *ncam1a*-Knockdownembryonen. Dies könnte durch die Markierung einzelner kommissuraler Axone mit dem Farbstoff Dil in zukünftigen Projekten aufgezeigt werden.

Um die molekularen Grundlagen erklären zu können, die diesen Entwicklungsprozessen zugrunde liegen, ist es wichtig, die Interaktionspartner von Ncam1a und Ncam1b zu identifizieren. Durch Zellaggregations- und Pulldown-Assays kann, wie bei NCAM2 (Yoshihara et al., 1997), untersucht werden, ob Ncam1a und Ncam1b homophile oder heterophile Interaktionen eingehen und wie diese Wechselwirkungen durch Polysialinsäure beeinflusst werden. Neue Bindungspartner können zum Beispiel über eine Massenspektrometrieanalyse im Anschluß an eine Proteinkomplexaufreinigung über einen Tag (His-tag, c-Myc-tag, etc.) ermittelt werden (Chang, 2006).

Identifizierte Wechselwirkungen und Bindungspartner können anschließend im Zebrafisch *in vivo* verifiziert und in natürlichen Kontext untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- Acheson A, Sunshine JL, Rutishauser U. 1991.** NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J Cell Biol*, **114**: 143-53.
- Akeson RA, Wujek JR, Roe S, Warren SL, Small SJ. 1988.** Smooth muscle cells transiently express NCAM. *Brain Res*, **464**: 107-20.
- Alarcon JM, Hodgman R, Theis M, Huang YS, Kandel ER, Richter JD. 2004.** Selective modulation of some forms of schaffer collateral-CA1 synaptic plasticity in mice with a disruption of the CPEB-1 gene. *Learn Mem*, **11**: 318-27.
- Alenius M, Bohm S. 1997.** Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection. *J Biol Chem*, **272**: 26083-6.
- Amaya M, Baranova A, van Hoek ML. 2011.** Protein prenylation: a new mode of host-pathogen interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, **416**: 1-6.
- Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. 1998.** Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, **282**: 1711-1714.
- Amoureux MC, Cunningham BA, Edelman GM, Crossin KL. 2000.** N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci*, **20**: 3631-40.
- Anderson AA, Kendal CE, Garcia-Maya M, Kenny AV, Morris-Triggs SA, Wu T, Reynolds R, Hohenester E, Saffell JL. 2005.** A peptide from the first fibronectin domain of NCAM acts as an inverse agonist and stimulates FGF receptor activation, neurite outgrowth and survival. *J Neurochem*, **95**: 570-83.
- Anderson DM, Richter JD, Chamberlin ME, Price DH, Britten RJ, Smith LD, Davidson EH. 1982.** Sequence organization of the poly(A) RNA synthesized and accumulated in lampbrush chromosome stage *Xenopus laevis* oocytes. *J Mol Biol*, **155**: 281-309.
- Angata K, Fukuda M. 2003.** Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie*, **85**: 195-206.
- Angata K, Suzuki M, Fukuda M. 1998.** Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 28524-28532.
- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S. 1999.** Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron*, **23**: 659-74.
- Assmann U, Szentivanyi A, Stark Y, Scheper T, Berski S, Dräger G, Schuster RH. 2010.** Fiber scaffolds of polysialic acid via electrospinning for peripheral nerve regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, **21**: 2115-24.
- Atkins AR, Chung J, Deechongkit S, Little EB, Edelman GM, Wright PE, Cunningham BA, Dyson HJ. 2001.** Solution structure of the third immunoglobulin domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM: can solution studies define the mechanism of homophilic binding? *J Mol Biol*, **311**: 161-72.
- Atkins AR, Gallin WJ, Owens GC, Edelman GM, Cunningham BA. 2004.** Neural cell adhesion molecule (N-CAM) homophilic binding mediated by the two N-terminal Ig domains is influenced by intramolecular domain-domain interactions. *J Biol Chem*, **279**: 49633-43.

- Atkins AR, Osborne MJ, Lashuel HA, Edelman GM, Wright PE, Cunningham BA, Dyson HJ. 1999.** Association between the first two immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *FEBS Lett*, **451**: 162-8.
- Bachvarova R, Davidson EH, Allfrey VG, Mirsky AE. 1966.** Activation of RNA synthesis associated with gastrulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**: 358-65.
- Bally-Cuif L, Schatz WJ, Ho RK. 1998.** Characterization of the zebrafish Orb/CPEB-related RNA binding protein and localization of maternal components in the zebrafish oocyte. *Mech Dev*, **77**: 31-47.
- Barnard DC, Cao Q, Richter JD. 2005.** Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localization on the mitotic apparatus. *Mol Cell Biol*, **25**: 7605-15.
- Bastmeyer M, Schlosshauer B, Stuermer CA. 1990.** The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by the monoclonal antibody D3. *Development*, **108**: 299-311.
- Battista D, Rutishauser U. 2010.** Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J Neurosci*, **30**: 3995-4003.
- Becker CG, 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**: 143-52.
- Becker CG, Becker T, Roth G. 1993a.** Distribution of NCAM-180 and polysialic acid in the developing tectum mesencephali of the frog *Discoglossus pictus* and the salamander *Pleurodeles waltl*. *Cell Tissue Res*, **272**: 289-301.
- Becker T, Becker CG, Niemann U, Naujoks-Manteuffel C, Gerardy-Schahn R, Roth G. 1993b.** Amphibian-specific regulation of polysialic acid and the neural cell adhesion molecule in development and regeneration of the retinotectal system of the salamander *Pleurodeles waltl*. *J Comp Neurol*, **336**: 532-44.
- Berger-Sweeney J, Zearfoss NR, Richter JD. 2006.** Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn Mem*, **13**: 4-7.
- Bernhardt RR, Nguyen N, Kuwada JY. 1992.** Growth cone guidance by floor plate cells in the spinal cord of zebrafish embryos. *Neuron*, **8**: 869-82.
- Bestman JE, Cline HT. 2008.** The RNA binding protein CPEB regulates dendrite morphogenesis and neuronal circuit assembly in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: 20494-9.
- Bonfanti L. 2006.** PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog. Neurobiol.*, **80**: 129-164.
- Bonfanti L, Theodosis DT. 1994.** Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience*, **62**: 291-305.
- Borisovska M, McGinley MJ, Bensen A, Westbrook GL. 2011.** Loss of olfactory cell adhesion molecule reduces the synchrony of mitral cell activity in olfactory glomeruli. *J Physiol*, **589**: 1927-41.
- Braun N, Schikorski T, Zimmermann H. 1993.** Cytoplasmic segregation and cytoskeletal organization in the electric catfish giant electromotoneuron with special reference to the axon hillock region. *Neuroscience*, **52**: 745-56.
- Brittis PA, Lu Q, Flanagan JG. 2002.** Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell*, **110**: 223-35.

- Brümmendorf T, Rathjen FG. 1993.** Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem*, **61**: 1207-19.
- Burgess A, Wainwright SR, Shihabuddin LS, Rutishauser U, Seki T, Aubert I. 2008.** Polysialic Acid Regulates the Clustering, Migration, and Neuronal Differentiation of Progenitor Cells in the Adult Hippocampus. *Developmental Neurobiology*, **68**: 1580-1590.
- Büttner B, Kannicht C, Reutter W, Horstkorte R. 2003.** The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun*, **310**: 967-71.
- Büttner B, Kannicht C, Reutter W, Horstkorte R. 2005.** Novel cytosolic binding partners of the neural cell adhesion molecule: mapping the binding domains of PLC gamma, LANP, TOAD-64, syndapin, PP1, and PP2A. *Biochemistry*, **44**: 6938-47.
- Carafoli F, Saffell JL, Hohenester E. 2008.** Structure of the tandem fibronectin type 3 domains of neural cell adhesion molecule. *J Mol Biol*, **377**: 524-34.
- Carratù MR, Labate M, De Santis S, Lacomba C, Cuomo V. 1993.** Up-regulation of polysialic acid in peripheral myelinated axons of rat chronically exposed to 2,5-hexanedione. *Pharmacol Toxicol*, **72**: 236-9.
- Chandrasekhar A. 2004.** Turning heads: development of vertebrate branchiomotor neurons. *Dev Dyn*, **229**: 143-61.
- Chang IF. 2006.** Mass spectrometry-based proteomic analysis of the epitope-tag affinity purified protein complexes in eukaryotes. *Proteomics*, **6**: 6158-66.
- Chang JS, Tan L, Schedl P. 1999.** The Drosophila CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev Biol*, **215**: 91-106.
- Cheung IY, Vickers A, Cheung NK. 2006.** Sialyltransferase STX (ST8Siall): a novel molecular marker of metastatic neuroblastoma. *Int J Cancer*, **119**: 152-6.
- Chitnis AB, Kuwada JY. 1990.** Axonogenesis in the Brain of Zebrafish Embryos. *Journal of Neuroscience*, **10**: 1892-1905.
- Chitnis AB, Nogare DD, Matsuda M. 2011.** Building the posterior lateral line system in zebrafish. *Dev Neurobiol*.
- Chitnis AB, Patel CK, Kim S, Kuwada JY. 1992.** A specific brain tract guides follower growth cones in two regions of the zebrafish brain. *J Neurobiol*, **23**: 845-54.
- Chothia C, Jones EY. 1997.** The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annual Review of Biochemistry*, **66**: 823-862.
- Christoffels A, Koh EGL, Chia JM, Brenner S, Aparicio S, Venkatesh B. 2004.** Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Molecular Biology and Evolution*, **21**: 1146-1151.
- Chuong CM, Edelman GM. 1984a.** Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. *J Neurosci*, **4**: 2354-68.
- Chuong CM, Edelman GM. 1984b.** Alterations in Neural Cell-Adhesion Molecules During Development of Different Regions of the Nervous-System. *Journal of Neuroscience*, **4**: 2354-2368.
- Close BE, Colley KJ. 1998.** In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *J Biol Chem*, **273**: 34586-93.
- Close BE, Mendiratta SS, Geiger KM, Broom LJ, Ho LL, Colley KJ. 2003.** The minimal structural domains required for neural cell adhesion molecule polysialylation by PST/ST8Sia IV and STX/ST8Sia II. *J Biol Chem*, **278**: 30796-805.
- Cole GJ, Glaser L. 1986.** A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol.*, **102**: 403-412.

- Cole GJ, Loewy A, Cross NV, Akeson R, Glaser L. 1986.** Topographic localization of the heparin-binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J. Cell Biol.*, **103**: 1739-1744.
- Coombs S, Braun CB, Donovan B. 2001.** The orienting response of Lake Michigan mottled sculpin is mediated by canal neuromasts. *J Exp Biol*, **204**: 337-48.
- Coombs S, New JG, Nelson M. 2002.** Information-processing demands in electrosensory and mechanosensory lateral line systems. *J Physiol Paris*, **96**: 341-54.
- Costantini FD, Britten RJ, Davidson EH. 1980.** Message sequences and short repetitive sequences are interspersed in sea urchin egg poly(A)⁺ RNAs. *Nature*, **287**: 111-7.
- Covault J, Sanes JR. 1985.** Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, **82**: 4544-4548.
- Craig AM, Kang Y. 2007.** Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*, **17**: 43-52.
- Cremer H, Chazal G, Carleton A, Goridis C, Vincent JD, Lledo PM. 1998.** Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 13242-7.
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S. 1994.** Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*, **367**: 455-9.
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. 1987.** Neural Cell-Adhesion Molecule - Structure, Immunoglobulin-Like Domains, Cell-Surface Modulation, and Alternative Rna Splicing. *Science*, **236**: 799-806.
- Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. 2007.** Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem*, **282**: 30346-56.
- Datta AK, Paulson JC. 1995.** The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J Biol Chem*, **270**: 1497-500.
- Datta AK, Sinha A, Paulson JC. 1998.** Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J Biol Chem*, **273**: 9608-14.
- de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. 2005.** Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol*, **16**: 49-58.
- Diekmann H, Stuermer CA. 2009.** Zebrafish neurolin-a and -b, orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding. *J Comp Neurol*, **513**: 38-50.
- Dietzsch M. 2008.** *Die Familie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle im Zebrafisch: Expressionsmuster, Funktion und Glykosylierung*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Bibliothek des KIT.
- Dityatev A, Bukalo O, Schachner M. 2008.** Modulation of synaptic transmission and plasticity by cell adhesion and repulsion molecules. *Neuron Glia Biol*, **4**: 197-209.
- Doherty P, Moolenaar CE, Ashton SV, Michalides RJ, Walsh FS. 1992.** The VASE exon downregulates the neurite growth-promoting activity of NCAM 140. *Nature*, **356**: 791-3.
- Du L, Richter JD. 2005.** Activity-dependent polyadenylation in neurons. *RNA*, **11**: 1340-7.
- Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A. 2000.** Mice deficient in the polysialyltransferase

- ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci*, **20**: 5234-44.
- Eckhardt M, Mühlenhoff M, Bethe A, Koopman J, Frosch M, Gerardy-Schahn R. 1995.** Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature*, **373**: 715-8.
- Edelman GM. 1983.** Cell-Adhesion Molecules. *Science*, **219**: 450-457.
- Edelman GM, Crossin KL. 1991.** Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem*, **60**: 155-90.
- Eggers K, Werneburg S, Schertzinger A, Abeln M, Schiff M, Scharenberg MA, Burkhardt H, Mühlenhoff M, Hildebrandt H. 2011.** Polysialic acid controls NCAM signals at cell-cell contacts to regulate focal adhesion independent from FGF receptor activity. *J Cell Sci*, **124**: 3279-91.
- Fambrough D, Goodman CS. 1996.** The Drosophila beaten path gene encodes a novel secreted protein that regulates defasciculation at motor axon choice points. *Cell*, **87**: 1049-58.
- Fields RD, Itoh K. 1996.** Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, **19**: 473-80.
- Finne J. 1982.** Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J Biol Chem*, **257**: 11966-70.
- Finne J, Finne U, Deagostinibazin H, Goridis C. 1983.** Occurrence of Alpha-2-8 Linked Polysialosyl Units in A Neural Cell-Adhesion Molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **112**: 482-487.
- Fischer F. 2010.** *Die Rolle von CPE-Motiven bei der Expression von NCAM und PCAM im Nervensystem des Zebrafischs*, Diplom, Karlsruher Institut für Technologie.
- Foley DA, Swartzentruber KG, Thompson MG, Mendiratta SS, Colley KJ. 2010.** Sequences from the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule allow O-glycan polysialylation of an adhesion molecule chimera. *J Biol Chem*, **285**: 35056-67.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J. 1999.** Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, **151**: 1531-1545.
- Fox CA, Sheets MD, Wickens MP. 1989.** Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUUAU. *Genes Dev*, **3**: 2151-62.
- Friedlander DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M. 1994.** The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol*, **125**: 669-80.
- Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bittersuermann D. 1985.** Nzb Mouse System for Production of Monoclonal-Antibodies to Weak Bacterial-Antigens - Isolation of An Igg Antibody to the Polysaccharide Capsules of Escherichia-Coli K1 and Group B-Meningococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**: 1194-1198.
- Fujita SC, Mori K, Imamura K, Obata K. 1985.** Subclasses of olfactory receptor cells and their segregated central projections demonstrated by a monoclonal antibody. *Brain Res*, **326**: 192-6.
- Gallie DR. 1991.** The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev*, **5**: 2108-16.

- Galuska SP, Oltmann-Norden I, Geyer H, Weinhold B, Kuchelmeister K, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R, Geyer R, Mühlenhoff M. 2006.** Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV. *J Biol Chem*, **281**: 31605-15.
- Galuska SP, Rollenhagen M, Kaup M, Eggers K, Oltmann-Norden I, Schiff M, Hartmann M, Weinhold B, Hildebrandt H, Geyer R, Mühlenhoff M, Geyer H. 2010.** Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**: 10250-5.
- Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. 2007.** Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev*, **56**: 101-18.
- Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. 2010.** The Role of PSA-NCAM in Adult Neurogenesis. *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule Ncam*, **663**: 127-136.
- Gerardy-Schahn R, Eckhardt M, Ledermann J, Kemshead JT. 1994.** Topography of NCAM antigenic epitopes recognized by SCLC-cluster-1 antibodies. A consensus view. *Int J Cancer Suppl*, **8**: 27-9.
- Ghysen A, Dambly-Chaudière C. 2007.** The lateral line microcosmos. *Genes Dev*, **21**: 2118-30.
- Gower HJ, Barton CH, Elsom VL, Thompson J, Moore SE, Dickson G, Walsh FS. 1988.** Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell*, **55**: 955-64.
- Grumet M, Rutishauser U, Edelman GM. 1982.** Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells in vitro. *Nature*, **295**: 693-5.
- Gumbiner BM. 1996.** Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**: 345-57.
- Haas P, Gilmour D. 2006.** Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell*, **10**: 673-80.
- Haastert-Talini K, Schaper-Rinkel J, Schmitte R, Bastian R, Mühlenhoff M, Schwarzer D, Draeger G, Su Y, Scheper T, Gerardy-Schahn R, Grothe C. 2010.** In vivo evaluation of polysialic acid as part of tissue-engineered nerve transplants. *Tissue Eng Part A*, **16**: 3085-98.
- Haberly LB. 2001.** Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem Senses*, **26**: 551-76.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nusslein-Volhard C. 1996.** The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, **123**: 1-36.
- Hake LE, Mendez R, Richter JD. 1998.** Specificity of RNA binding by CPEB: requirement for RNA recognition motifs and a novel zinc finger. *Mol Cell Biol*, **18**: 685-93.
- Hall AK, Rutishauser U. 1985.** Phylogeny of a neural cell adhesion molecule. *Dev Biol*, **110**: 39-46.
- Hallenbeck PC, Vimr ER, Yu F, Bassler B, Troy FA. 1987.** Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units. *J Biol Chem*, **262**: 3553-61.
- Hammond KL, Whitfield TT. 2011.** Fgf and Hh signalling act on a symmetrical pre-pattern to specify anterior and posterior identity in the zebrafish otic placode and vesicle. *Development*, **138**: 3977-87.

- Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, Oriol R. 2005.** The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology*, **15**: 805-17.
- Hatta K. 1992.** Role of the floor plate in axonal patterning in the zebrafish CNS. *Neuron*, **9**: 629-42.
- He XL, Zhang JZ. 2005.** Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. *Genetics*, **169**: 1157-1164.
- Hilario JD, Rodino-Klapac LR, Wang C, Beattie CE. 2009.** Semaphorin 5A is a bifunctional axon guidance cue for axial motoneurons in vivo. *Dev Biol*, **326**: 190-200.
- Hildebrandt H, Becker C, Glüer S, Rösner H, Gerardy-Schahn R, Rahmann H. 1998a.** Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth. *Cancer Res*, **58**: 779-84.
- Hildebrandt H, Becker C, Müräu M, Gerardy-Schahn R, Rahmann H. 1998b.** Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem*, **71**: 2339-48.
- Hildebrandt H, Muhlenhoff M, Gerardy-Schahn R. 2010.** Polysialylation of NCAM. *Structure and Function of the Neural Cell Adhesion Molecule Ncam*, **663**: 95-109.
- Hildebrandt H, Muhlenhoff M, Weinhold B, Gerardy-Schahn R. 2007.** Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *Journal of Neurochemistry*, **103**: 56-64.
- Hildebrandt H, Mühlenhoff M, Oltmann-Norden I, Röckle I, Burkhardt H, Weinhold B, Gerardy-Schahn R. 2009.** Imbalance of neural cell adhesion molecule and polysialyltransferase alleles causes defective brain connectivity. *Brain*, **132**: 2831-8.
- Hjorth J, Key B. 2002.** Development of axon pathways in the zebrafish central nervous system. *International Journal of Developmental Biology*, **46**: 609-619.
- Horstkorte R, Schachner M, Magyar JP, Vorherr T, Schmitz B. 1993.** The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol*, **121**: 1409-21.
- Hu H. 2000.** Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors. *J Neurosci Res*, **61**: 480-92.
- Huang Y, Jellies J, Johansen KM, Johansen J. 1997.** Differential glycosylation of tractin and LeechCAM, two novel Ig superfamily members, regulates neurite extension and fascicle formation. *J Cell Biol*, **138**: 143-57.
- Huang YS, Jung MY, Sarkissian M, Richter JD. 2002.** N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *EMBO J*, **21**: 2139-48.
- Huang YS, Richter JD. 2007.** Analysis of mRNA translation in cultured hippocampal neurons. *Methods Enzymol*, **431**: 143-62.
- Hudspeth AJ. 1989.** How the ear's works work. *Nature*, **341**: 397-404.
- Huppert J. 2006.** *Klonierung und Expressionsmuster der RNA-Bindeproteine aus der Familie der CPEB-Proteine im Zebrafisch.*
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard R, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B,**

- Biemont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, de Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigo R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Schachter V, Quetier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Crollius HR. 2004.** Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*, **431**: 946-957.
- Johnson CP, Fujimoto I, Perrin-Tricaud C, Rutishauser U, Leckband D. 2004.** Mechanism of homophilic adhesion by the neural cell adhesion molecule: use of multiple domains and flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**: 6963-8.
- Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE. 2005.** Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion (vol 280, pg 137, 2005). *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 23424-23424.
- Jokilampi 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.
- Jorgensen OS, Bock E. 1974.** Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J Neurochem*, **23**: 879-80.
- Jungnickel J, Brämer C, Bronzlik P, Lipokatic-Takacs E, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Grothe C. 2009.** Level and localization of polysialic acid is critical for early peripheral nerve regeneration. *Mol Cell Neurosci*, **40**: 374-81.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M. 1990.** Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol*, **110**: 209-18.
- Kasper C, Rasmussen H, Kastrup JS, Ikemizu S, Jones EY, Berezin V, Bock E, Larsen IK. 2000.** Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nature Structural Biology*, **7**: 389-393.
- Kim JH, Richter JD. 2006.** Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol Cell*, **24**: 173-83.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995.** Stages of Embryonic-Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics*, **203**: 253-310.
- Kiselyov VV, Berezin V, Maar TE, Soroka V, Edvardsen K, Schousboe A, Bock E. 1997.** The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *J Biol Chem*, **272**: 10125-34.
- Kiselyov VV, Skladchikova G, Hinsby AM, Jensen PH, Kulahin N, Soroka V, Pedersen N, Tsetlin V, Poulsen FM, Berezin V, Bock E. 2003.** Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure*, **11**: 691-701.
- Kiselyov VV, Soroka V, Berezin V, Bock E. 2005.** Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J Neurochem*, **94**: 1169-79.
- Kitazume S, Kitajima K, Inoue S, Troy FA, Cho JW, Lennarz WJ, Inoue Y. 1994.** Identification of polysialic acid-containing glycoprotein in the jelly coat of sea urchin eggs. Occurrence of a novel type of polysialic acid structure. *J Biol Chem*, **269**: 22712-8.
- Kleene R, Mzoughi M, Joshi G, Kalus I, Bormann U, Schulze C, Xiao MF, Dityatev A, Schachner M. 2010.** NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of

- calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments. *J Neurosci*, **30**: 10784-98.
- Kleene R, Schachner M. 2004.** Glycans and neural cell interactions. *Nature Reviews Neuroscience*, **5**: 195-208.
- Kochlamazashvili G, Senkov O, Grebenyuk S, Robinson C, Xiao MF, Stummeyer K, Gerardy-Schahn R, Engel AK, Feig L, Semyanov A, Suppiramaniam V, Schachner M, Dityatev A. 2010.** Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid regulates synaptic plasticity and learning by restraining the signaling through GluN2B-containing NMDA receptors. *J Neurosci*, **30**: 4171-83.
- Kochoyan A, Poulsen FM, Berezin V, Bock E, Kiselyov VV. 2008.** Structural basis for the activation of FGFR by NCAM. *Protein Sci*, **17**: 1698-705.
- Koide T, Miyasaka N, Morimoto K, Asakawa K, Urasaki A, Kawakami K, Yoshihara Y. 2009.** Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**: 9884-9.
- Korja M, Jokilampi A, Salmi TT, Kalimo H, Pelliniemi TT, Isola J, Rantala I, Haapasalo H, Finne J. 2009.** Absence of polysialylated NCAM is an unfavorable prognostic phenotype for advanced stage neuroblastoma. *BMC Cancer*, **9**: 57.
- Kudo M, Takayama E, Tashiro K, Fukamachi H, Nakata T, Tadakuma T, Kitajima K, Inoue Y, Shiokawa K. 1998.** Cloning and expression of an alpha-2,8-polysialyltransferase (STX) from *Xenopus laevis*. *Glycobiology*, **8**: 771-7.
- Kustermann S, Hildebrandt H, Bolz S, Dengler K, Kohler K. 2010.** Genesis of Rods in the Zebrafish Retina Occurs in a Microenvironment Provided by Polysialic Acid-expressing Muller Glia. *Journal of Comparative Neurology*, **518**: 636-646.
- Kwan KM, Fujimoto E, Grabher C, Mangum BD, Hardy ME, Campbell DS, Parant JM, Yost HJ, Kanki JP, Chien CB. 2007.** The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn*, **236**: 3088-99.
- Lamont LB, Kimble J. 2007.** Developmental expression of FOG-1/CPEB protein and its control in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germ line. *Dev Dyn*, **236**: 871-9.
- Lang DM, Warren JT, Klisa C, Stuermer CAO. 2001.** Topographic restriction of TAG-1 expression in the developing retinotectal pathway and target dependent reexpression during axon regeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **17**: 398-414.
- Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ, Gallie DR. 1997.** Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem*, **272**: 16247-55.
- Liu L, Haines S, Shew R, Akeson RA. 1993.** Axon growth is enhanced by NCAM lacking the VASE exon when expressed in either the growth substrate or the growing axon. *J Neurosci Res*, **35**: 327-45.
- Liu Q, Dalman MR, Sarmah S, Chen S, Chen Y, Hurlbut AK, Spencer MA, Pancoe L, Marrs JA. 2011.** Cell adhesion molecule cadherin-6 function in zebrafish cranial and lateral line ganglia development. *Dev Dyn*, **240**: 1716-26.
- Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. 2005.** Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev*, **85**: 281-317.
- Lynch M, Force A. 2000.** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics*, **154**: 459-473.

- Malykh YN, Krisch B, Gerardy-Schahn R, Lapina EB, Shaw L, Schauer R. 1999.** The presence of N-acetylneuraminic acid in Malpighian tubules of larvae of the cicada *Philaenus spumarius*. *Glycoconj J*, **16**: 731-9.
- Maness PF, Schachner M. 2007.** Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci*, **10**: 19-26.
- Mao Y, Freeman M. 2009.** Fasciclin 2, the *Drosophila* orthologue of neural cell-adhesion molecule, inhibits EGF receptor signalling. *Development*, **136**: 473-81.
- Marx M. 1999.** *Untersuchungen zur Funktion von Zelladhäsionsmolekülen im Nervensystem von Gold- und Zebrafischen*, Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- Marx M. 2002.** *Synthese, Expressionsmuster und Funktion von Polysialinsäure (PSA) während der Entwicklung des Nervensystems im Zebrafischembryo*, Universität Konstanz, Bibliothek der Universität Konstanz.
- 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. *Developmental Biology*, **306**: 560-571.
- Marx M, Rutishauser U, Bastmeyer M. 2001.** Dual function of polysialic acid during zebrafish central nervous system development. *Development*, **128**: 4949-4958.
- Mayford M, Barzilai A, Keller F, Schacher S, Kandel ER. 1992.** Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia*. *Science*, **256**: 638-44.
- McGrew LL, Dworkin-Rastl E, Dworkin MB, Richter JD. 1989.** Poly(A) elongation during *Xenopus* oocyte maturation is required for translational recruitment and is mediated by a short sequence element. *Genes Dev*, **3**: 803-15.
- McGrew LL, Richter JD. 1989.** *Xenopus* oocyte poly(A) RNAs that hybridize to a cloned interspersed repeat sequence are not translatable. *Dev Biol*, **134**: 267-70.
- McGrew LL, Richter JD. 1990.** Translational control by cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation: characterization of cis and trans elements and regulation by cyclin/MPF. *EMBO J*, **9**: 3743-51.
- Mehanna A, Mishra B, Kurschat N, Schulze C, Bian S, Loers G, Irintchev A, Schachner M. 2009.** Polysialic acid glycomimetics promote myelination and functional recovery after peripheral nerve injury in mice. *Brain*, **132**: 1449-62.
- Mendez R, Murthy KG, Ryan K, Manley JL, Richter JD. 2000.** Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell*, **6**: 1253-9.
- Mendez R, Richter JD. 2001.** Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 521-9.
- Mendiratta SS, Sekulic N, Hernandez-Guzman FG, Close BE, Lavie A, Colley KJ. 2006.** A novel alpha-helix in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule is critical for N-glycan polysialylation. *J Biol Chem*, **281**: 36052-9.
- Mendiratta SS, Sekulic N, Lavie A, Colley KJ. 2005.** Specific amino acids in the first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule play a role in its recognition and polysialylation by the polysialyltransferase ST8Sia IV/PST. *J Biol Chem*, **280**: 32340-8.
- Metcalfe WK. 1985.** Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J Comp Neurol*, **238**: 218-24.
- Meyer A, Van de Peer Y. 2005.** From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, **27**: 937-945.

- Milev P, Friedlander DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU. 1994.** Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol*, **127**: 1703-15.
- Milev P, Maurel P, Häring M, Margolis RK, Margolis RU. 1996.** TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. *J Biol Chem*, **271**: 15716-23.
- Milner R, Campbell IL. 2002.** The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res*, **69**: 286-91.
- Minshall N, Reiter MH, Weil D, Standart N. 2007.** CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, **282**: 37389-401.
- MINSKY M. 1988.** MEMOIR ON INVENTING THE CONFOCAL SCANNING MICROSCOPE. *Scanning*, **10**: 128-138.
- Miyasaka N, Morimoto K, Tsubokawa T, Higashijima S, Okamoto H, Yoshihara Y. 2009.** From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. *J Neurosci*, **29**: 4756-67.
- Miyasaka N, Sato Y, Yeo SY, Hutson LD, Chien CB, Okamoto H, Yoshihara Y. 2005.** Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development*, **132**: 1283-1293.
- 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. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **18**: 119-130.
- Moon RY, Horne RS, Hauck FR. 2007.** Sudden infant death syndrome. *Lancet*, **370**: 1578-87.
- Mori K, Yoshihara Y. 1995.** Molecular recognition and olfactory processing in the mammalian olfactory system. *Prog Neurobiol*, **45**: 585-619.
- Muhlenhoff M, Oltmann-Norden I, Weinhold B, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R. 2009.** Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. *Biological Chemistry*, **390**: 567-574.
- Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G, Kiss JZ. 2000.** Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 4315-20.
- Murray BA, Owens GC, Prediger EA, Crossin KL, Cunningham BA, Edelman GM. 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**: 1431-9.
- Myers PZ, Eisen JS, Westerfield M. 1986.** Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J Neurosci*, **6**: 2278-89.
- Mühlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M, Gerardy-Schahn R. 1996.** Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J*, **15**: 6943-50.
- Mühlenhoff M, Oltmann-Norden I, Weinhold B, Hildebrandt H, Gerardy-Schahn R. 2009.** Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. *Biol Chem*, **390**: 567-74.
- Nakano T, Windrem M, Zappavigna V, Goldman SA. 2005.** Identification of a conserved 125 base-pair Hb9 enhancer that specifies gene expression to spinal motor neurons. *Dev Biol*, **283**: 474-85.

- Nakata D, Troy FA. 2005.** Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS. *J Biol Chem*, **280**: 38305-16.
- Nakayama J, Angata K, Ong E, Katsuyama T, Fukuda M. 1998.** Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: From biosynthesis to function. *Pathology International*, **48**: 665-677.
- Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B, Fukuda M. 1995.** Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 7031-5.
- Nelson RW, Bates PA, Rutishauser U. 1995.** Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*, **270**: 17171-9.
- Newport J, Kirschner M. 1982.** A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*, **30**: 675-86.
- Noble M, Albrechtsen M, Møller C, Lyles J, Bock E, Goridis C, Watanabe M, Rutishauser U. 1985.** Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature*, **316**: 725-8.
- Oe S, Yoneda Y. 2010.** Cytoplasmic polyadenylation element-like sequences are involved in dendritic targeting of BDNF mRNA in hippocampal neurons. *FEBS Lett*, **584**: 3424-30.
- Ohno S. 1970.** *Evolution by Gene Duplication*, Berlin-Heidelberg-NewYork, Springer-Verlag.
- Olsen M, Zuber C, Roth J, Linnemann D, Bock E. 1995.** The ability to re-express polysialylated NCAM in soleus muscle after denervation is reduced in aged rats compared to young adult rats. *Int J Dev Neurosci*, **13**: 97-104.
- Oltmann-Norden I, Galuska SP, Hildebrandt H, Geyer R, Gerardy-Schahn R, Geyer H, Mühlenhoff M. 2008.** Impact of the polysialyltransferases ST8SialI and ST8SialIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *J Biol Chem*, **283**: 1463-71.
- Ong E, Nakayama J, Angata K, Reyes L, Katsuyama T, Arai Y, Fukuda M. 1998.** Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology*, **8**: 415-424.
- Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. 1994.** N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron*, **13**: 595-609.
- Palser AL, Norman AL, Saffell JL, Reynolds R. 2009.** Neural cell adhesion molecule stimulates survival of premyelinating oligodendrocytes via the fibroblast growth factor receptor. *J Neurosci Res*, **87**: 3356-68.
- Paoloni-Giacobino A, Chen H, Antonarakis SE. 1997.** Cloning of a novel human neural cell adhesion molecule gene (NCAM2) that maps to chromosome region 21q21 and is potentially involved in Down syndrome. *Genomics*, **43**: 43-51.
- Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF. 2003.** The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*, **113**: 867-79.
- Pietri T, Easley-Neal C, Wilson C, Washbourne P. 2008.** Six cadm/SynCAM genes are expressed in the nervous system of developing zebrafish. *Dev Dyn*, **237**: 233-46.
- Pradel G, Schmidt R, Schachner M. 2000.** Involvement of L1.1 in memory consolidation after active avoidance conditioning in zebrafish. *J Neurobiol*, **43**: 389-403.

- Prag S, Lepekhin EA, Kolkova K, Hartmann-Petersen R, Kawa A, Walmod PS, Belman V, Gallagher HC, Berezin V, Bock E, Pedersen N. 2002.** NCAM regulates cell motility. *Journal of Cell Science*, **115**: 283-292.
- Preiss T, Hentze MW. 1998.** Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature*, **392**: 516-20.
- 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.
- Racki WJ, Richter JD. 2006.** CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse. *Development*, **133**: 4527-37.
- Radford HE, Meijer HA, de Moor CH. 2008.** Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1779**: 217-29.
- Richter JD. 2007.** CPEB: a life in translation. *Trends Biochem Sci*, **32**: 279-85.
- Rieger S, Volkmann K, Koster RW. 2008.** Polysialyltransferase expression is linked to neuronal migration in the developing and adult zebrafish. *Developmental Dynamics*, **237**: 276-285.
- Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R, Gehring WJ. 1992.** Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **256**: 673-5.
- Roth J, Zuber C, Wagner P, Blaha I, Bitter-Suermann D, Heitz PU. 1988.** Presence of the long chain form of polysialic acid of the neural cell adhesion molecule in Wilms' tumor. Identification of a cell adhesion molecule as an oncodevelopmental antigen and implications for tumor histogenesis. *Am J Pathol*, **133**: 227-40.
- Rothbard JB, Brackenbury R, Cunningham BA, Edelman GM. 1982.** Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J Biol Chem*, **257**: 11064-9.
- Rougon G, Nédélec J, Malapert P, Goridis C, Chesselet MF. 1990.** Post-translation modifications of neural cell surface molecules. *Acta Histochem Suppl*, **38**: 51-7.
- Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A. 1995.** Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol*, **351**: 51-61.
- Rutishauser U. 2008.** Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, **9**: 26-35.
- Rutishauser U, Jessell TM. 1988.** Cell adhesion molecules in vertebrate neural development. *Physiol Rev*, **68**: 819-57.
- Rutishauser U, Landmesser L. 1996.** Polysialic acid in the vertebrate nervous system: A promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends in Neurosciences*, **19**: 422-427.
- Rutishauser U, Watanabe M, Silver J, Troy FA, Vimr ER. 1985.** Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase. *J Cell Biol*, **101**: 1842-9.
- Röckle I, Seidenfaden R, Weinhold B, Mühlhoff M, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. 2008.** Polysialic acid controls NCAM-induced differentiation of neuronal precursors into calretinin-positive olfactory bulb interneurons. *Dev Neurobiol*, **68**: 1170-84.
- Sadoul R, Hirn M, Deagostini-Bazin H, Rougon G, Goridis C. 1983.** Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature*, **304**: 347-9.
- Saffell JL, Walsh FS, Doherty P. 1994.** Expression of NCAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to NCAM in a cellular substratum. *J Cell Biol*, **125**: 427-36.

- Sarkissian M, Mendez R, Richter JD. 2004.** Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3. *Genes Dev*, **18**: 48-61.
- Scheidegger EP, Lackie PM, Papay J, Roth J. 1994.** In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule. *Lab Invest*, **70**: 95-106.
- SCHMITZ B, PAPAN C, CAMPOSORTEGA J. 1993.** NEURULATION IN THE ANTERIOR TRUNK REGION OF THE ZEBRAFISH BRACHYDANIO-RERIO. *Roux's Archives of Developmental Biology*, **202**: 250-259.
- Schober M. 2011.** *Unterschiedliche Spleißvarianten des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM im Zebrafisch Danio rerio*, Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technology (KIT).
- Schreiber SC, Giehl K, Kastilan C, Hasel C, Mühlhoff M, Adler G, Wedlich D, Menke A. 2008.** Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology*, **134**: 1555-66.
- Schwob JE, Gottlieb DI. 1988.** Purification and characterization of an antigen that is spatially segregated in the primary olfactory projection. *J Neurosci*, **8**: 3470-80.
- Seidenfaden R, Krauter A, Hildebrandt H. 2006.** The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neuritogenesis by multiple mechanisms of interaction. *Neurochemistry International*, **49**: 1-11.
- Seidenfaden R, Krauter A, Schertzing F, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. 2003.** Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol Cell Biol*, **23**: 5908-18.
- Seki T, Arai Y. 1993.** Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci*, **13**: 2351-8.
- Senkov O, Sun M, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Schachner M, Dityatev A. 2006.** Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of long-term potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. *J Neurosci*, **26**: 10888-10989.
- Seppo A, Tiemeyer M. 2000.** Function and structure of Drosophila glycans. *Glycobiology*, **10**: 751-60.
- Shapiro L, Love J, Colman DR. 2007.** Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci*, **30**: 451-74.
- Si K, Choi YB, White-Grindley E, Majumdar A, Kandel ER. 2010.** Aplysia CPEB can form prion-like multimers in sensory neurons that contribute to long-term facilitation. *Cell*, **140**: 421-35.
- Si K, Giustetto M, Etkin A, Hsu R, Janisiewicz AM, Miniaci MC, Kim JH, Zhu H, Kandel ER. 2003.** A neuronal isoform of CPEB regulates local protein synthesis and stabilizes synapse-specific long-term facilitation in aplysia. *Cell*, **115**: 893-904.
- Small SJ, Haines SL, Akeson RA. 1988.** Polypeptide variation in an N-CAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally regulated through alternative splicing. *Neuron*, **1**: 1007-17.
- Smith GM, Jacobberger JW, Miller RH. 1993.** Modulation of adhesion molecule expression on rat cortical astrocytes during maturation. *J Neurochem*, **60**: 1453-66.
- Soroka V, Kolkova K, Kastrop JS, Diederichs K, Breed J, Kiselyov VV, Poulsen FM, Larsen IK, Welte W, Berezin V, Bock E, Kasper C. 2003.** Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure*, **11**: 1291-301.

- Storms SD, Kim AC, Tran BH, Cole GJ, Murray BA. 1996.** NCAM-mediated adhesion of transfected cells to agrin. *Cell Adhes Commun*, **3**: 497-509.
- Sunshine J, Balak K, Rutishauser U, Jacobson M. 1987.** Changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) structure during vertebrate neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**: 5986-90.
- Suzuki H, Tsukahara T, Inoue K. 2009.** Localization of c-mos mRNA around the animal pole in the zebrafish oocyte with Zor-1/Zorba. *Biosci Trends*, **3**: 96-104.
- Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M. 2005.** Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology*, **15**: 887-94.
- Suzuki SC, Takeichi M. 2008.** Cadherins in neuronal morphogenesis and function. *Dev Growth Differ*, **50 Suppl 1**: S119-30.
- Takamatsu K, Auerbach B, Gerardy-Schahn R, Eckhardt M, Jaques G, Madry N. 1994.** Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res*, **54**: 2598-603.
- Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Inui K, Oyanagi H, Yamada T, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H. 2001.** Prognostic significance of polysialic acid expression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **61**: 1666-70.
- Tanaka F, Otake Y, Nakagawa T, Kawano Y, Miyahara R, Li M, Yanagihara K, Nakayama J, Fujimoto I, Ikenaka K, Wada H. 2000.** Expression of polysialic acid and STX, a human polysialyltransferase, is correlated with tumor progression in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, **60**: 3072-80.
- Tang J, Landmesser L, Rutishauser U. 1992.** Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron*, **8**: 1031-44.
- Tang J, Rutishauser U, Landmesser L. 1994.** Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron*, **13**: 405-14.
- Tarun SZ, Sachs AB. 1996.** Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J*, **15**: 7168-77.
- Taylor EW, Jordan D, Coote JH. 1999.** Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol Rev*, **79**: 855-916.
- Theodosis DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G, Poulain DA. 1999.** Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J Neurosci*, **19**: 10228-36.
- Theodosis DT, Pierre K, Poulain DA. 2000.** Differential expression of two adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, F3 and polysialylated NCAM, in hypothalamic magnocellular neurones capable of plasticity. *Exp Physiol*, **85 Spec No**: 187S-196S.
- Theodosis DT, Rougon G, Poulain DA. 1991.** Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 5494-8.
- Thiery JP. 2003.** Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Curr Opin Genet Dev*, **13**: 365-71.
- Thiery JP, Brackenbury R, Rutishauser U, Edelman GM. 1977.** Adhesion Among Neural Cells of Chick-Embryo .2. Purification and Characterization of A Cell-Adhesion Molecule from Neural Retina. *Journal of Biological Chemistry*, **252**: 6841-6845.
- Thompson J, Dickson G, Moore SE, Gower HJ, Putt W, Kenimer JG, Barton CH, Walsh FS. 1989.** Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene

- generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain. *Genes Dev*, **3**: 348-57.
- Thompson MG, Foley DA, Swartzentruber KG, Colley KJ. 2011.** Sequences at the interface of the fifth immunoglobulin domain and first fibronectin type III repeat of the neural cell adhesion molecule are critical for its polysialylation. *J Biol Chem*, **286**: 4525-34.
- Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, Goridis C, Rutishauser U, Magnuson T. 1993.** Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron*, **11**: 1163-74.
- Treloar HB, Gabeau D, Yoshihara Y, Mori K, Greer CA. 2003.** Inverse expression of olfactory cell adhesion molecule in a subset of olfactory axons and a subset of mitral/tufted cells in the developing rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol*, **458**: 389-403.
- Trevarrow B, Marks DL, Kimmel CB. 1990.** Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron*, **4**: 669-79.
- Troy FA. 1992.** Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology*, **2**: 5-23.
- Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, Van de Peer Y. 2004.** Major events in the genome evolution of vertebrates: Paraneome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 1638-1643.
- Varea E, Guirado R, Gilabert-Juan J, Martí U, Castillo-Gomez E, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J. 2011.** Expression of PSA-NCAM and synaptic proteins in the amygdala of psychiatric disorder patients. *J Psychiatr Res*.
- Vawter MP. 2000.** Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur J Pharmacol*, **405**: 385-95.
- Villalba A, Coll O, Gebauer F. 2011.** Cytoplasmic polyadenylation and translational control. *Curr Opin Genet Dev*, **21**: 452-7.
- Vlemminckx K, Kemler R. 1999.** Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*, **21**: 211-20.
- von Campenhausen, Yoshihara Y, Mori K. 1997.** OCAM reveals segregated mitral/tufted developing accessory olfactory bulb. *Neuroreport* **11**:2607-12
- Vutskits L, Djebbara-Hannas Z, Zhang H, Paccaud JP, Durbec P, Rougon G, Muller D, Kiss JZ. 2001.** PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci*, **13**: 1391-402.
- Walsh FS, Furness J, Moore SE, Ashton S, Doherty P. 1992.** Use of the neural cell adhesion molecule VASE exon by neurons is associated with a specific down-regulation of neural cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth in the developing cerebellum and hippocampus. *J Neurochem*, **59**: 1959-62.
- Walz A, Mombaerts P, Greer CA, Treloar HB. 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.
- Weiland UM, Ott H, Bastmeyer M, Schaden H, Giordano S, Stuermer CAO. 1997.** Expression of an L1-related cell adhesion molecule on developing CNS fiber tracts in zebrafish and its functional contribution to axon fasciculation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **9**: 77-89.
- Weinhold B, Seidenfaden R, Rockle I, Muhlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. 2005.** Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 42971-42977.

- Williams DK, Gannon-Murakami L, Rougon G, Udin SB. 1996.** Polysialylated neural cell adhesion molecule and plasticity of ipsilateral connections in *Xenopus tectum*. *Neuroscience*, **70**: 277-85.
- Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P. 1994.** Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*, **13**: 583-94.
- Wilson AL, Shen YC, Babb-Clendenon SG, Rostedt J, Liu B, Barald KF, Marrs JA, Liu Q. 2007.** Cadherin-4 plays a role in the development of zebrafish cranial ganglia and lateral line system. *Dev Dyn*, **236**: 893-902.
- Wilson SW, Ross LS, Parrett T, Easter SS. 1990.** The Development of A Simple Scaffold of Axon Tracts in the Brain of the Embryonic Zebrafish, *Brachydanio-Rerio*. *Development*, **108**: 121-145.
- Winther M, Berezin V, Walmod PS. 2012.** NCAM2/OCAM/RNCAM: Cell adhesion molecule with a role in neuronal compartmentalization. *Int J Biochem Cell Biol*, **44**: 441-6.
- Wolman MA, Regnery AM, Becker T, Becker CG, Halloran MC. 2007.** Semaphorin3D regulates axon axon interactions by modulating levels of L1 cell adhesion molecule. *J Neurosci*, **27**: 9653-63.
- Wood GK, Liang JJ, Flores G, Ahmad S, Quirion R, Srivastava LK. 1997.** Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **51**: 69-81.
- Wu L, Wells D, Tay J, Mendis D, Abbott MA, Barnitt A, Quinlan E, Heynen A, Fallon JR, Richter JD. 1998.** CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron*, **21**: 1129-39.
- Yabe U, Sato C, Matsuda T, Kitajima K. 2003.** Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J Biol Chem*, **278**: 13875-80.
- Yang AH, Chen JY, Lee CH. 2011.** Expression of NCAM and OCIAD1 in well-differentiated thyroid carcinoma: correlation with the risk of distant metastasis. *J Clin Pathol*.
- Yang P, Major D, Rutishauser U. 1994.** Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. *J Biol Chem*, **269**: 23039-44.
- Yang P, Yin X, Rutishauser U. 1992.** Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J Cell Biol*, **116**: 1487-96.
- Yoshida Y, Kojima N, Tsuji S. 1995.** Molecular cloning and characterization of a third type of N-glycan alpha 2,8-sialyltransferase from mouse lung. *J Biochem*, **118**: 658-64.
- Yoshihara Y, Katoh K, Mori K. 1993.** Odor stimulation causes disappearance of R4B12 epitope on axonal surface molecule of olfactory sensory neurons. *Neuroscience*, **53**: 101-10.
- 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. *Journal of Neuroscience*, **17**: 5830-5842.
- Zearfoss NR, Alarcon JM, Trifilieff P, Kandel E, Richter JD. 2008.** A molecular circuit composed of CPEB-1 and c-Jun controls growth hormone-mediated synaptic plasticity in the mouse hippocampus. *J Neurosci*, **28**: 8502-9.

- Zecchini S, Bombardelli L, Decio A, Bianchi M, Mazzarol G, Sanguineti F, Aletti G, Maddaluno L, Berezin V, Bock E, Casadio C, Viale G, Colombo N, Giavazzi R, Cavallaro U. 2011.** The adhesion molecule NCAM promotes ovarian cancer progression via FGFR signalling. *EMBO Mol Med*, **3**: 480-94.
- Zhang H, Vutskits L, Calaora V, Durbec P, Kiss JZ. 2004.** A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci*, **117**: 93-103.
- Zhang Y, Ghadiri-Sani M, Zhang X, Richardson PM, Yeh J, Bo X. 2007.** Induced expression of polysialic acid in the spinal cord promotes regeneration of sensory axons. *Mol Cell Neurosci*, **35**: 109-19.
- Zhang Y, Sheets MD. 2009.** Analyses of zebrafish and *Xenopus* oocyte maturation reveal conserved and diverged features of translational regulation of maternal cyclin B1 mRNA. *BMC Dev Biol*, **9**: 7.
- Zuber C, Lackie PM, Catterall WA, Roth J. 1992.** Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J Biol Chem*, **267**: 9965-71.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha-, oder anti-	l	Liter
aK	anteriore Kommissur	LSM	Laser Scanning Mikroskop
°C	Grad Celcius	M	Molar (mol/l)
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)	ma	Motoraxone
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)	max.	maximal
μm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)	mbar	Millibar (10 ⁻³ bar)
Abb.	Abbildung	min	Minuten
Ak	Antikörper	mind.	mindestens
β	beta	mkl	monoklonaler Antikörper (meist aus Maus)
bidest	zweifach destilliertes Wasser	ml	Milliliter (10 ⁻⁶ l)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)	mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
bzw.	beziehungsweise	mm	Millimeter (10 ⁻³ m)
ca.	circa	Mo	Morpholino
ca	Cerebellumanlage	NCAM	Neural cell adhesion molecule/ neuronaes Zelladhäsionsmolekül
cm	Zentimeter (10 ⁻² m)	NH₃	Ammoniak
CO₂	Kohlendioxid	nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
DMSO	Dimethylsulfoxid	ob	Olfaktorischer Bulbus
DNA	Desoxyribonucleinsäure	OCAM	“olfactory cell adhesion molecule”/olfaktorisches Zelladhäsionsmolekül
e	Epiphyse	op	Olfaktorische Plakode
ECM	Extrazelluläre Matrix	ov	Otischer Vesikel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	pK	Posteriore Kommissur
EGFP	enhanced (verstärkt) grün fluoreszierendes Protein	PFA	Paraformaldehyd
engl.	englisch	pkl AK	polyklonaler Antikörper
evt.	eventuell	rm	Rückenmark
fp	Floorplate/ Bodenplatte	sec	Sekunde
g	Ganglion	sln	Seitenliniennerv
h	Hinterhirn	Tab.	Tabelle
hpf	Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilization)	u.a.	unter anderem
H₂O	Wasser	UTR	“untranslated region”/nicht translatierter Bereich
IgG	Immunglobulin G	z.B.	zum Beispiel
Kap.	Kapitel	zNCAM	Zebrafisch NCAM
kDa	Kilodalton	ZF	Zebrafisch
		z.T.	zum Teil

7.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Bastmeyer dafür bedanken, dass ich meine Dissertation an seinem Institut anfertigen konnte. Die aufheiternde und lockere Atmosphäre im Institut, wie auch die Freiheiten, die mir während der Durchführung der Dissertation gewährt wurden, haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Uwe Strähle, der freundlicherweise das Co-Referat für meine Diplomarbeit (April 2008) und jetzt auch für meine Dissertation übernommen hat.

Für die stetige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche, die konstruktiven Diskussionen, wie auch für das vermittelte Gefühl der gegenseitigen Wertschätzung, dafür bedanke ich mich ganz besonders bei Dr. Joachim Bentreop.

Ein besonderer Dank gebührt den Mitgliedern des „Zebrafisch-Teams“: Michaela Schober, Heinrich Schopf, Kerstin Weber und Rainer Müller für die gegenseitige Unterstützung und die lustigen Gespräche während unserer gemeinsamen Laborarbeit.

Mein spezieller Dank gilt meiner Mutter, die mich trotz anfänglichen Unverständnisses immer wieder auf viele unterschiedliche Weisen unterstützt hat und meinem Vater, der mich aus der Ferne gedanklich unterstützt hat.

Ein liebevolles Dankeschön geht an meinen Partner Thomas, der mich während des gesamten Studiums unterstützt hat, für seine verständnisvolle Geduld während der Prüfungsphasen und für die Betreuung unserer Tochter Katharina in der Endphase meiner Dissertation.

Zum Andenken möchte ich hier den am 2. Dezember 2011 verstorbenen Dr. Chi-Bin Chien erwähnen, der mir den Tol2kit für meine Diplomarbeit und meine Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Publikation

Langhauser M., Ustinova J., Rivera-Milla E., Finne J., Yoshihara Y., Bastmeyer, M. and Bentrop J. (2012). "Ncam1a and Ncam1b: Two carriers of polysialic acid with different functions in the developing zebrafish nervous system." *Glycobiology* Feb;22(2):196-209.

Poster

Langhauser M., Ustinova J., Rivera-Milla E., Finne J., Yoshihara Y., Bastmeyer, M. and Bentrop J. Functional diversification of neural cell adhesion molecules in the developing zebrafish nervous system. Sialoglyco Meeting 2010. Potsdam, August 2010.

Vorträge

"Cell adhesion molecules of the NCAM type and their modification polySia"
Zebrafisch Meeting Süddeutschland. Burg Landeck, September 2009.

"Functional diversification of neural cell adhesion molecules in the developing zebrafish nervous system." Aquatic models Club. KIT/Campus Nord, Juli 2010.

"Functional diversification of neural cell adhesion molecules in the developing zebrafish nervous system." Vortrag zur Poster-Präsentation, Sialoglyco Meeting 2010, Potsdam, 21.- 26.08.2010.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Melanie Langhauser

geboren am 05. März 1975 in Ludwigshafen am Rhein

ledig

Schulbildung

09/1981 – 07/1985	Grundschule Lachen-Speyerdorf
09/1985 – 07/1994	Leibniz-Gymnasium Neustadt a.d. Weinstraße Abschluß: Abitur (Gesamtnote: 2,6)
07/1994 – 04/1995	Berufsvorbereitende Praktika

Berufsausbildung

04/1995 – 03/1998	Leiser Schule Kaiserslautern Abschluss: Beschäftigungs- und Arbeitstherapeutin
-------------------	---

Berufsausübung

04/1998 – 10/2003	Beschäftigungs- und Arbeitstherapeutin an der Neurologischen Klinik Bad Aibling
-------------------	--

Akademische Ausbildung

10/2003 – 11.04. 2008	Biologiestudium an der Technischen Hochschule Karlsruhe Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Allgemeine Zoologie, Biochemie Diplomarbeitsthema: „Funktionen der Polysialyltransferasen während der Entwicklung des Zebrafischs“ (Gesamtnote 1.2)
05/2008 – 04/2012	Promotion am Institut für Zell- und Neurobiologie, bei Prof. Dr. Martin Bastmeyer, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)